

“Control lumínico de la respuesta al ácido jasmónico (JA) en plantas de *Arabidopsis thaliana*”

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

Melisa Leone

Licenciada en Genética-Universidad de Morón-2009

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la
Agricultura (IFEVA). Facultad de Agronomía-UBA-CONICET



FAUBA Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Carlos L. Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD (Oregon State University, U.S.A)

Consejero de Estudios

Carlos Mazza

Licenciado en ciencias biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Carlos L. Ballaré

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD (Oregon State University, U.S.A)

JURADO

Jorge Prometeo Muschietti

Licenciado en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Pablo Cerdán

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Guillermo Esteban Santa María

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 15 de Marzo de 2016

AGRADECIMIENTOS

- A la educación privada, a la Agencia y al CONICET por permitirme estudiar y desarrollar este doctorado.
 - Al IFEVA por haberme otorgado un lugar para el desarrollo de este trabajo y por permitirme formar parte de este grupo.
 - Al Dr. Carlos Ballaré por haber confiado en mí y aceptado ser director de este trabajo. Por haberme introducido en el mundo de la fotobiología.
 - A la Dra Miriam Izaguirre por haberme ayudado en mis primeros pasos en el laboratorio y al Dr Carlos Mazza por haberme ayudado en estas últimas etapas.
 - A todo el grupo UV (Nacho, Pato, Mer K, Miriam y Flor) por todas las cosas que hemos pasado, charlas, mates y discusiones.
 - A los vecinitos del laboratorio (Rena, Vero, Nati y Cristian) por todas las cosas prestadas y por las respuestas a las consultas técnicas
 - A Nacho, por tantos mates cebados, por la ayuda en los experimentos, por las charlas.
 - A Romi Cava, por estar siempre.
 - A todos los miembros del IFEVA que me ayudaron que durante estos 5 años de trabajo.
 - A mis viejos, mi hermana y mi abuela por el apoyo constante y el aguante.
 - A mis amigos por estar, escuchar y meterme pilas.
 - A mis bebes de 4 patas, por sacarme una sonrisa en los momentos difíciles.
- Y a Maty por haberme bancado y estar siempre a mi lado.

MUCHAS GRACIAS!

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

El trabajo presentado en esta tesis ha dado origen a la siguiente publicación:

- **M. Leone**, M. M. Keller, I. Cerrudo, C. L. Ballaré. To grow or defend? Low red:far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in Arabidopsis seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytologist*, 2014 Oct; 204(2):355-67.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	v
DECLARACIÓN	vii
PUBLICACIONES	ix
ÍNDICE GENERAL	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	1
1.1 Luz.....	3
1.2 Respuestas ante señales de competencia.....	4
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.4 Defensas en plantas.....	7
1.5 ¿Crecer o defenderse?.....	8
1.6 Jasmonatos.....	9
1.7 Giberelinas.....	12
1.8 GA y JA.....	13
1.9 OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	16
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Material vegetal.....	19
2.2 Esterilización de las semillas.....	20
2.3 Germinación de las semillas.....	21
2.4 Manipulaciones del ambiente lumínico.....	21
2.5 Tratamientos hormonales.....	22
2.6 Medición de largo de hipocotilo y peso fresco.....	24
2.7 Extracción y medición de antocianinas y metabolitos secundarios.....	24
2.8 Tinción histoquímica con GUS.....	24

2.9 Extracción de proteínas para medir actividad enzimática.....	24
2.10 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	24
2.11 Medición de la actividad enzimática.....	25
2.12 Extracción de proteínas para Western Blot.....	25
2.13 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	25
2.14 Análisis de proteínas por Western Blot.....	25
2.15 Análisis estadístico.....	26

CAPÍTULO 3. RESULTADOS.....27

3.1 Evaluación y determinación de respuestas de fácil medición para determinar la sensibilidad a JA.....	29
3.2 La disminución de la sensibilidad de los tejidos frente a JA está mediada principalmente por la inactivación del phyB.....	31
3.3 El fenotipo de insensibilidad a JA es casi completo en la mutante <i>phyB</i>	33
3.4 Las DELLAs son requeridas para las respuestas a JA evaluadas	35
3.5 RGL3 no juega un rol importante en la sensibilidad a JA.....	37
3.6 Las bajas relaciones R: RL reducen la abundancia de las proteínas DELLAs.....	41
3.7 El efecto de las bajas relaciones R:RL disminuyendo la sensibilidad a los JAs está perdido en la mutante de ganancia de función <i>gai-1</i>	43
3.8 Las bajas relaciones R: RL estabilizan a la proteína JAZ10.....	45
3.9 La disminución de la sensibilidad a JA por las bajas relaciones R:RL requiere de JAZ10.....	47
3.10 JAZ8 y JAZ9 no serían necesarias en la de-sensibilización a JA causada por bajas relaciones R:RL.....	50
3.11 JAZ10 es partícipe necesario en la reducción de la sensibilidad a JA causada por la inactivación de phyB.....	53
3.12 Las síntesis de GA serían requeridas para que bajas relaciones R:RL disminuyan la sensibilidad a JA	66
3.13 Las GAs promueven la estabilización de la proteína represora JAZ10.....	57

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN.....61

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES.....67

BIBLIOGRAFÍA.....73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Detalles de las semillas utilizadas en la tesis.....	19
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Espectro de irradiancia en ambientes naturales.....	4
Figura 1.2: Espectro lumínico y fotorreceptores en plantas.....	5
Figura 1.3: Fotoconversión de los fitocromos.....	6
Figura 1.4: Biosíntesis de JA en <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
Figura 1.5: Activación de la vía JA.....	11
Figura 1.6: Familia de proteínas JAZ.....	12
Figura 1.7: Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes inducidos por JA..	14
Figura 1.8: Efectos de las bajas relaciones R:RL sobre la vía de los JAs.....	15
Figura 2.1: Fotografía de los frascos donde crecen las plantas in vitro.....	21
Figura 2.2: Manipulación del ambiente lumínico.....	22
Figura 2.3: Esquema representativo donde se muestra como fueron desarrollados los experimentos.....	23
Figura 2.4: Esquema representativo de los experimentos para medir Actividad Enzimática.....	23
Figura 3.1: Evaluación de un conjunto respuestas a JA dependientes de COI1 para determinar la sensibilidad a JA en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
Figura 3.2: Efectos del JA y la inactivación del phyB en el crecimiento y la defensa en <i>Arabidopsis</i>	32
Figura 3.3: El fenotipo de insensibilidad a JA es casi completo en la mutante <i>phyB</i> ...	34
Figura 3.4: Las respuestas de crecimiento y defensa inducidas por los JAs requieren la presencia de las proteínas DELLAs.....	36
Figura 3.5: Las mutantes <i>4xdella</i> (<i>gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1</i>) tienen un fenotipo insensible a JA y a RL, similar al que observamos en la <i>5xdella</i> (<i>gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl3-1 rgl2-1</i>).	38
Figura 3.6: Las mutantes <i>rgl3.3</i> tienen un fenotipo sensible a JA y a RL, similar al que observamos en el genotipo salvaje.....	40
Figura 3.7: La suplementación con luz RL promueve la degradación de las proteínas DELLA.....	42
Figura 3.8: La degradación de GAI1 es requerida para que se produzca el efecto inhibitorio de las bajas relaciones R:RL sobre las respuestas a JA en plantas de <i>Arabidopsis</i>	44

Figura 3.9: Las bajas relaciones R:RL incrementan la estabilidad de la proteína JAZ10.....	46
Figura 3.10: Actividad enzimática de la línea 35s::JAZ1-GUS.....	47
Figura 3.11: Las bajas relaciones R: RL no inhiben las respuestas a JA en una mutante nula de <i>jaz10</i>	48
Figura 3.12: Las bajas relaciones R:RL no inhiben la respuesta a JA en la línea ARNi7.....	49
Figura 3.13: El efecto de las bajas relaciones R:RL como antagonista de la respuesta a JA está conservado en plantas mutantes de <i>jaz8</i> de <i>Arabidopsis</i>	51
Figura 3.14: El efecto de las bajas relaciones R:RL como antagonista de la respuesta a JA está conservado en plantas mutantes <i>jaz9.1</i> de <i>Arabidopsis</i>	52
Figura 3.15: Fenotipo de la doble mutante <i>jaz10phyB</i>	53
Figura 3.16: La mutación <i>jaz10</i> rescata el fenotipo de insensibilidad a JA que observamos en lamutante <i>phyB</i>	54
Figura 3.17: GA suprime las respuestas inducidas por JA, y la síntesis de GA es necesaria para que se manifieste el efecto represor de RL sobre las respuestas a JA....	56
Figura 3.18: Las GAs aumentan los niveles de proteínas JAZ10 y JAZ1.....	58
Figura 4.1: Modelos de mecanismos por los cuales las bajas relaciones R: RL disminuye la sensibilidad a los JAs.....	64

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AOC	Alleno Oxido Ciclasa
AOS	Alleno Oxido Sintasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ET	Etileno
GAs	Giberelinas
GUS	Beta-glucuronidasa
HCl	Ácido Clorhídrico
HIR	Respuesta de alta irradiancia
JA	Ácido Jasmónico
JAs	Jasmonatos
KDa	KiloDalton
LFR	Respuestas de bajo flujo
MeJA	Metil-Jasmonato
MS	Medio Murashige Skoog
ON	Over Night
PAC	Paclobutrazol
PAR	Radiación Fotosintéticamente activa
phyA	Fitocromo A
phyB	Fitocromo B
phys	Fitocromos
R	Radiación Roja
RL	Radiación Roja Lejana
SA	Ácido salicílico
SAS	Síndrome de escape al sombreado

SDS	Dodecil sulfato sódico
UV	Radiación ultravioleta
VLFR	Respuestas de muy bajo flujo

RESUMEN

Al monitorear los cambios en el ambiente lumínico, las plantas pueden obtener información acerca de la proximidad de las plantas vecinas. Los jasmonatos (JAs) son reguladores lipídicos que juegan un papel central en el control de las respuestas de defensa frente a patógenos y plagas, así como también en la regulación de los procesos de crecimiento y desarrollo. Una disminución en la relación rojo: rojo lejano (R:RL) de la luz representa una señal de competencia para las plantas terrestres. Esta señal es detectada por el fotorreceptor fitocromo B (phyB) y, entre otras cosas, induce la aceleración del crecimiento y elongación y reprime la expresión de defensas de las plantas. Los efectos de las bajas relaciones R:RL sobre el sistema de defensas están mediados, al menos en parte, a través de una reducción en la señalización de los JAs. En esta tesis doctoral se pretende avanzar en la comprensión de los mecanismos que controlan el efecto de R:RL y phyB en las respuestas a JA en *Arabidopsis thaliana*. Se postulan posibles mecanismos mediante los cuales la inactivación del phyB por bajas relaciones R:RL produce la disminución en la sensibilidad de la vía de los JAs. Para este fin, he combinado un enfoque genético con el uso de herramientas fisiológicas, bioquímicas y moleculares para estudiar los efectos de la calidad de la luz sobre los componentes críticos de la vía de señalización de JA. Los resultados presentados en esta tesis demuestran que el efecto de las bajas relaciones R:RL, provocando una disminución de la sensibilidad a JA, requiere de la proteína JA-ZIM domain 10 (JAZ10). También demostramos que la degradación de las proteínas DELLA (mediada por el aumento en la actividad de giberelinas [GAs]), es necesaria para que se manifieste la represión de la vía de JA en condiciones de bajas relaciones R:RL. Por último, los resultados sugieren que, además de este efecto bien caracterizado de las GAs sobre la señalización de JA, mediado por la degradación de las proteínas DELLAs, GA reprime las respuestas de defensa por un nuevo mecanismo. En este mecanismo, GA aumenta la estabilidad de la JAZ10 y retarda la degradación de esta proteína inducida por JA.

Palabras claves: Rojo:Rojo-lejano, fitocromo B, jasmonatos, defensas, JAZ, crecimiento, DELLA, GA, *Arabidopsis thaliana*

ABSTRACT

By monitoring changes in the light environment, plants can obtain information about the proximity of neighboring plants. Jasmonates (JAs) are lipid regulators that play a central role in the control of defense responses against pathogens and pests, and also in the regulation of growth and developmental processes. A low red:far-red (R:FR) ratio represents a signal of competition for terrestrial plants. This signal is detected by the photoreceptor phytochrome B (phyB) and, among other things, induces the acceleration of elongation growth and represses the expression of plant defenses. These effects of low R:FR repressing defense responses are mediated, at least in part, through a reduction in JA signaling. This doctoral thesis aimed to advance our understanding of the mechanisms that control the effect of R:FR and phyB on JA responses in *Arabidopsis thaliana*. We tested possible mechanisms by which the inactivation of phyB by low R:FR ratios represses JA signaling. To do this end, I combined a genetic approach with the use of physiological, biochemical and molecular tools to study the effects of light quality on critical components of the JA signaling pathway. The results presented in this thesis demonstrate that the effect of low R:FR decreasing JA sensitivity require the protein JA-ZIM domain 10 (JAZ10). We also showed that the turnover of DELLA proteins (presumably mediated by an increase in the activity of gibberellin [GA]), is required for expression of the effect of low R:FR ratios repressing JA signaling. Finally, our result suggest that, in addition to this well-characterized effect of GA on JA signaling, mediated by increased DELLA degradation, GA represses defense responses by a novel mechanism. In this mechanism GA increases the stability of the JAZ10 and retards the turnover of this protein induced by JA.

Keywords: red:far red, phytochrome B, jasmonate, defenses, JAZ, growth, DELLA, GA, *Arabidopsis thaliana*.

CAPÍTULO 1

Introducción, objetivos e hipótesis

Capítulo 1. Introducción, objetivos e hipótesis

1.1 Luz

La luz, además de ser una fuente de energía para la fotosíntesis, es para las plantas una fuente de información que controla numerosos procesos fisiológicos. La radiación actúa no solo como un recurso primario de energía para la fotosíntesis sino también como fuente de información. Esta información permite a las plantas detectar señales del ambiente que las rodea e “interpretarlas” para producir respuestas fisiológicas adaptativas. Existen diversas señales que regulan diferentes procesos tales como la des-etiolación, la germinación, el fototropismo, el gravitropismo, el escape al sombreado, las respuestas fotoperiódicas y la inducción de la floración.

En ausencia de luz, las plantas crecen de forma heterótrofa, utilizando los recursos acumulados por la semilla (plantas etioladas). En la etapa de etiolación las plantas presentan un rápido alargamiento del hipocotilo, un gancho apical y los cotiledones cerrados. Una vez que la luz es percibida por las plantas, comienza el proceso de des-etiolación que se caracteriza por la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la apertura del gancho apical, la expansión de los cotiledones y el desarrollo de los cloroplastos. Este conjunto de respuestas a la luz permiten la transición al modo de vida autotrófico.

Las plantas, a lo largo de la evolución, han adquirido la habilidad de detectar múltiples señales lumínicas, incluyendo la calidad (composición espectral), cantidad, dirección y duración del período de luz (Jiao et al. 2007). De la radiación total que incide sobre la superficie vegetal, solo una proporción es utilizada por las plantas para realizar el proceso de fotosíntesis y a esa radiación se la denomina PAR (*Photosynthetically Active Radiation*). La misma comprende aproximadamente el 50% del total de la radiación solar incidente a nivel del suelo y abarca longitudes de onda que van desde los 400 a los 700 nm (nanómetros). Las clorofilas y los carotenoides son los pigmentos encargados de absorber la energía necesaria para la fotosíntesis en las regiones del espectro del azul y rojo (R). Parte de la radiación verde y casi la totalidad del rojo lejano (RL) se reflejan y/o transmiten a través de las hojas. Consecuentemente, en condiciones de alta densidad de plantas, disminuye la relación R:RL de la luz incidente. En la radiación solar la relación R;RL es aproximadamente 1,2, mientras que en condiciones de sombreado este cociente cae a valores inferiores a 1, como consecuencia de la fuerte absorción luz R y la reflexión y transmisión del RL (Figura 1.1) (Holmes and Smith 1977, Kami et al. 2010, Casal 2013).

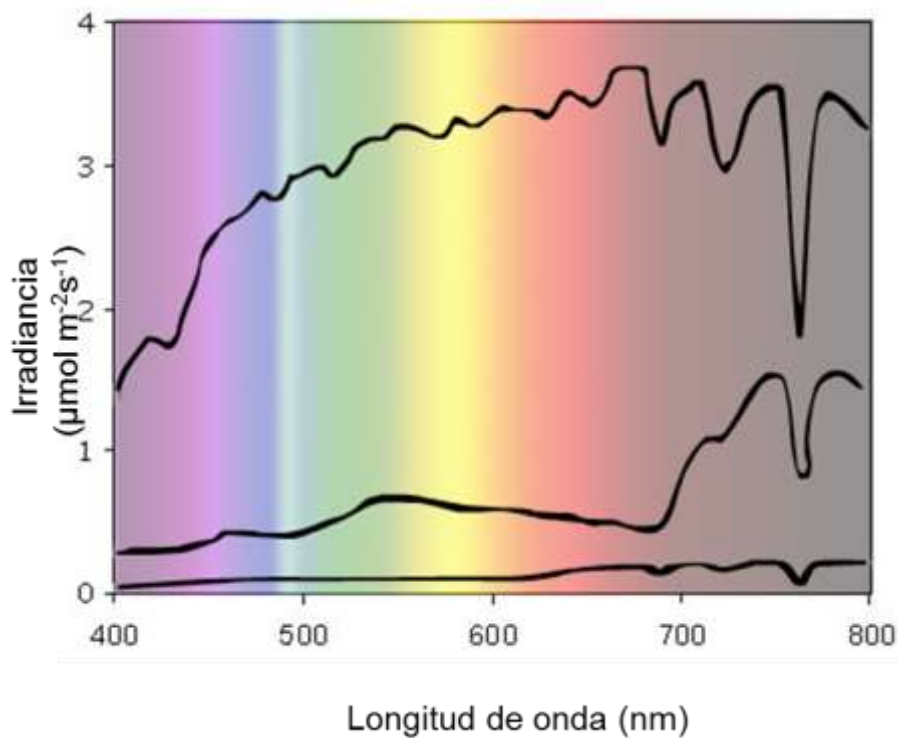


Figura 1.1. Espectro de irradiancia en ambientes naturales. La línea superior representa la luz solar que se irradia al medio día. La línea media representa la luz solar al medio día bajo canopeo. La línea inferior representa la irradiancia al anochecer. Adaptado de Franklin and Shinkle (2009).

1.2 Respuestas ante señales de competencia

La percepción de los cambios en aspectos claves del ambiente lumínico es llevada a cabo por un conjunto de fotorreceptores que se caracterizan por la longitud de onda que son capaces de percibir. Los fitocromos (phys) tienen máxima sensibilidad en las regiones del RL (730nm) y del rojo (R) (660 nm) (Smith 2000). Los fotorreceptores de la familia de los criptocromos y fototropinas son capaces de detectar la radiación en el rango del ultravioleta A y azul (315-500nm) (Briggs and Christie 2002). En la región del UV-B (280-315nm) las plantas tienen un fotorreceptor recientemente identificado, denominado UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) (Rizzini et al. 2011) (Figura 1.2).

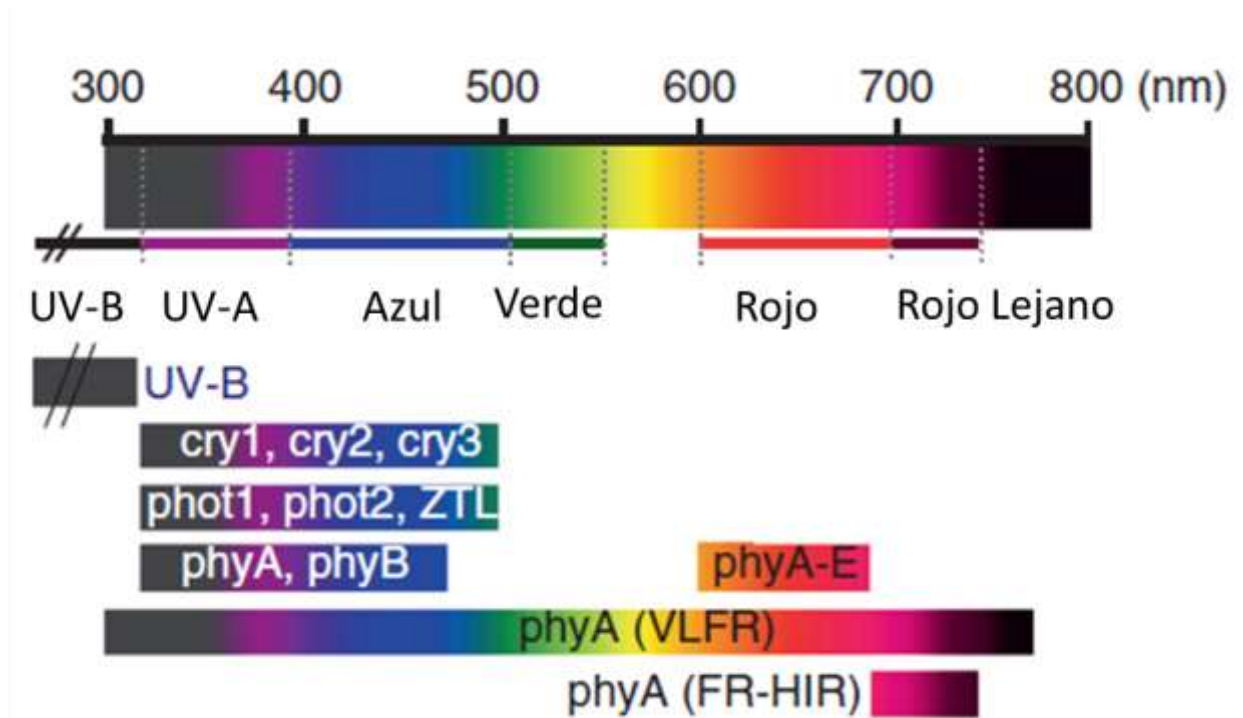


Figura 1.2: Espectro lumínico y fotoreceptores en plantas. En *Arabidopsis thaliana* existen distintos tipos de receptores: UVR-8 que es el receptor de UV-B, tres criptocromos (cry 1-3), 2 fototropinas (phot 1-2), Zeitlupe (ZTL) en la región del UV-A y azul y 5 fitocromos (phy A-E) con máximos de absorción en el rojo y el rojo lejano. Adaptado de Kami et al. (2010)

Todos los miembros de la familia de los fitocromos son activados por la luz R, mientras que el fitocromo A (phyA) también es activado por el rojo lejano (Quail 2007). Desde el punto de vista de los requerimientos de flujo, se conocen tres tipos de respuestas inducidas por los fitocromos; éstas son: respuestas de flujo muy bajo (VLFR), respuestas de bajo flujo (LFR) y respuestas de alta irradiancia (HIR). Un pulso de luz débil inducirá respuestas del tipo VLFR, y si persiste un periodo de tiempo mayor, la cantidad de luz percibida provocará una LFR. Una alta intensidad de luz y exposiciones prolongadas son requeridas para inducir respuestas del tipo HIR. Las evidencias indican que las respuestas VLFR y HIR son mediadas por el phyA mientras que en las respuestas de bajo flujo el protagonista es el phyB (Casal et al. 1998).

Los fitocromos están codificados por una pequeña familia multigénica compuesta por cinco genes (*PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* y *PHYE*) (Nagy and Schafer 2002, Schafer and Bowle 2002). Son proteínas solubles de aproximadamente 125 KiloDalton (KDa) y están formadas por homodímeros donde cada subunidad se une covalentemente a un cromóforo constituido por un tetrapirrol lineal abierto denominado fitocromobilina (Montgomery and Lagarias 2002). Puntualmente, la molécula del fitocromo posee dos regiones funcionales principales: 1) la región amino-terminal, que es el sensor de la señal y 2) la región carboxi-terminal o de transducción de la señal (Quail 2002). El dominio N-terminal es responsable de la unión al cromóforo, de la absorción de la luz y de la fotorreversibilidad (~70 kDa). El dominio C-terminal (~55 kDa) contiene varios subdominios/motivos conservados, incluyendo la secuencia reguladora core - 14 - (Quail box), dos motivos de dimerización y el dominio HKRD (Histidine Kinase-Related Domain). La excitación del cromóforo modifica la

configuración de la proteína, alterando su capacidad de acción biológica. Los fitocromos son sintetizados en oscuridad en la forma conocida como Pr y son biológicamente inactivos. Cuando el Pr absorbe luz roja (660 nm) se produce una fotoconversión que le permite adquirir actividad biológica, forma conocida como Pfr, encargada de promover procesos fundamentales para el desarrollo fotomorfogénico. Una vez activado, se produce un cambio conformacional en el cromóforo y los phys migran hacia el interior del núcleo activando las respuestas. phyBPfr migra del citosol al núcleo y, una vez allí, ejerce su función biológica. De manera inversa, cuando los phys absorben luz RL (730 nm) el equilibrio se desplaza hacia la forma inactiva, Pr (Figura 1.3).

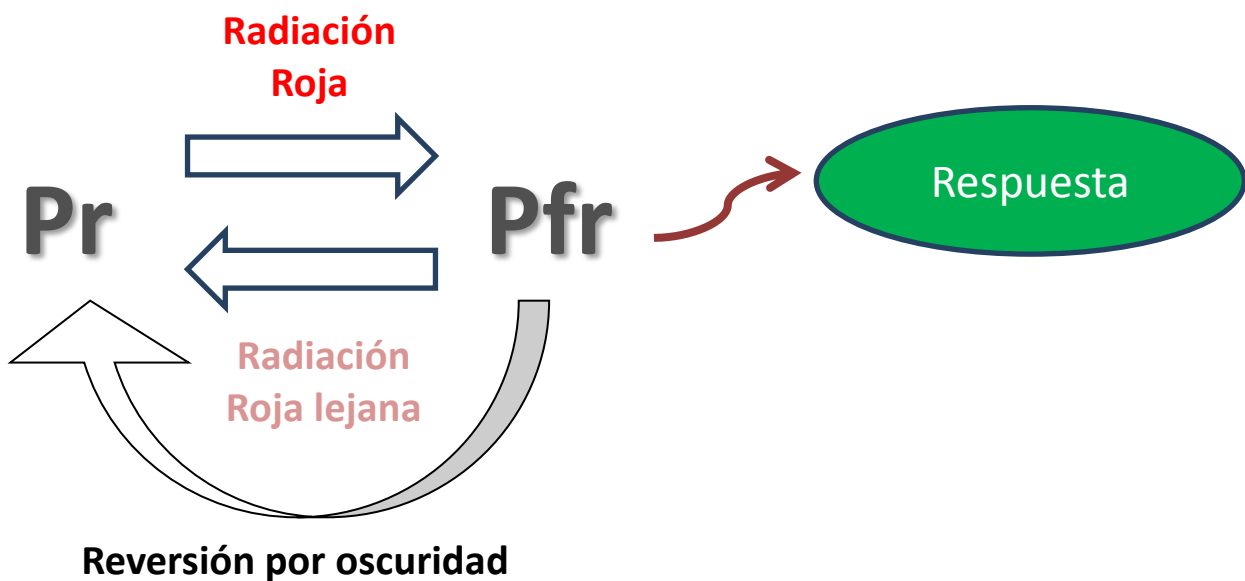


Figura 1.3: Fotoconversión de los fitocromos. Los fitocromos presentan dos formas fotoconvertibles, Pr y Pfr. La forma Pr es biológicamente inactiva y bajo la absorción de fotones rojos se convierte a Pfr, biológicamente activa. De la misma manera, cuando Pfr absorbe luz rojo lejana se vuelve a su forma inactiva, Pr.

Las plantas frecuentemente crecen en ecosistemas complejos, debiendo competir con otras plantas por el acceso a la luz solar. Por eso, poseen mecanismos de ajuste que les permiten detectar la presencia de plantas vecinas y efectuar cambios en su morfología que optimizan la captura de radiación. La luz que incide sobre las plantas es parcialmente absorbida, reflejada y transmitida. Como mencioné anteriormente, en canopeos densos se produce una disminución significativa en la relación R/RL de la luz que recibe, ya que la mayor parte de los fotones de R son absorbidos por plantas vecinas. La reducción de la relación R:RL como indicadora de competencia, inactiva al phyB al convertir buena parte de las moléculas de fotoreceptor en su forma inactiva (Pr). La inactivación de phyB produce la aparición de una respuesta fenotípica conocida como síndrome de escape al sombreado (SAS) (Smith 1982, Ballaré 1999, Franklin 2008, Casal 2013, Pierik and de Wit 2014, Smith and Whitelam 1997). Ésta respuesta es regulada, en parte, por la interacción de los phys activos con factores de transcripción conocidos como PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF) (Leivar and Quail 2011a, Martínez-García et al. 2014). De los 15 PIF existentes, solo 7 interactúan con los fitocromos; estos son: PIF 3, PIF1, PIF 4, PIF 5, PIF 6, PIF7 y PIF8 (Ni et al. 1999, Huq and Quail 2002, Huq et al. 2004, Khanna et al. 2004, Oh et al. 2004, Leivar et al. 2008,

Leivar and Quail 2011a). Los restantes factores que conforman la subfamilia no interactúan con los phys o aún no se ha comprobado su participación. El Pfr activo se une a los PIF y produce la fosforilación y posterior degradación de los mismos, salvo PIF7 que a pesar de ser fosforilado, no sufre degradación en presencia de Pfr (Li et al. 2012, Zhang et al. 2013). Una vez inactivado por RL, phyB no interactúa con los PIF, lo que permite la acumulación de proteína PIF que regula la transcripción de genes diana moduladores de SAS. Particularmente, PIF4, PIF5 y PIF7 son reguladores positivos de las respuestas SAS (Pierik and de Wit 2014).

El SAS se caracteriza por aumentos en la tasa de alargamiento de los tallos y peciolos; aumento en el ángulo de inserción foliar y otras modificaciones en la morfología de la planta que le permiten aumentar su capacidad para competir por la luz en canopeos densos (Franklin and Whitelam 2005, Ballaré 2009). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones phyA limita la expresión de SAS (Smith 1992, 1995). Es sabido que el phyA controla funciones tales como: germinación de las semillas, desetiología y percepción de transiciones de oscuridad/luz (Casal et al. 1998, Ballaré 2009). Existe una cierta redundancia entre los demás fitocromos y se cree que phyD y E actúan conjuntamente con phyB en la supresión del escape al sombreado a altas relaciones R:RL (Franklin 2008, Casal 2013).

1.3 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una angiosperma de pequeño tamaño, dicotiledónea de ciclo anual, que pertenece a la familia de las brassicáceas (Brassicaceae). Se distribuye a través de Europa, Asia y América del Norte y es una especie salvaje que a lo largo de los años se ha ido adaptando a un amplio rango de zonas geográficas diferentes y, por consecuencia, se ha convertido en una fuente importante de variabilidad. Numerosas accesiones (ecotipos) han sido recolectadas y están disponibles para su análisis experimental, las más usadas para estudios moleculares y genéticos son Columbia (Col-0), Landsberg (Ler-0) y Wassilewskija (WS-0). Esta angiosperma posee un ciclo de vida corto, cuya duración es de 6 semanas y abarca desde la germinación de la semilla, la formación de la roseta, la floración hasta la maduración de las semillas.

Arabidopsis se utiliza como planta modelo en la gran mayoría de los estudios de biología molecular vegetal ya que posee varias características favorables, las más destacadas son: su tamaño pequeño, ciclo de vida corto, se cultiva fácilmente en ambientes distintos (cámaras de cultivo con luz artificial) y sobre todo, posee un genoma muy pequeño secuenciado completamente y una gran cantidad de líneas mutantes (Meinke 1998, Bevan 2005, Koornneef 2010).

1.4 Defensas en las plantas

En la naturaleza las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos (hongos, bacterias y virus) y herbívoros (vertebrados, artrópodos, etc.). Los mecanismos de defensa constitutivos forman una primera barrera frente al ataque de patógenos y herbívoros. Estos sistemas operan en forma constante en la planta y se basan en el uso de estrategias químicas (p. ej., sustancias tóxicas, enzimas inhibitoras, proteínas antifúngicas) y estructurales (p. ej., espinas, cutícula impermeable, tricomas) (Wittstock and Gershenzon 2002, Tian et al. 2012, Jaime et al. 2013). Si estas barreras iniciales de defensa se rompen, las plantas dependen de un sistema complejo y altamente regulado de respuestas inducibles que se activan sólo cuando la planta es atacada. En el caso de los mecanismos de defensa frente a insectos, existen dos tipos

diferentes de defensas inducibles: la directa y la indirecta. La primera involucra la producción coordinada de metabolitos secundarios y proteínas de defensa cuyo efecto es repeler o matar al organismo que ataca a la planta (Walling 2000, Kessler and Baldwin 2001, 2002a, Mewis et al. 2005, Heil 2008, Ballaré 2009, Cheynier et al. 2013). Las indirectas se basan en la liberación de compuestos volátiles, que atraen predadores y parasitoides que atacan a los invasores (Schoonhoven et al. 2005, Heil 2008, Arimura et al. 2009, Dicke 2009).

La expresión de estas defensas inducidas es coordinada por hormonas sintetizadas por las plantas afectadas. Las principales hormonas que controlan los mecanismos de defensa son el ácido salicílico (SA), el JA y el etileno (ET) (Ballaré 2014, Pieterse et al. 2014). La activación de la síntesis y señalización por medio de cada una de estas hormonas ocurren en respuesta al reconocimiento del tipo de atacante involucrado y de la duración e intensidad del ataque. Los patógenos biótrofos se alimentan de células vivas, no matan la planta y son más sensibles a las respuestas inducidas por SA (Glazebrook 2005, Howe and Jander 2008) mientras que los necrótrofos (matan a la célula infectada y los tejidos mueren) y los insectos herbívoros son más sensibles a las defensas mediadas por el JA / ET (Kessler and Baldwin 2002b, Koornneef and Pieterse 2008, Ballaré 2011, Zhu et al. 2011, Thaler et al. 2012, Zhu 2014).

Las defensas inducidas protegen a las plantas contra un amplio espectro de enfermedades y plagas pero también puede conllevar costos debido a: la asignación de recursos para la síntesis de moléculas de defensa, la toxicidad que los productos generan al propio metabolismo de la planta y porque pueden afectar interacciones benéficas con otros organismos (Heil and Baldwin 2002). Es por lo tanto razonable asumir que las plantas expresan su defensa inducible sólo si las ventajas (la protección contra los atacantes) pesan más que los gastos.

Durante el ciclo de vida de plantas, el compromiso entre el crecimiento y la defensa es indispensable para optimizar la asignación de recursos en respuesta a varias señales del desarrollo y desafíos del entorno. La inversión de defensa contra herbívoros y patógenos, por lo general, reduce la cantidad de recursos disponibles para el crecimiento. Para mediar el equilibrio entre el crecimiento y la defensa, las plantas han desarrollado varios mecanismos de adaptación entre los cuales las hormonas juegan un papel fundamental (Glazebrook 2005, Zhu et al. 2011, Pieterse et al. 2012, Thaler et al. 2012).

1.5 ¿Crecer o defenderse?

El costo de las respuestas de defensa puede medirse como una reducción en la aptitud (supervivencia, producción de semillas) de la planta en ausencia de herbívoros, la que es consecuencia de una producción de niveles elevados de protección (Cipollini et al. 2002, Cipollini 2004). Estos costos generalmente, se producen por la reasignación de recursos que las plantas inducen ante determinadas situaciones. La asignación de recursos a la competencia puede limitar la disponibilidad de los mismos para ser invertidos en defensa (Agrawal 1998, Baldwin 1998, Cipollini et al. 2002).

En los últimos años, se ha demostrado que las plantas que expresan fenotipo SAS, al ser expuestas a bajas relaciones R:RL, poseen sus defensas disminuidas y son más susceptibles al ataque de patógenos e insectos. Por ejemplo, estudios con orugas de *Manduca sexta* mostraron que éstas crecían mejor cuando se alimentaban sobre plantas

de *Nicotiana* expuestas a bajas relaciones R:RL que cuando lo hacían sobre plantas expuestas a luz solar (Izaguirre et al. 2006). Moreno et al. (2009), demostraron que las larvas de *Spodoptera frugiperda* ganaban más peso cuando se alimentaban de plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en canopeos densos que cuando eran alimentadas con plantas cultivadas en canopeos abiertos. Efectivamente, la competencia ya sea por presencia de vecinas o simulada con suplementación de RL o inactivación de phyB por mutación, torna a las plantas más susceptibles a la herbivoría y el ataque de patógenos necrótros (Izaguirre et al. 2006, Moreno et al. 2009, Cerrudo et al. 2012).

Estudios recientes también han demostrado que la exposición de las plantas a luz RL induce una disminución de la transcripción de genes de defensa, incluidos los genes de respuesta a JA (Moreno et al. 2009, Cerrudo et al. 2012, de Wit et al. 2013) e inhibe la acumulación de compuestos fenólicos, entre otros metabolitos secundarios (Moreno et al. 2013). La información disponible sugiere que las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos que les permiten optimizar las decisiones entre dos alternativas generales: asignar recursos al crecimiento y la competencia o defenderse mediante la asignación de más recursos a la defensa. Este compromiso de asignación de recursos es a menudo conocido como el "dilema de las plantas" (Herms and Mattson 1992, Cipollini 2004, Howe and Jander 2008, Ballaré 2009, Ballaré 2011). Desde el punto de vista agronómico, las respuestas que las plantas presentan frente a este compromiso son de gran interés ya que pueden afectar la expresión del sistema de defensa en cultivos sembrados a alta densidad.

1.6 Jasmonatos

Los JAs son hormonas requeridas para la regulación de numerosos aspectos fisiológicos del crecimiento y de la inducción de resistencia frente al ataque de insectos y patógenos necrótros (Kessler and Baldwin 2002b, Browse and Howe 2008, Ballaré 2009, Chung and Howe 2009). En los últimos años, numerosos estudios han documentado que los JAs son moléculas claves para la activación de defensas y, además, son reguladores negativos del crecimiento, inhibiendo la fotosíntesis, la división celular y el crecimiento de la raíz (Yan et al. 2007, Zhang and Turner 2008, Browse 2009, Chung and Howe 2009).

El primer paso en la biosíntesis de JA se produce en la membrana de los cloroplastos, donde los lípidos son clivados por lipasas para generar ácido α -linoleico. La oxigenación de este último por acción de la 13-lipooxigenasa (LOX) lo convierte en ácido 13-hidroperoxylinolenic (13-HPOT). Luego, la Aleno Óxido Sintasa (AOS) y la Aleno Óxido Ciclasa (AOC) catalizan las reacciones secuencialmente para originar el ácido 12-oxo-fitodienóico (OPDA), principal precursor de los jasmonatos (Feussner and Wasternack 2002). OPDA es trasladado a los peroxisomas y reducido por la enzima ácido oxo-fitodienóico reductasa 3 (OPR3) para formar oxo-2 (2-pentenyl) ciclopentano-1- ácido Octanoico (OPC-8: 0), que es activado por la ligasacarboxyl-CoA. Posteriormente, este compuesto es sometido a tres ciclos de β -oxidación para producir el ácido jasmónico. Finalmente, es conjugado con distintos aminoácidos, siendo el más importante la iso-leucina que da origen a la Jasmonil-isoleucina (JA-Ile), la forma bioactiva del ácido jasmónico (Thines et al. 2007, Fonseca et al. 2009, Shyu and Brutnell 2015) (Figura 1.4).

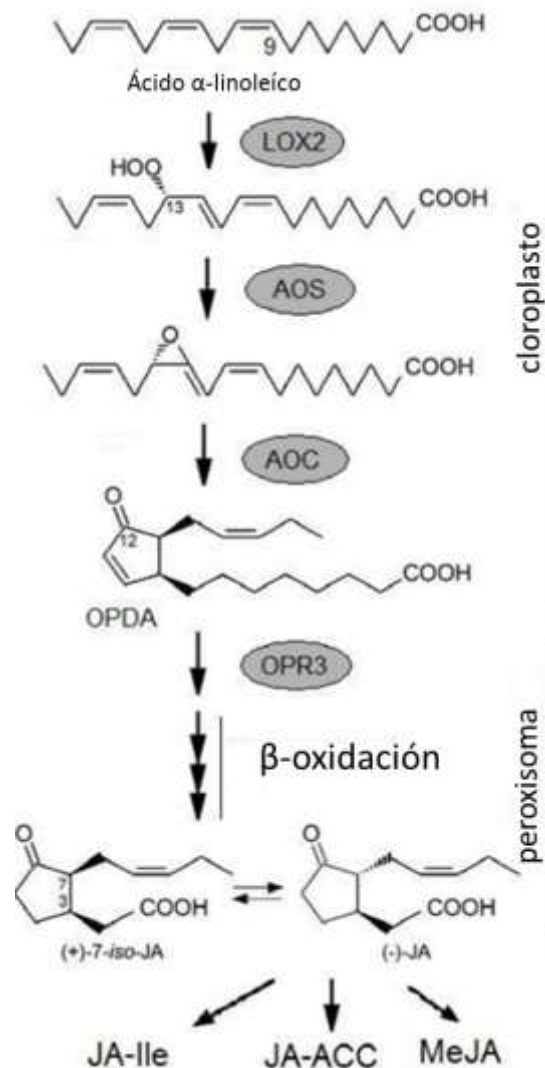


Figura 1.4: Biosíntesis de JA en *Arabidopsis thaliana*. LOX: lipooxigenasa; AOS: Allen Oxidante Sintetasa; AOC: Allen Oxidante Ciclasa; OPDA: ácido 12-oxo-fitodienílico; OPR3: ácido oxo-fitodienícoreductasa 3; JA: Jasmonato; JA-Ile: Jasmonyl-isoleucina; JA-ACC: ácido Jasmonyl- 1-aminociclopropano-1-carboxílico; MeJA: Metil-Jasmonato. Adaptado de Delker et al. (2006).

Recientemente, se han hecho avances muy importantes en el entendimiento de los mecanismos de percepción de los JAs (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Yan et al. 2007, Pauwels and Goossens 2011). La activación de la vía JA ocurre en respuesta a la degradación de las proteínas represoras JAZ. En ausencia de JA, los genes de respuesta a JA están reprimidos debido a la interacción de los factores de transcripción (FT) relevantes con las proteínas JAZ, las cuales controlan la expresión de genes a través de su interacción con el adaptador NINJA y las proteínas co-represoras TPL (Figura 1.5 a) (Pauwels et al. 2010). En presencia de JAs bioactivos, producidos en respuesta al ataque de herbívoros y patógenos necróticos, las proteínas JAZ interactúan vía su dominio Jas con la ubiquitin-ligasa SCF^{COI1} (lo que las marca para su degradación en el proteasoma 26S) y así se des-reprime la transcripción de los genes de respuesta (Figura 1.5b) (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Ballaré 2011, Pauwels and Goossens 2011). COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1) actúa como una proteína F-

box; estas proteínas reconocen una proteína target que es ubiquitinizada y dirigida para ser degradada por el proteosoma (Xie et al. 1998).

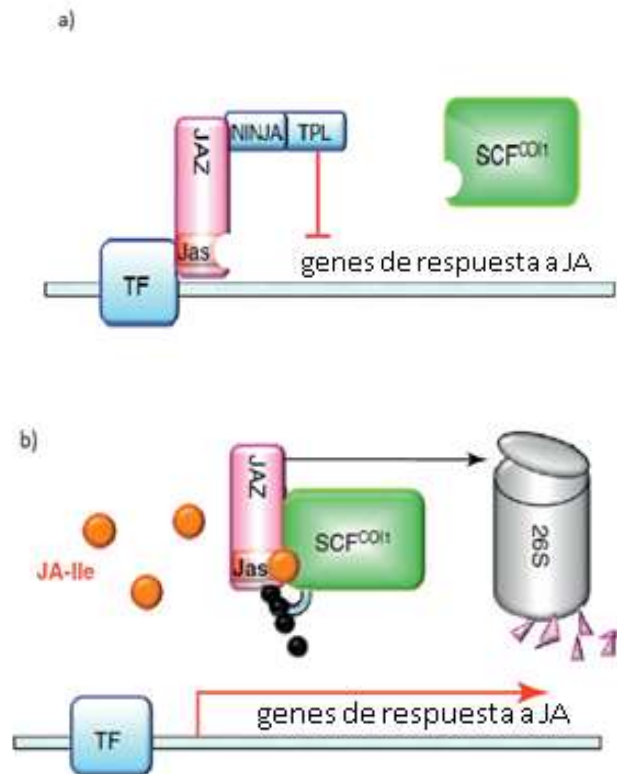


Figura 1.5: Activación de la vía JA. a) la transcripción de genes de defensa es reprimida por la interacción de ciertos factores de transcripción con las proteínas JAZ, que controlan la expresión interaccionando con el adaptador NINJA y las proteínas corepresora TPL. b) En presencia de la hormona bioactiva (JA-Ile, círculos naranjas) las proteínas JAZ interactúan a través de su dominio Jas con la ubiquitin-ligasa SCF^{COI1} marcándolas para su destrucción. Adaptado de Ballaré (2011).

La familia de proteínas JAZ está compuesta por 13 miembros (JAZ1-JAZ13) en *Arabidopsis thaliana*, con estructura similar: un dominio C-terminal que posee el motivo Jas, un dominio conservado ZIM responsable de la dimerización de JAZ y la interacción con NINJA y un dominio N-Terminal, poco conservado (Chung and Howe 2009, Pauwels and Goossens 2011) (Figura 1.6). El motivo Jas es importante para la interacción con COI1 y con los factores de transcripción MYC (reguladores positivos de la señalización JA) (Chini et al. 2007, Yan et al. 2007). Esta secuencia es requerida para degradar a las proteínas JAZ bajo la percepción de la JA-Ile (Chini et al. 2007, Yan et al. 2007, Chung and Howe 2009). JAZ13 se diferencia del resto porque posee un represor no reconocido previamente en ninguna de las 12 JAZ restantes conocidas en *Arabidopsis*. El gen JAZ13 está más estrechamente relacionado con JAZ8 e incluye un motivo ZIM y un motivo Jas pero a diferencia de JAZ8, JAZ13 contiene un sitio de fosforilación (cola C-terminal rica en Serinas) (Thireault et al. 2015).

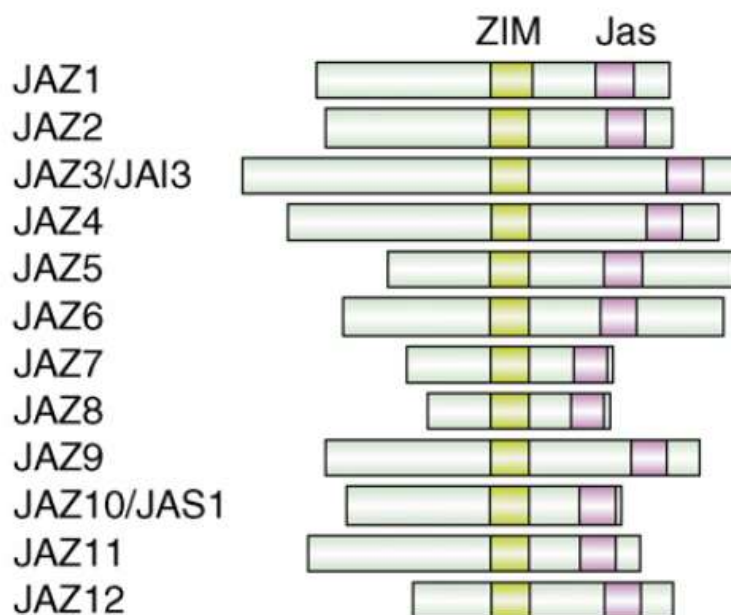


Figura 1.6: Familia de proteínas JAZ. Se muestra el tamaño relativo de cada JAZ y sus respectivos dominios. En amarillo el dominio conservado ZIM y en violeta el Jas. Adaptado de Staswick (2008).

La señalización JA está mediada por múltiples factores de transcripción, por la formación de homo- y hetero-dímeros, por el *splicing* alternativo que sufren los genes que codifican algunas de las proteínas JAZ y por la estabilidad diferencial de las JAZs (Chung et al. 2010, Kazan and Manners 2012, Shyu et al. 2012). A través del proceso de *splicing* se generan variantes de una misma proteína con distinta funcionalidad; este proceso aumenta la actividad represora y la diversidad funcional en la familia JAZ. De JAZ10 se conocen tres variantes de *splicing* que se caracterizan por interactuar con mayor o menor afinidad con el receptor COI1. Las tres variantes poseen un motivo Jas C-terminal truncado. La variante de *splicing* JAZ10.1 se une fuertemente a COI1 en presencia de JA-Ile, mientras que la isoforma JAZ10.3 lo hace débilmente y la JAZ10.4 (que carece del dominio Jas) simplemente no interactúa. Las variantes de *splicing* ejercen su rol atenuando la respuesta a JA (Yan et al. 2007, Chung and Howe 2009, Moreno et al. 2013) y también podrían atenuar las defensas mediadas por JA en condiciones ambientales que prioricen el crecimiento por sobre las defensas (Cerrudo et al. 2012, Yang et al. 2012).

1.7 Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son una clase de hormonas diterpenoides tetracíclicas que juegan un papel esencial en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de la planta. Las GAs son hormonas esenciales para muchos procesos de desarrollo en las plantas, como por ejemplo: germinación de las semillas, la elongación del tallo, la expansión de las hojas, el desarrollo de los tricomas, la maduración del polen y la inducción de la floración (Olszewski et al. 2002, Achard and Genschik 2009). Un regulador clave de la vía de señalización GA son las proteínas nucleares DELLAs, represoras del crecimiento (Peng et al. 1997, Silverstone et al. 1998, Dill and Sun 2001). Las GAs promueven la interacción de su receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) con las proteínas DELLAs. La unión de GA a GID1 promueve la interacción entre este último y el dominio N-terminal de las DELLAs (Willige et al.

2007) aumentando la afinidad de las DELLAs y una E3 ligasa que promueve la ubiquitinización y subsecuente degradación por el proteosoma 26s (Sasaki et al. 2003, Fu et al. 2004, Griffiths et al. 2006, Willige et al. 2007, Murase et al. 2008, Sun 2011). Con las DELLAs degradadas, los PIF (y otros factores de transcripción) quedan liberados de la represión y las GAs promueven libremente el crecimiento y otras respuestas a GA (McGinnis et al. 2003, Achard et al. 2007).

El genoma de *Arabidopsis* codifica para cinco proteínas pertenecientes a esta familia represora: GA-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA), RGA-LIKE1 (RGL1), RGL2, y RGL3 y todas muestran un dominio N-terminal así como un dominio C-terminal GRAS conservado. Distintos análisis genéticos han demostrado que las cinco actúan de forma distinta pero sinérgica; GAI y RGA reprimen la elongación del tallo, reprimen el crecimiento de la raíz y retrasan la floración (Dill and Sun 2001, Fu and Harberd 2003); RGL2 inhibe la germinación (Lee et al. 2002); RGL 2 y RGA juntas regulan el desarrollo floral (Cheng et al. 2004, Tyler et al. 2004, Yu et al. 2004, Hou et al. 2008) y RGL3 regula positivamente la resistencia mediada por JA a *Botrytis cinérea* (Michael Wild et al. 2012).

1.8 GA y JA

Estudios recientes han revelado interacciones intensas entre las vías de señalización de JA y GA (Navarro et al. 2008, Hou et al. 2010, Wild and Daviere 2012, Yang et al. 2012). Las proteínas DELLAs, conocidos represores de la señalización de GAs, han sido reportadas como reguladores positivos de las respuestas a JA, tal que mutantes *cuádruples della* presentaron mayor susceptibilidad a patógenos necrótrofos, y mutantes *gail*, con la proteína GAI1 estable, una mayor resistencia (Navarro et al. 2008). En plantas de *Nicotiana attenuata*, elevadas concentraciones de JA tienen un efecto negativo sobre la biosíntesis de GA en los tallos, inhibiendo el crecimiento (Heinrich et al. 2013). En varios mutantes de *Arabidopsis*, en los que las proteínas DELLAs están estabilizadas, los genes de respuesta a JA son hipersensibles al tratamiento con JA, ocasionando una mayor inhibición del crecimiento.

Hou et al. (2010) en su trabajo propuso el “modelo liberador” para describir como las proteínas DELLAs modulan/afectan la señalización JA a través de una competencia para unirse a las proteínas JAZs (Figura 1.7). Los JAs promueven la desestabilización de las proteínas JAZ que interactúan físicamente con los factores de transcripción MYC (activadores de las respuestas a JA) (Figura 1.7 a). En ausencia de GAs, las proteínas DELLAs compiten con los MYC para unirse a las JAZs, las cuales liberan a MYC2 y permite la expresión de las respuestas JA. Cuando aumentan los niveles de GA, las proteínas DELLAs son degradadas y las JAZ son liberadas para interactuar con MYC2, así la actividad de MYC es reprimida y, por lo tanto, la señalización JA también. (Figura 1.7b). Hay evidencia que la sobreexpresión de proteínas RGL3, aumenta la expresión de genes inducidos por MYC mientras que la mutación *rgl3* reduce la misma (Wild and Daviere 2012). La interacción física entre ambas proteínas represoras, DELLA y JAZ, cumple un rol preponderante en la regulación del entrecruzamiento entre las vías de crecimiento y defensa (Figura 1.7).

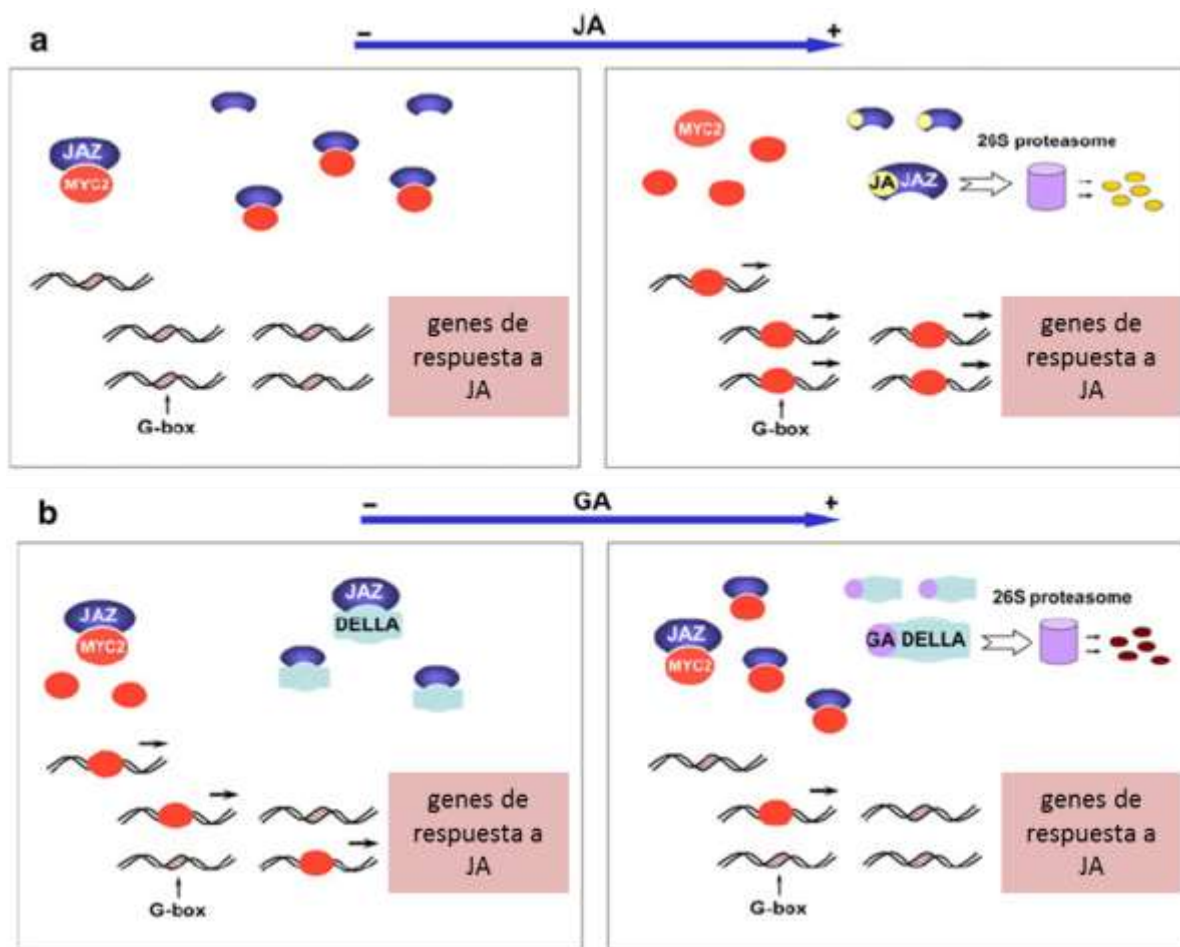


Figura 1.7: Las proteínas DELLAs modulan la expresión de genes inducidos por JA. (a) niveles elevados de JA desestabilizan a JAZ y así MYC induce la expresión de genes de respuesta a JA. b). GA modula las respuestas a JA mediante la interacción de JAZ y DELLAs. Sin GA, las DELLAs estabilizadas se unen a JAZ liberando a MYC para activar los mecanismos de defensa. Con el agregado de GA, las DELLAs son degradadas y JAZ es liberado para interactuar con MYC y reprimir su actividad. Adaptado de Hou et al. (2013).

Más específicamente, las proteínas JAZ interactúan con los dominios GRAS de las proteínas DELLA, bloqueando la interacción de las DELLAs con los PIF y promoviendo el crecimiento inducido por GA (Yang et al. 2012). En respuesta a patógenos o insectos herbívoros, la degradación de las proteínas JAZ permite que las DELLAs interactúen e inhiban la acción de los PIF y, por lo tanto, el crecimiento es cohibido (Figura 1.8) (Kazan and Manners 2013).

Como mencione recientemente, es importante destacar que la interacción entre las proteínas JAZ y DELLAs pueden también afectar la capacidad de las DELLAs de reprimir los PIF (Yang et al. 2012), que son FT involucrados en la promoción del crecimiento (Lorrain et al. 2008, Leivar and Quail 2011b). De este modo, la interacción entre JAZ y DELLA podría influir sobre las respuestas de tipo SAS, las que dependen de la actividad de PIFs. Existe evidencia que, en respuesta a bajas relaciones de R/RL, las proteínas DELLAs, son etiquetadas para su degradación, presumiblemente como consecuencia de un aumento de producción de GAs (Djakovic-Petrovic et al. 2007). La interacción entre las proteínas DELLAs y JAZs, represoras de las vías GA y JA respectivamente, podría jugar un papel fundamental en la mediación del equilibrio entre el crecimiento y la defensa que las plantas activan en respuesta a las señales de su

entorno (Figura 1.8) (Hou et al. 2010, Heinrich et al. 2013, Hou et al. 2013, Ballaré 2014).

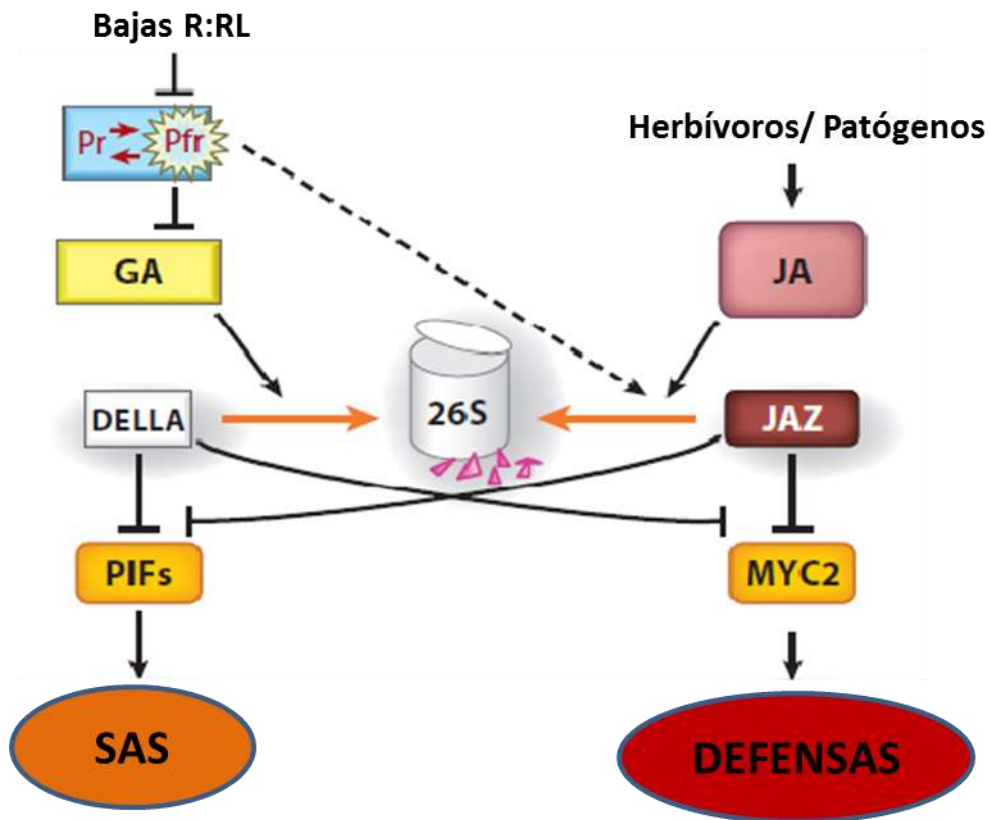


Figura 1.8: Efectos de las bajas relaciones R:RL sobre la vía de los JAs. Las bajas relaciones R:RL, actuando a través del phyB, disminuyen las defensas inducidas por JA regulando el balance entre los represores JAZ y DELLA. Las bajas relaciones R:RL aumentan la actividad de las GA, aumentarían la degradación de las proteínas DELLAs y promueven la expresión de SAS. Cuando se activa la vía JA por infecciones con patógenos o ataque de insectos herbívoros, se produce la biosíntesis de JA provocando la degradación de los represores JAZ en el proteosoma 26S. La unión de DELLAs y JAZs perjudica la capacidad de ambas de interactuar con sus factores de transcripción target. Las bajas proporciones R:RL aumentan la expresión de SAS y disminuyen las defensas. Las flechas indican las interacciones positivas; PIF: *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR*; Pfr: forma activa de phyB; Pr: forma inactiva de phyB. Adaptado de Ballaré (2014).

1.9 Objetivos e hipótesis de trabajo:

El objetivo general de esta tesis fue avanzar en la comprensión de los mecanismos por los cuales los fitocromos (fundamentalmente phyB) modulan la respuesta de las plantas a los JAs y la expresión de su sistema de defensa. Particularmente, nos enfocamos en la región R:RL del espectro solar debido a la importancia que reviste como señal de competencia afectando el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Los objetivos específicos que nos planteamos abordar fueron:

- Evaluar la generalidad del efecto del RL como represor de respuestas a JA.
- Caracterizar los efectos de cambios en la relación R:RL sobre la estabilidad de las proteínas JAZ y las proteínas DELLAs, estudiar los mecanismos involucrados y establecer su significado funcional.
- Definir qué papel juegan las GA, en la disminución de la sensibilidad a JA causada por la inactivación de phyB.

Sobre la base de los resultados obtenidos previamente en el laboratorio planteamos las hipótesis que se describen a continuación:

Hipótesis 1: la de-sensibilización de los tejidos frente a JA está mediada principalmente por la inactivación del phyB pero involucraría la participación de otros fitocromos estables (phyD y phyE). Se comparará la sensibilidad a JA entre mutantes simples de phyB y triples mutantes (phyBDE).

Hipótesis 2: la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra un aumento de la degradación de las proteínas DELLA. Se evaluará el efecto de bajas relaciones R:RL sobre la sensibilidad a JA en mutantes *della* (tanto mutantes nulos como de ganancia de función, como *gail*) y el efecto de bajas relaciones R:RL sobre la degradación de las proteínas de interés.

Hipótesis 3: la de-sensibilización de los tejidos a JAs, generada por las bajas relaciones de R:RL, involucra la estabilización de las proteínas JAZ. Evaluaremos la estabilidad de JAZ10 en plantas que expresan el gen *JAZ10* bajo un promotor constitutivo y unido al gen reportero *GUS* (*35S:JAZ10-GUS*).

Hipótesis 4: la de-sensibilización de los tejidos frente a JA podría involucrar la estabilización de otras proteínas JAZ. Buscaremos estudiar si efectos parecidos ocurren con otras proteínas JAZ, ya que un efecto diferencial de bajas relaciones R:RL sobre diferentes miembros de la familia JAZ podría esclarecernos el mecanismo por el que el phyB modula la estabilidad de estas proteínas.

Hipótesis 5: la de-sensibilización de los tejidos a JA podría involucrar un efecto directo de las GAs sobre la estabilidad de las proteínas JAZ. Evaluaremos si el efecto de las GAs es similar al de las bajas relaciones R:RL sobre la estabilización de las JAZ y si el efecto del RL es suprimido en plantas tratadas con PAC (inhibidor de la síntesis de GA).

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Material vegetal

En estas tesis se utilizó *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental. Se emplearon distintos genotipos con alteraciones específicas en las vías de señalización lumínica y hormonal que se detallan a continuación:

Genotipo	Fondo (background)	Descripción
Col-0	Col-0	Salvaje
Ler-0	Ler-0	Salvaje
Co	Co	Salvaje
<i>coi1</i>	Col-0	Mutante del receptor COI1
OXJAZ10.4	Col-0	Suplementada con JAZ10.4
<i>phyB9</i>	Col-0	Mutante de PHYB
<i>phyBDE</i>	Co	Mutante de PHYB, D, E
<i>4xdella</i>	Ler-0	Mutante de las proteínas GAI1 , RGA, RGL1 y RGL2
<i>5xdella</i>	Ler-0	Mutante de las proteínas GAI1 , RGA, RGL1, RGL2 y RGL3
<i>rgl3.3</i>	Col-0	Mutante de la proteína RGL3

Cuadro 2.1 Detalles de las semillas utilizadas en la tesis.

Continuación cuadro 2.1: Detalles de las semillas utilizadas en la tesis.

Genotipo	Fondo (background)	Descripción
<i>gai1</i>	Ler-0	Mutante de la proteína <i>gai1</i> (ganancia de función)
35S::JAZ1GUS	Col-0	Sobre-expresante de la proteína JAZ1
35S::JAZ10GUS	Col-0	Sobre-expresante de la proteína JAZ10
<i>jaz10.1</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ10
ARNi7	Col-0	Mutante de JAZ10 (por silenciamiento)
<i>jaz8</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ8
<i>Ja9.1</i>	Col-0	Mutante de la proteína JAZ9
<i>jaz10phyB9</i>	Col-0	Doble mutante de las proteínas JAZ10 y PHYB

Cuadro 2.1: Detalles de las semillas utilizadas en la tesis.

2.2 Esterilización de las semillas

La esterilización de las semillas se realizó mediante el método de fase-vapor. Para ello se incubaron entre 50-70 semillas por microtubo, en un ambiente herméticamente cerrado y dentro de la campana, en un recipiente con la mezcla de 20 mililitros (ml) de lavandina concentrada (55 gramos/Litro) y 10 ml de HCl 1M (Molar). Con esta mezcla se produce la liberación de gas cloro a partir del hipoclorito que permite la esterilización superficial de las semillas. La incubación con gas cloro se realizó durante 3-4 h. Luego los microtubos fueron ventilados en el flujo laminar para evitar su posterior contaminación.

2.3 Germinación de las semillas

Las semillas fueron germinadas en frascos de vidrio (en cuya tapa poseen filtros para evitar posibles contaminaciones y permitir el intercambio gaseoso) con un medio sólido de *Murashige and Skoog* (MS) 50%, sacarosa 1,5% masa/Volumen (m/V), agar 0,7% m/V (Figura 2.1). Una vez sembradas las semillas se incubaron en oscuridad a 4°C durante 48 horas (hs), luego se les dio un pulso de luz roja durante 30´ (minutos)-1 h para inducir y sincronizar la germinación y, finalmente fueron transferidas a una cámara de cultivo.



Figura 2.1: Fotografía de los frascos donde crecen las plantas in vitro. Frascos de vidrio en cuya tapa poseen filtros para evitar posibles contaminaciones y permitir el intercambio gaseoso. Adentro poseen el medio sólido donde se siembran las semillas.

2.4 Manipulaciones del ambiente lumínico

Las plantas se cultivaron en cámara de cultivo en fotoperiodo de día largo (14 h de luz y 10 h de oscuridad) durante 14 días y a los 7 días de germinadas fueron alineadas frente a lámparas incandescentes, con ó sin filtros de RL (Figura 2.2). En un ensayo típico se utilizaron 2 niveles de RL (con/sin R: RL) (Izaguirre et al. 2006, Moreno et al. 2009).

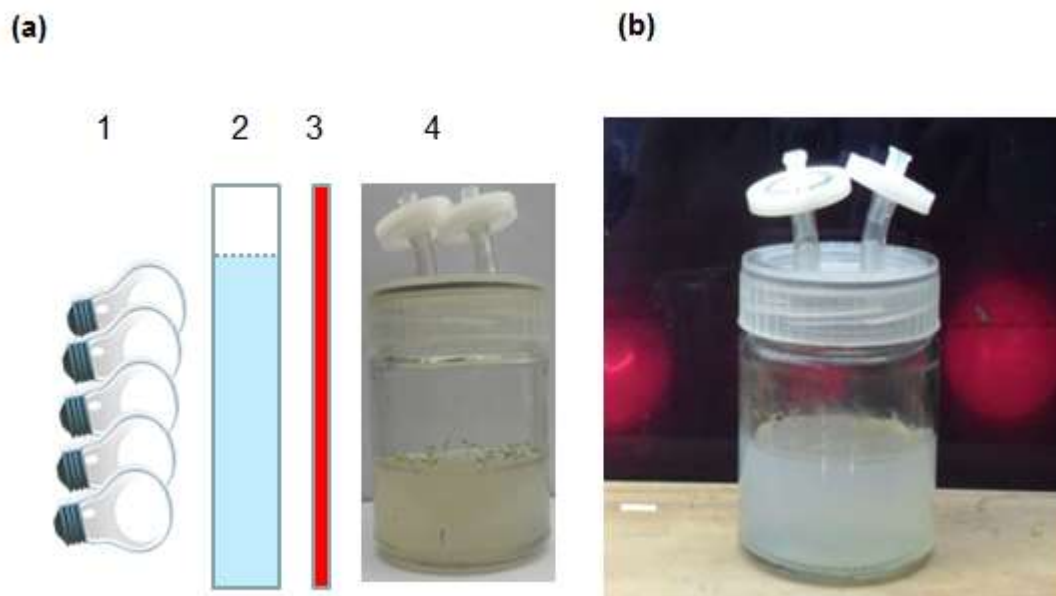


Figura. 2.2: Manipulación del ambiente lumínico. **(a)** Diagrama experimental de la disposición de los filtros de RL: 1) bulbos de luz incandescentes 2) filtro de agua para evitar la acumulación de calor generada por las lámparas 3) filtro de RL para remover la luz visibles 4) frascos de vidrio con plantulitas creciendo. **(b)** Frasco de vidrio con plántulas creciendo, expuestas a bajas relaciones de R:RL (barra=1cm) Leone et al. (2014).

Para poner a prueba las distintas hipótesis planteadas se realizaron distintos experimentos combinados con un diseño completamente aleatorizado, siendo típicamente, en la mayoría de los experimentos, los factores a analizar: la calidad de luz (relación R: RL) y la sensibilidad a JA. En algunos casos se evaluó el genotipo de *Arabidopsis thaliana* como factor.

2. 5 Tratamientos hormonales

En los casos en que se evaluó específicamente las respuestas a JA y GA, las plantas fueron tratadas con un rango de concentraciones de estas hormonas. Los tratamientos se realizaron colocando una solución que contenía la hormona sobre el medio sólido en donde se encontraban creciendo las plantas para luego medir las variables deseadas. En la mayoría de los experimentos las plantas de 7 días de edad fueron alineadas frente a lámparas incandescentes, con ó sin filtros de RL, a los 2 días se agregó MeJA al medio de cultivo y se prosigió con el tratamiento de RL por 3 días más para luego cosecharlas (Figura 2.3).

Las plántulas de *A. thaliana*, de 9 días de edad cultivadas en MS fueron embebidas con una solución acuosa de 20-50 μM MeJA (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wi, USA). Para facilitar la disolución del MeJA las soluciones fueron preparadas con etanol absoluto en una concentración de 4 % en agua MilliQ esterilizada por autoclavado. Las plantas control se embebieron con una solución acuosa de etanol absoluto 4%. En los experimentos se adiciono 800 μL de una solución 20-50 μM MeJA esterilizado por filtración, mientras que a los controles se les agrego 1 ml de agua estéril. Luego, a diferentes tiempos post-inducción, las plántulas fueron cosechadas e

inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido para la realización de posteriores estudios.

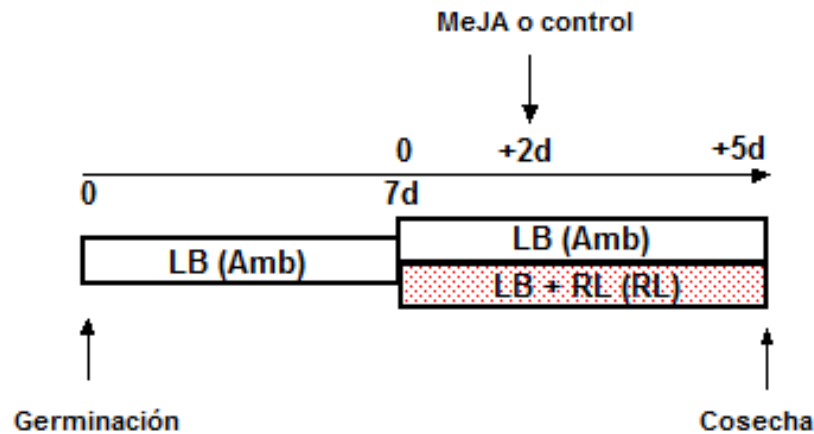


Figura 2.3: Esquema representativo donde se muestra como fueron desarrollados los experimentos. Las plantas fueron crecidas bajo luz blanca (LB) ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 7 días y luego fueron expuestas a los tratamientos de LB o RL (Rojo Lejano) durante 5 días; en el día 3 de tratamiento se agregó MeJA al medio donde estaban creciendo. Finalmente, fueron cosechadas a los 12 días Leone et al. (2014).

En los experimentos destinados a medir actividad enzimática las plantas fueron crecidas de la misma manera descrita arriba, solo difieren en el tiempo de exposición a RL y el tiempo de incubación con las hormonas (Figura 2.4). En dichos experimentos utilizamos GA (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wi, USA), Paclobutrazol (PAC) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wi, USA) y MeJA, $20\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$, respectivamente.

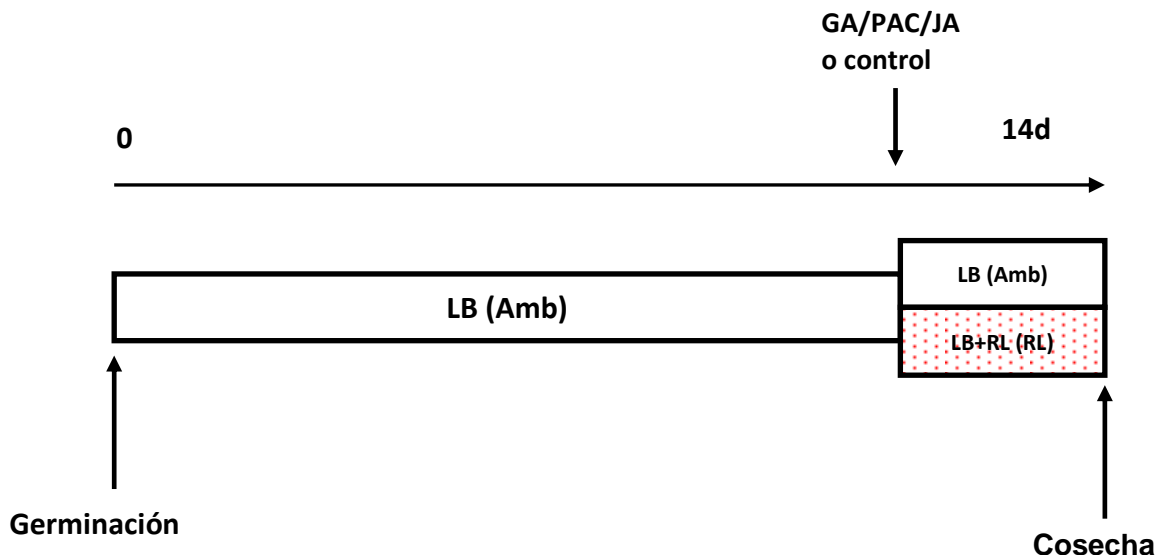


Figura 2.4: Esquema representativo de los experimentos para medir Actividad Enzimática. Las plantas fueron crecidas bajo luz blanca (LB) ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 14día, ese día fueron expuestas a los tratamientos de LB o RL (Rojo Lejano) durante 30' y al mismo tiempo se agregó MeJA/GA/PAC al medio donde estaban creciendo. Finalmente, fueron cosechadas y congeladas a -80°C .

2.6 Medición de largo de hipocotilo y peso fresco

El largo del hipocotilo fue medido con un calibre, al finalizar cada experimento. Para determinar el peso fresco las plántulas fueron cosechadas, apoyadas en una hoja de papel absorbente para sacar el exceso de agua y colocadas en una balanza analítica para precisar el peso en miligramos (mg).

2.7 Extracción y medición de antocianinas y metabolitos secundarios

Para medir los compuestos fenólicos solubles y las antocianinas, las plántulas fueron colocadas en tubos *eppendorf* que tenían en su interior 400 µl de metanol acidificado con HCl en una proporción de 99:1, v/v. Las mismas fueron incubadas a 4°C por 48 h. Posteriormente, se adiciono a cada *eppendorf* 300 µl de agua destilada y 700 µl de cloroformo (Biopack) y se centrifugaron durante 5 min. a 12.500 rpm para separar la clorofila de los compuestos fenólicos (Rabino and Mancinelli 1986, Demkura et al. 2010, Leone et al. 2014). La absorbancia de los extractos fue determinada usando un espectrofotometro (UV1700; Shimadzu, Kyoto, Japan) en base a la absorbancia de los extractos a 305 y 320 nm (fenólicos) y a 530 nm (antocianinas). Los niveles de antocianinas y fenólicos fueron calculados por (mg) de tejido.

2.8 Tinción histoquímica con GUS

La actividad de la β -glucuronidasa (GUS) para medir la estabilidad de productos de 35S::JAZ10-GUS 35S::JAZ1GUS se evaluó colocando plántulas de *Arabidopsis* de 10 días en una solución de tinción GUS (1 mM X-Gluc, 100mM NaPi buffer, pH 7.0, 10mM EDTA y 0.1% (v/v) Triton X-100), tratadas previamente con acetona 90%. Se incubaron *overnight* (ON) a 37°C y posteriormente se decoloraron mediante sucesivos lavados con etanol 70%. Al finalizar se evaluó visualmente la intensidad de la tinción en una lupa y se tomaron las fotografías correspondientes (Robson et al. 2010, Van der Does et al. 2013).

2.9 Extracción de proteínas para medir actividad enzimática

Las plantulitas fueron maceradas con émbolos dentro de los microtubos que contenían 50 µl de buffer de extracción (Buffer Fosfato 50 mM pH 7; Na₂ EDTA 10mM pH8; SDS 0,1%; Triton X100 0,1%; β -Mercaptoetanol 4,32 mM) y colocadas en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm a 4°C, se trasvaso el sobrenadante a otro microtubo (2 veces) y se guardaron los tubos que contenían las muestras a -80°C hasta el día de la medición.

2.10 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

La concentración de proteínas extraídas por plántula fue calculada por el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Se colocaron 5 µl de muestra, 15 µl de agua destilada y 100 µl de buffer de medición (Buffer Carbonato; Tartrato de Na 1%; CuSO₄ 1%) en cada celda de una placa de 96 celdas. Se agregaron 10 µl de reactivo de *folling* (diluido previamente al medio) y fue mezclado por pipeteo. La placa fue incubada 30' en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm en un fluorómetro Beckman Coulter DTX 800/880 (Pasadena, CA, USA). Se usó albúmina de suero bovino para realizar las curvas de calibración.

2.11 Medición de la actividad enzimática

La actividad de GUS fue determinada utilizando 4-metil-umbeliferil-D-glucurónico (MUG). Este sustrato es escindido por la enzima β -glucuronidasa, la cual va a ser producida cuando se exprese el promotor del gen de interés fusionado a la región codificante de ADN de dicha enzima. El producto de escisión generado es la 4-Metilumbeliferona que emite fluorescencia al iluminarse con luz UV. Para visualizar el producto colocamos 5 μ l de muestra por well y se agregaron 195 μ l de buffer de reacción (Buffer Fosfato 50 mM; Na₂EDTA 0,5M pH8; SDS 0,1%; Triton X100 0,1%; β -Mercaptoetanol 10 Mm; MUG 0,44 mg/ml). La actividad enzimática se expresa como M(nanoMoles) de MU por mg de proteína por minuto (Jefferson et al. 1987).

2.12 Extracción de proteínas para Western Blot

Las plántulas congeladas fueron maceradas con émbolos en microtubos que contenían 50 μ l de buffer de extracción (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 10% glycerol, 0.1%; NP-40, 1 mM; *phenylmethylsulfonylfluoride* (PMSF) y se le agrego un cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Basel, Suiza) (Leone et al. 2014).

2.13 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La concentración de proteínas de cada muestra se calculó por el método de Bradford. Se agregaron 1 μ l de muestra en 799 μ l de agua. A cada microtubo se le adicionaron 200 μ l de reactivo Bradford. Se incubaron los tubos en oscuridad y se usó albúmina de suero bovino para realizar las curvas de calibración. Las lecturas de absorbancia se hicieron a 595 nm usando un espectrofotómetro (UV1700; Shimadzu, Kyoto, Japan) (Bradford 1976).

2.14 Análisis de proteínas por Western Blot

Para detectar y evaluar cambios en los niveles de las proteínas de interés se utilizaron anticuerpos policlonales específicos. Para evaluar la degradación de las proteínas DELLAs, empleamos un anticuerpo dirigido contra RGA (Agrisera, AS11 1630, Vannas, Sweden).

Los extractos proteicos fueron resueltos en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) al 12%. Se armaron geles desnaturizantes (0,1% SDS) de 10 a 15% en celdas Bio-Rad 220. Las muestras a ser analizadas se prepararon agregándoles los volúmenes correspondientes de buffer de siembra 5X (0,625 M Tris/HCl pH 6,8; 2% SDS; 0,5% β -mercaptoetanol; 10% de glicerol; 0,5% azul de bromofenol) y calentándolas por 5 min a 100°C. Como buffer de corrida se usó Tris-glicina-SDS 1x. Se usaron marcadores de peso molecular que iban de 10 a 170 kDa (ThermoScientific, Rockford, USA). Al finalizar la corrida, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (ThermoScientific, Rockford, USA). La transferencia se hizo en cuba de inmersión (Bio-Rad, CA, USA) utilizando un buffer Tris-glicina 1x, metanol 20% durante 1 h a 90 volts. Las membranas se incubaron durante 1 h con solución de bloqueo (leche descremada 5% en buffer TBS-Tween) y luego con el anticuerpo primario anti RGA diluido 1:700 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces con TBS-Tween 15' c/u y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con

peroxidasa de rabanito (Biorad, CA, USA) diluido 1:2500 y se repitieron los tres lavados. Los anticuerpos secundarios se diluyeron en leche descremada 1%. Como sustrato para la peroxidasa se usó el kit de quimioluminiscencia *Clarity ECL* (BioRad, CA, USA) (Leone et al. 2014).

2.15 Análisis estadístico

Se analizaron los resultados con un ANOVA de diseños factorial (genotipos, tipo de luz y tratamiento inductor) mediante el programa Infostat (Versión profesional 1.1). Se evaluó la significación de la interacción en todos los ensayos, entre los distintos factores y en consecuencia se realizaron los contrastes necesarios en cada uno de los mismos. En los análisis de hipocotilo, peso fresco, metabolitos secundarios y antocianinas los datos fueron analizados mediante el test estadístico ANOVA de dos factores: el tratamiento lumínico y la inducción con MeJA. Cuando la interacción entre factores resulto significativa, la diferencia entre medias se evaluó mediante el test de comparaciones de Tukey. En algunos casos los datos tuvieron que ser transformados, con distintas funciones como \log_2 o raíz cuadrada, para que cumplan los supuestos de homocedasticidad y normalidad, (se indican en los gráficos). El número de experimentos independientes (n) usados para calcular las medias de cada tratamiento se indican en las leyendas de cada figura. En cada experimento se armaron pools de plantulitas, para evaluar peso fresco, pigmentos y compuestos fenólicos utilizamos 20 plántulas individuales por experimento, por experimento utilizamos dos frascos por tratamiento obteniendo dos subreplicas por experimento, y luego cada subreplica fue utilizada para sacar el promedio final. Para medir estabilidad proteica usamos 5-8 plantulitas por cada tratamiento.

CAPÍTULO 3

Resultados

Capítulo 3. Resultados

3.1 Evaluación y determinación de respuestas de fácil medición para determinar la sensibilidad a JA

El JA tiene diversas funciones como mencionamos en la introducción (Capítulo 1). Principalmente, inhibe el crecimiento y promueve las defensas (Wittstock and Gershenzon 2002, Glazebrook 2005, Wasternack 2007, Howe and Jander 2008, Ballaré 2011, Wasternack and Hause 2013). El primer paso de esta tesis fue determinar un conjunto de respuestas de fácil medición dependientes de COI1 que nos permitieran evaluar la sensibilidad a JA en plántulas des-etioladas de *Arabidopsis* de 12-14 días después de germinadas. Buscamos respuestas que requieran la presencia del co-receptor COI1-JAZ (Xie et al. 1998, Thines et al. 2007). Por ello, en primer lugar evaluamos el efecto del MeJA (50 μ M), en plantas salvajes Col-0, mutantes *coil* y en plantas transgénicas sobre-expresantes de JAZ10.4 (esta línea expresa una variante de *splicing* estable que otorga a las plantas insensibilidad a la inhibición de crecimiento por MeJA) (Chung and Howe 2009, Moreno et al. 2013). Las variables medidas fueron largo del hipocotilo y el peso fresco como marcadoras de inhibición de crecimiento y acumulación de antocianas y compuestos fenólicos como marcadoras de defensas (Figura 3.1).

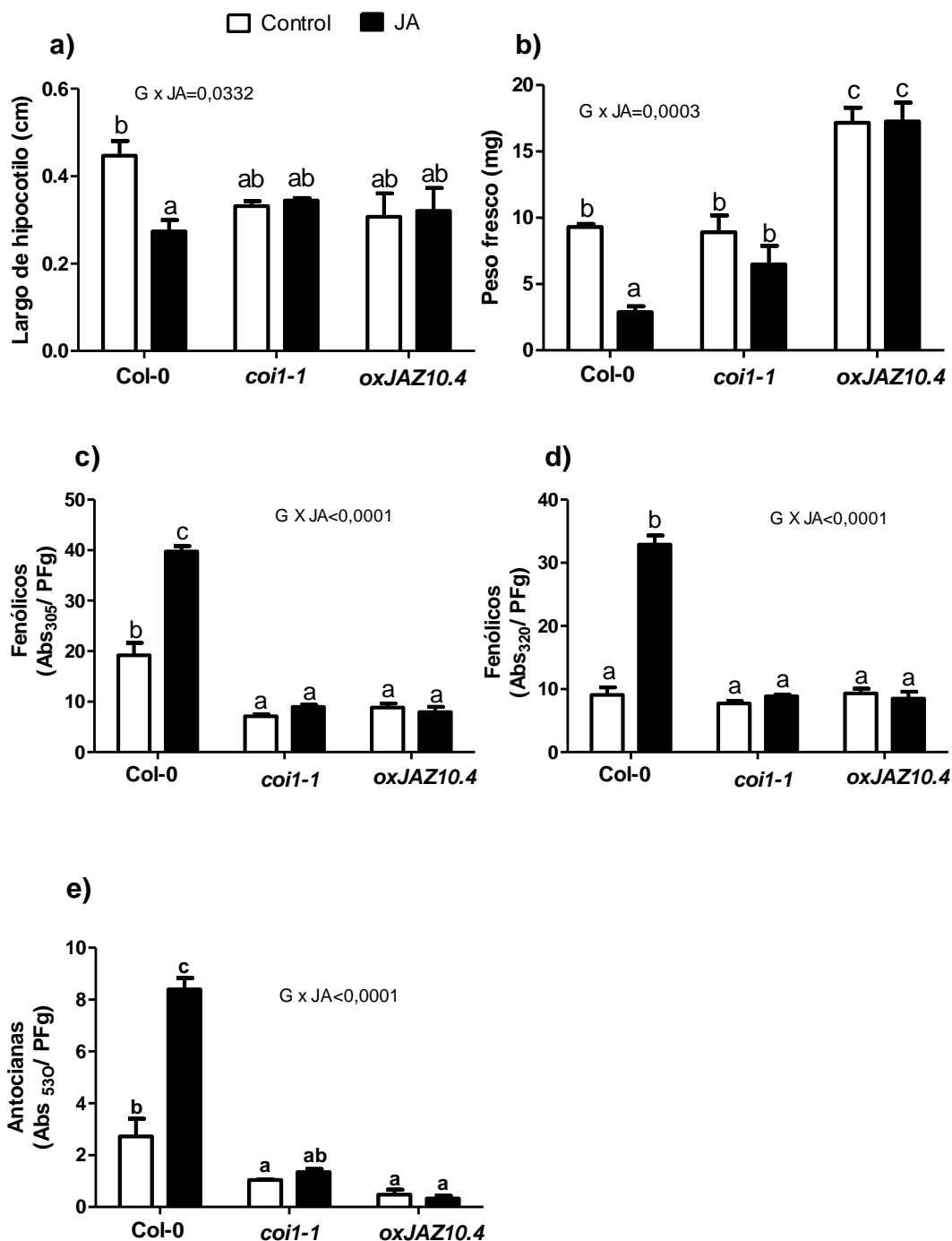


Figura 3.1: Evaluación de un conjunto respuestas a JA dependientes de COI1 para determinar la sensibilidad a JA en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las mutantes *coi1*, que no poseen el receptor de JA no responden a ninguna de las variables inducidas por el MeJA. Las plantas sobre-expresantes de JAZ (*oxJAZ10.4*), represor de la vía de los jasmonatos, tampoco responden a la inducción en ninguna de las variables estudiadas. Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; JA: Metiljasmonato; G: genotipo. Cuando la interacción entre GxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de PF fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA. (n=5).

Encontramos que las plantas del genotipo salvaje (Col-0) tratadas con MeJA son sensibles a la inducción en todas las variables medidas: inhibición de elongación del hipocotilo; peso fresco (crecimiento) y acumulación de antocianas y de compuestos fenólicos totales inducidos por respuestas de defensa. Estos resultados nos permitieron determinar que las variables elegidas nos proveían un sistema tratable y cómodo para abordar preguntas mecanísticas.

Las mutantes *coi1* y las sobre-expresantes de JAZ10.4 (represores de la vía de los JAs) no respondieron al tratamiento con MeJA en ninguna de las variables medidas, por lo que demostraron que el módulo de percepción COI1-JAZ es necesario para la inducción de estas respuestas, las que serán tomadas como marcadoras de la activación de la vía de JA a lo largo de esta tesis.

3.2 La disminución de la sensibilidad de los tejidos frente a JA está mediada principalmente por la inactivación del phyB

Las evidencias previamente presentadas en el trabajo de Moreno et al. (2009), demostraron que la inactivación del phyB, por mutaciones o por señales de competencia derivadas de la presencia de plantas vecinas, deprime la sensibilidad de los tejidos a JA. Otros trabajos desarrollados en el laboratorio y por otros autores demuestran que las bajas relaciones R:RL afectan la expresión de los sistemas de defensas en plantas (Izaguirre et al. 2006, Ballaré 2009, Kazan and Manners 2011, Cerrudo et al. 2012, Izaguirre et al. 2013, Cargnel et al. 2014). Para tratar de comprender los mecanismos por los que el RL afecta la sensibilidad a JA pusimos a punto un sistema de frascos donde las plantas fueron germinadas y crecidas “in vitro” que nos permitió caracterizar variables marcadoras de respuesta a JA (ver sección 3.1). Una vez ajustada la metodología procedimos a testear las hipótesis planteadas en el capítulo 1. Para ello realizamos experimentos en cámaras de cultivo, utilizando lámparas incandescentes, con o sin filtros de RL y dos 2 niveles de inducción con Metil-jasmonato (con/sin MeJA). Las plantas fueron cultivadas en frascos de vidrio durante 7 días bajo luz blanca (LB). Luego fueron transferidas a condiciones de LB (plantas control) o RL (luz blanca + RL). Después de dos días de transferidas, fueron tratadas con MeJA disuelto en agua y etanol (50 uM) o agua con etanol (plantas control), continuando con los tratamientos lumínicos 72 h más (Figura 2.3, Capítulo 2). Luego fueron cosechadas para medir el largo del hipocotilo, peso fresco y el contenido de antocianas y compuestos fenólicos solubles.

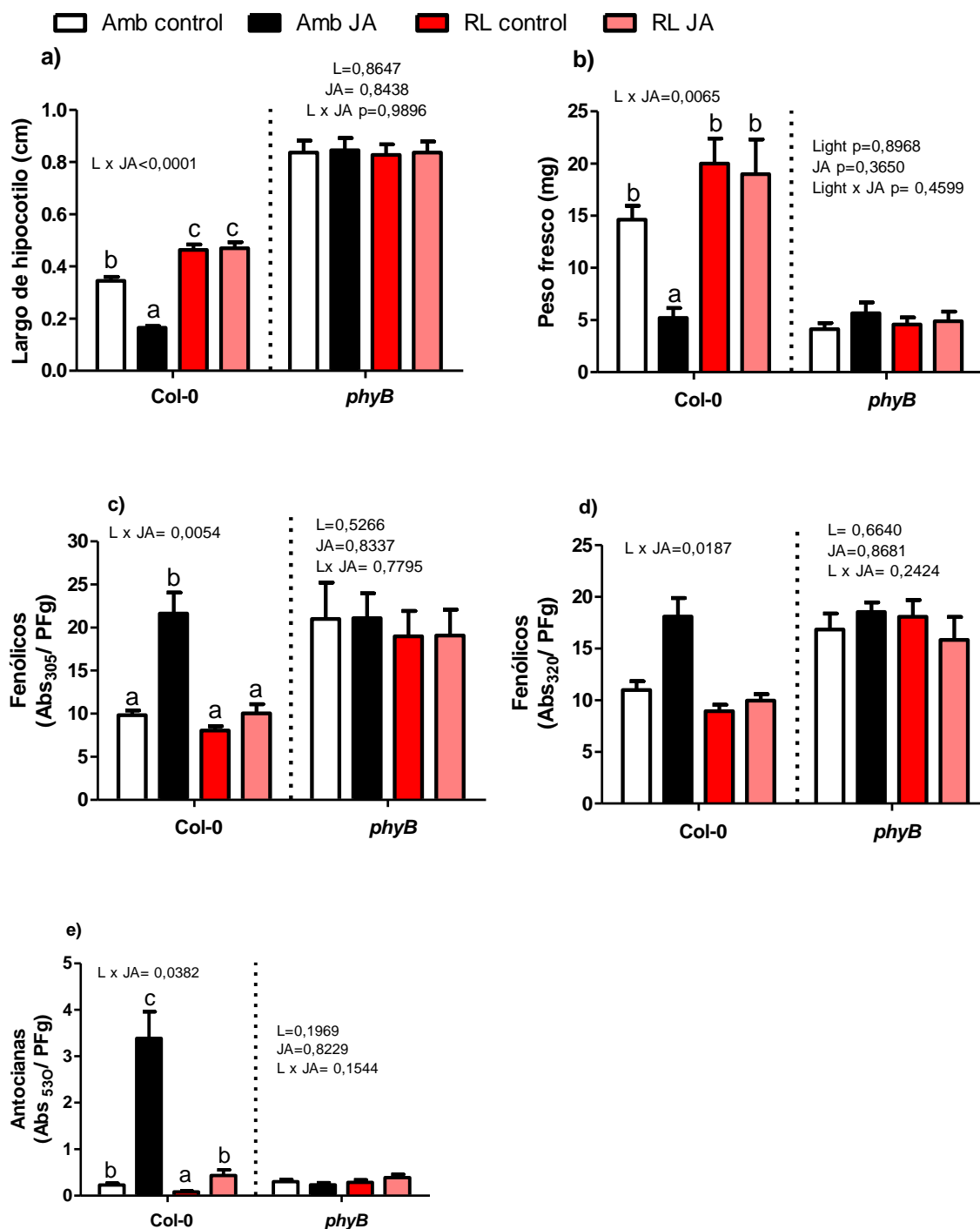


Figura 3.2: Efectos del JA y la inactivación del phyB en el crecimiento y la defensa en *Arabidopsis*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *phyB*: mutante de fitocromo B. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=8-10). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo, peso fresco y fenólicos (Abs=320 genotipo Col-0) fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Al combinar nuestros tratamientos de MeJA con tratamientos lumínicos y mutantes *phyB* notamos que el efecto de JA inhibiendo el crecimiento y promoviendo las defensas observado en plantas Col-0, fue significativamente atenuado en plantas expuestas a RL o en las mutantes *phyB* (Figura 3.2). Los resultados de elongación de hipocotilo no concuerdan con los reportados por Hou et al. (2010) donde muestran una fuerte inhibición en el largo del hipocotilo en las mutantes *phyB* pero concuerdan con los publicados por Chen et al. (2013) y son consistentes con la evidencia que indica que el phyBPfr es un regulador positivo de la sensibilidad a JA (Ballaré 2011).

3.3 El fenotipo de insensibilidad a JA es casi completo en la mutante *phyB*

Arabidopsis thaliana posee 5 fitocromos y se ha reportado que phyD y phyE actuarían de modo redundante con phyB en las respuestas de escape al sombreado (Franklin and Whitelam 2005, Franklin and Quail 2010, Smith and Whitelam 1997). En el laboratorio contábamos con plantas triples mutantes (*phyBDE*) (cedidos por el Dr. P. Cerdán) y evaluamos el efecto de agregar mutaciones en phyD y phyE sobre las variables empleadas como marcadoras de la respuesta a JA (Figura 3.3).

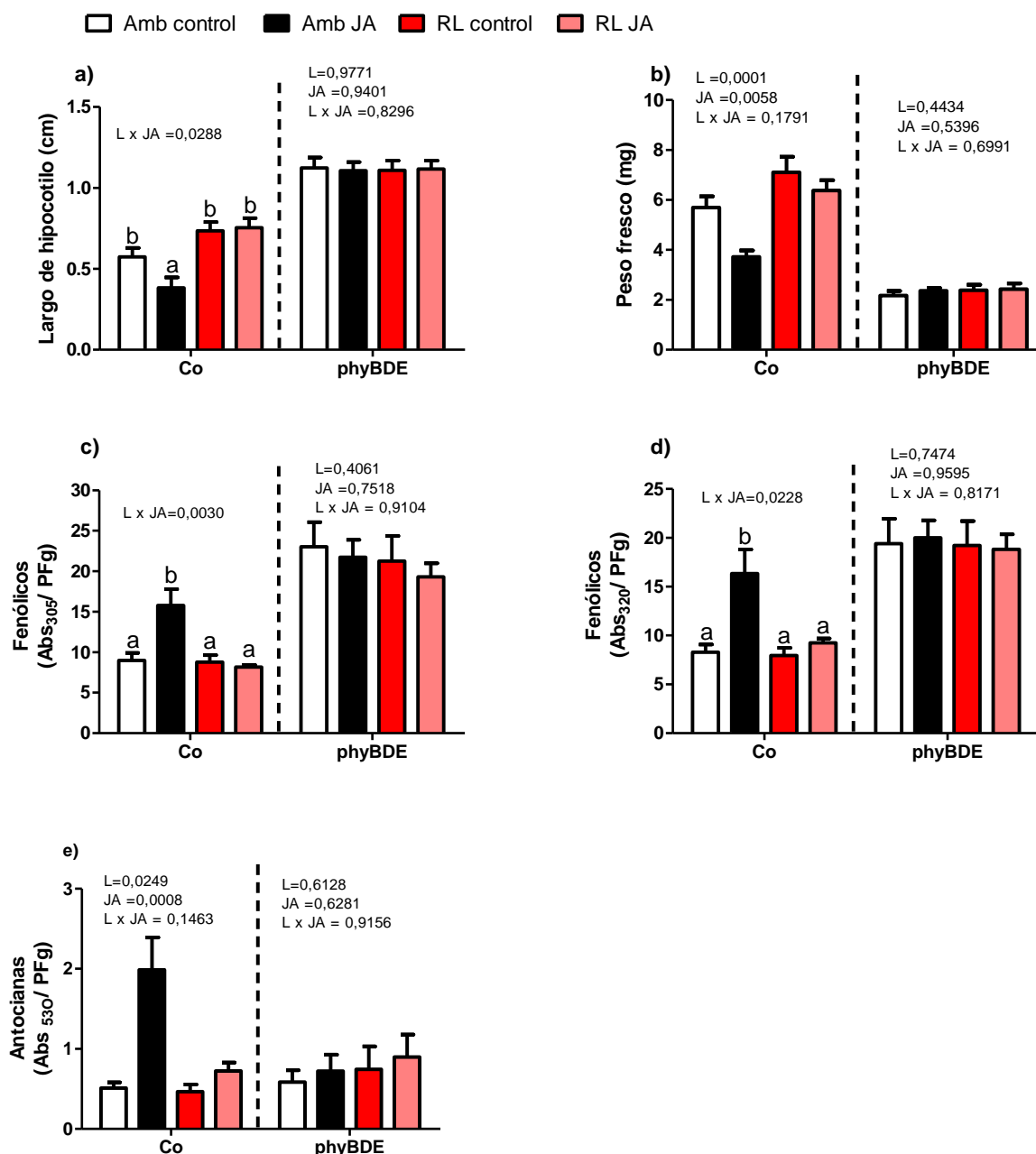


Figura 3.3: El fenotipo de insensibilidad a JA es casi completo en la mutante *phyB*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Co: genotipo salvaje Constans, (las triples mutantes de phy se realizar en este fondo genético para evitar la floración temprana); phyBDE: triple mutante de fitocromos B, D y E. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=8). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo, fenólicos (Abs=305 y 320) y antocianinas fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Observando la Figura 3.3 podemos decir que la ausencia de otros fitocromos (D, E) no parece jugar un rol significativo en la regulación de las respuestas a RL, ya que con solo estar presente la mutación en *phyB*, las plantas se tornaban virtualmente insensibles a JA para los marcadores elegidos (Figura 3.2).

3.4 Las DELLAs son requeridas para las respuestas a JA evaluadas

Trabajos recientes evidencian que las proteínas DELLAs, principales represoras de la vía de las GAs (hormonas promotoras del crecimiento), podrían contribuir a regular la respuesta a JA mediante su interacción directa con las proteínas JAZ, principales represoras de esta vía (Hou et al. 2010). Teniendo en cuenta la evidencia disponible (Navarro et al. 2008, Yang et al. 2012), evaluamos el rol de las DELLA y su degradación en las respuestas a JA y RL caracterizadas en experimentos anteriores. Para ello utilizamos genotipos mutantes que poseen proteínas DELLA no funcionales (quíntuples mutantes, *5xdella*) (figura.3.4) y plantas mutantes de ganancia de función que tienen proteínas DELLA estables (*gai-1*) (figura 3.8). Los experimentos para probar los efectos interactivos de JA y RL fueron iguales a los detallados más arriba (Figura 2.3, Capítulo 2).

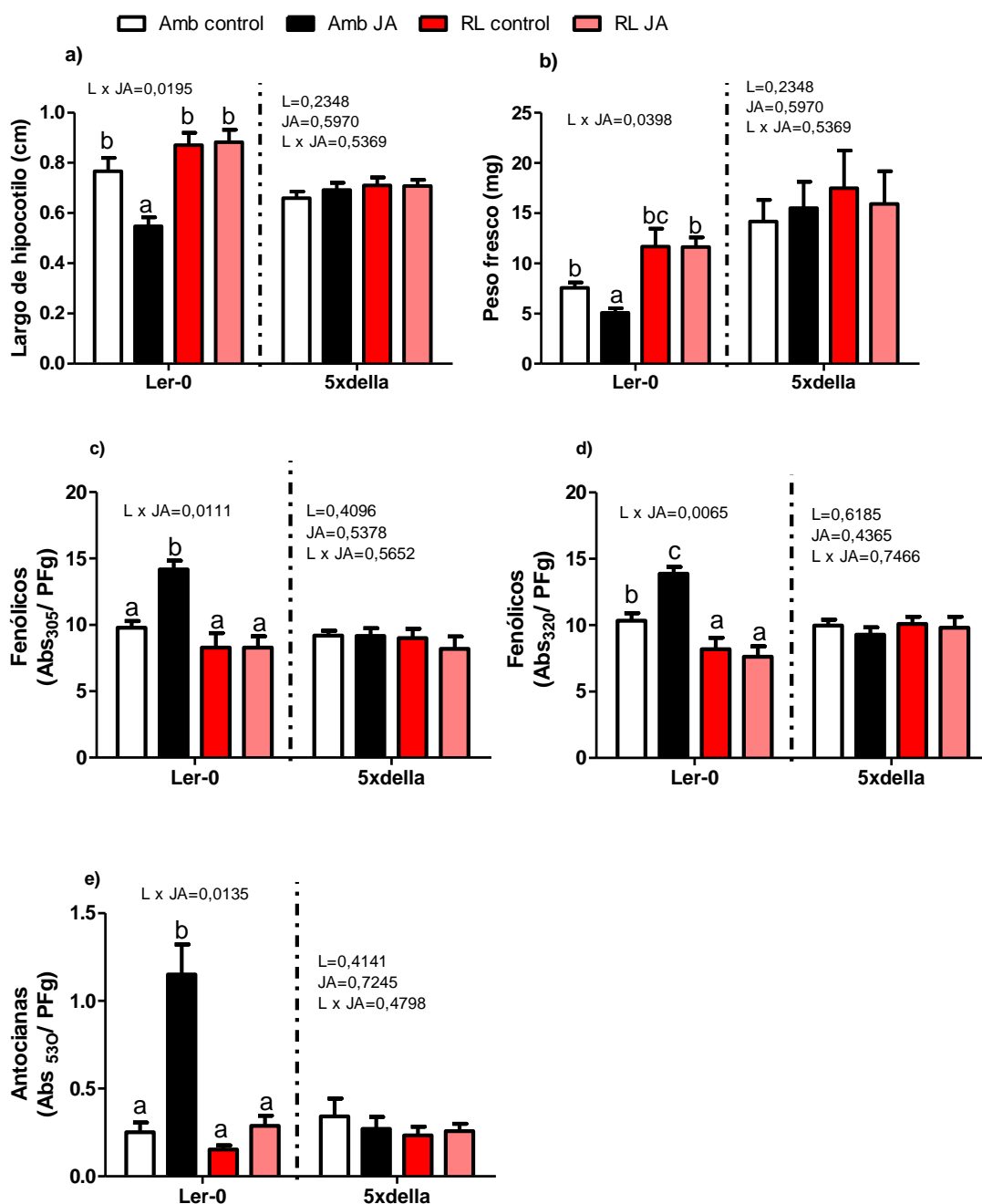


Figura 3.4: Las respuestas de crecimiento y defensa inducidas por los JAs requieren la presencia de las proteínas DELLAs. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; *Ler-0*: genotipo salvaje; *5xdella*: quintuple mutante DELLA (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl3-1 rgl2-1*). Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=8). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de peso fresco y antocianinas (genotipo *Ler-0*) fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Las plantas salvajes, ecotipo Ler-0, respondieron a los tratamientos con JA y RL de manera similar al ecotipo salvaje Col-0 en las cinco variables analizadas (Figura 3.4). En la mutante *5xdella*, el MeJA no inhibió la elongación del hipocotilo ni redujo el peso fresco, como tampoco promovió la acumulación de compuestos fenólicos y antocianas (Figura 3.4). La pérdida de inhibición del crecimiento del hipocotilo concuerda con datos publicados previamente (Yang et al. 2012). La ausencia de respuesta a JA en las variables medidas de acumulación de compuestos fenólicos y antocianas no había sido reportada hasta el momento.

3.5 RGL3 no juega un rol importante en la sensibilidad a JA

Existen evidencias previas que han documentado que RGA-LIKE3 (RGL3), una de las cinco DELLAs presentes en *Arabidopsis*, es capaz de modular positivamente la vía de los JAs (Wild and Daviere 2012). Es por ello que decidimos evaluar las respuestas al MeJA y al RL en cuádruples mutantes (*4xdella: gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*) que poseen copias funcionales de RGL3. Para ello se realizó un experimento siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente (Figura 2.3, capítulo 2).

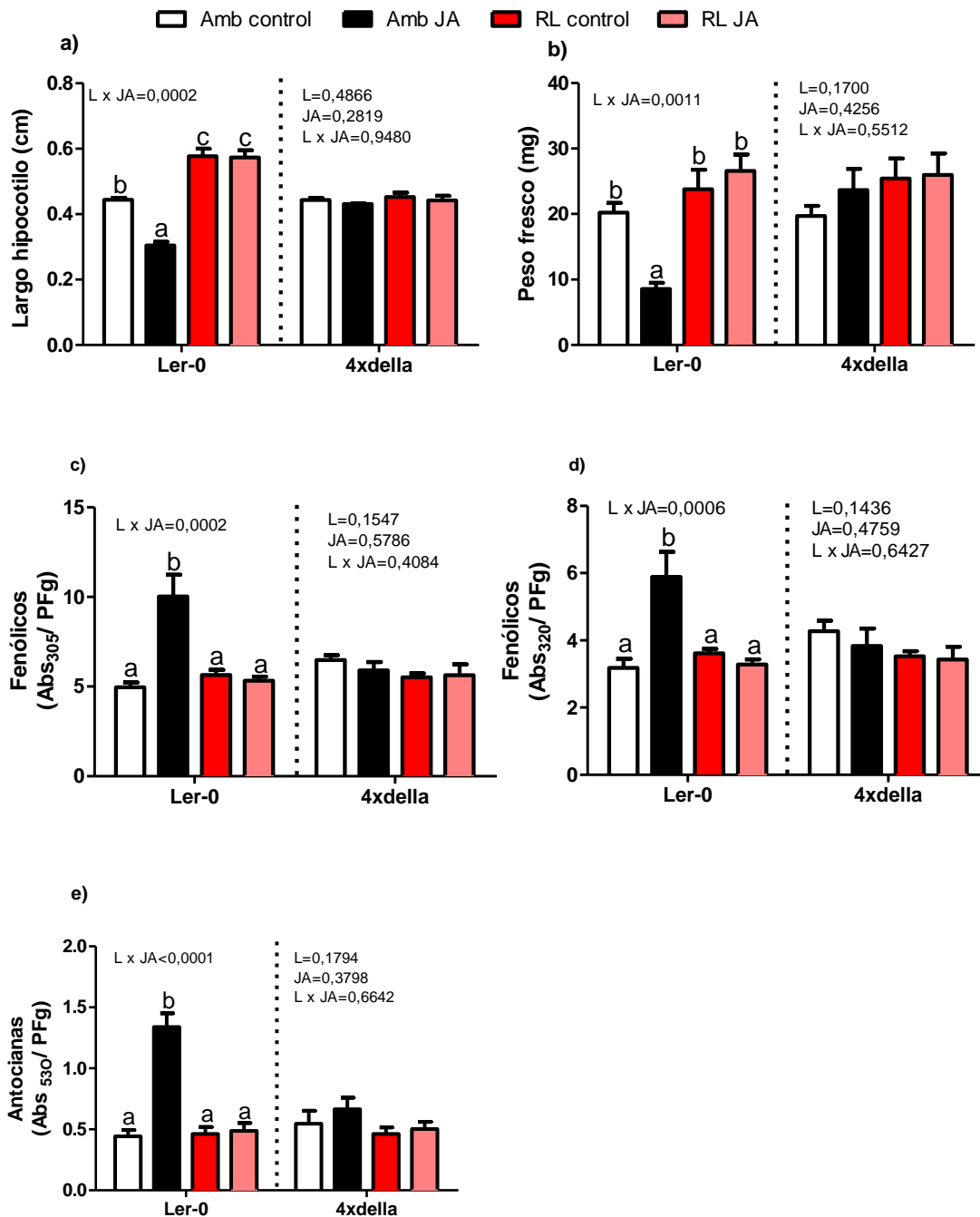


Figura 3.5: Las mutantes *4xdella* (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl2-1*) tienen un fenotipo insensible a JA y a RL, similar al que observamos en la *5xdella* (*gai-t6 rga-t2 rgl1-1 rgl3-1 rgl2-1*). a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Ler-0: genotipo salvaje. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=4). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo, peso fresco y fenólicos (Abs=305 y 320) del genotipo Ler-0 fueron transformados para cumplir los supuestos del ANOVA.

De manera similar a lo observado en las *5xdella* (Figura 3.4), las cuádruples mutantes son insensibles a los tratamientos con MeJA y con RL. Ninguna de las dos líneas mutantes mostraron respuestas a la inducción con JA en las variables medidas. Esto indicaría que RGL3 no participaría de las respuestas observadas en plantas del genotipo salvaje. Utilizando una aproximación complementaria, evaluamos las respuestas a MeJA y RL en plantas mutantes que específicamente carecen de esta DELLA (mutantes *rgl3.3*) (Figura 3.6).

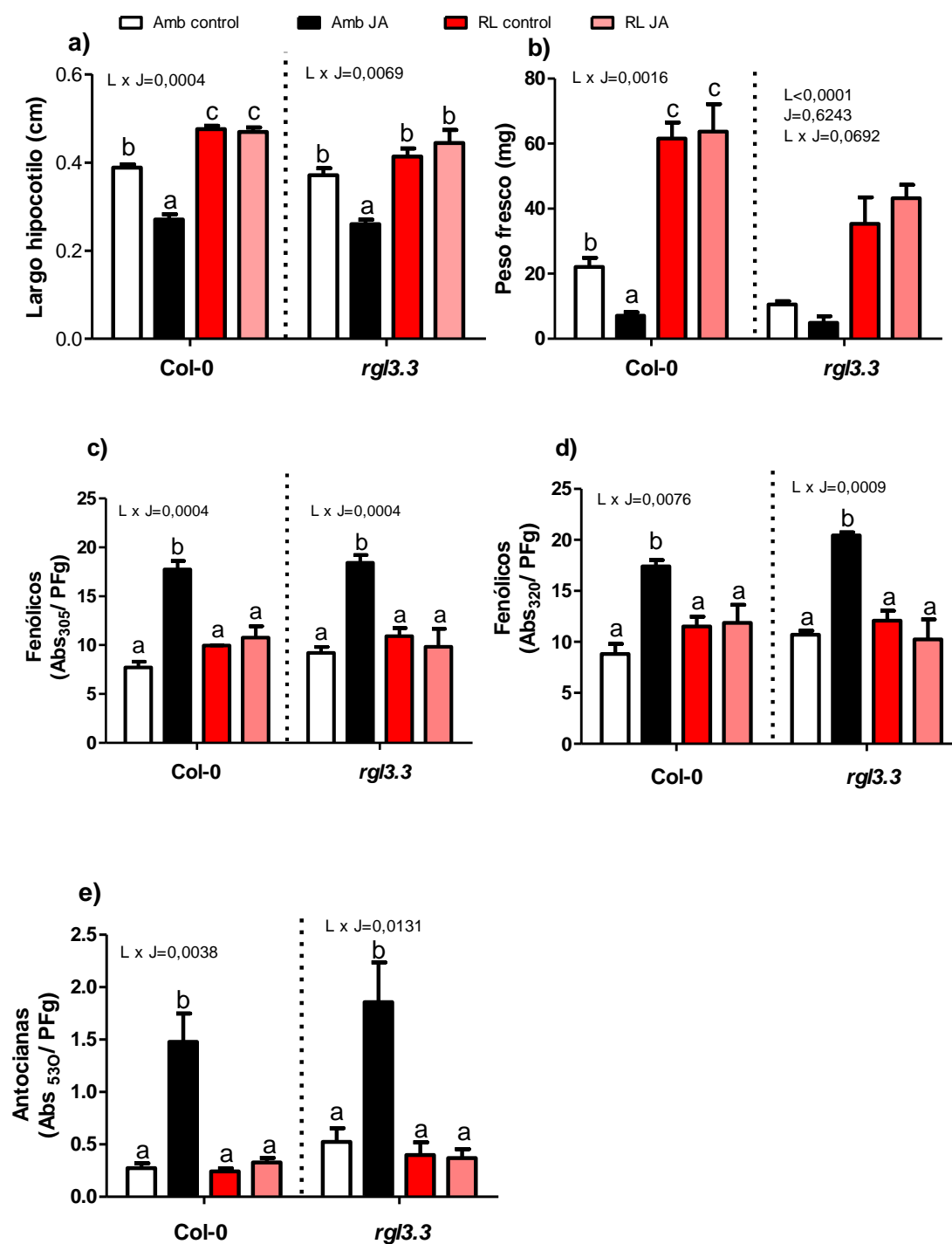


Figura 3.6: Las mutantes *rgl3.3* tienen un fenotipo sensible a JA y a RL, similar al que observamos en el genotipo salvaje (Col-0). a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *rgl3.3*: mutantes de *rgl3.3* (una de las cinco proteínas DELLA). Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=3). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos.

La mutante *rgl3.3* se comporta de manera similar a las plantas salvajes, mostrando sensibilidad a MeJA y, a su vez, el tratamiento con RL disminuye la sensibilidad al mismo.

Estos resultados sugieren que una o más proteínas DELLA (no RGL3) son necesarias para las respuestas de crecimiento (largo de hipocotilo y peso fresco) y defensas (acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos) inducidas por JA, por lo tanto, podemos decir que una o varias de estas 4 proteínas DELLA (RGA, GAI, RGL1, RGL2) son requeridas para la respuesta a JA.

3.6 Las bajas relaciones R: RL reducen la abundancia de las proteínas DELLAs

Estudios previos, realizados usando *pRGA::GFP-RGA* (Djakovic-Petrovic et al. 2007) y *pUBQ10::mCITRINA-RGA* o *pUBQ10::mCITRINEGAI* (Y. Jaillais & J. Chory, no publicado) en plantas de *Arabidopsis*, demostraron que las bajas relaciones R:RL reducen la abundancia de las proteínas DELLAs en peciolo y en hipocotilo, presumiblemente como consecuencia del aumento de la actividad de GA. En esos experimentos, en general, se utilizaron tratamientos de irradiación prolongados y en peciolo e hipocotilo ya que es donde ocurren predominantemente las respuestas de defensa, tales como producción de compuestos fenólicos y glucosinolatos. Por otro lado, no está claro si los efectos de la baja R:RL sobre la degradación de las DELLAs son suficientemente rápidos para dar cuenta de los efectos rápidos de cambios en el estado de phyB sobre la sensibilidad a JA.

Por ello, quisimos evaluar si las bajas relaciones R:RL aumentan la degradación de las proteínas DELLA a nivel de planta entera y si el efecto es rápido. Utilizamos un anticuerpo (Ac) anti-RGA para evaluar la estabilidad de las proteínas DELLA en tiempos cortos de exposición a RL. Las plantas fueron cultivadas por 12 días en luz blanca. En el día 12 fueron suplementadas con RL, por los tiempos que se indican en la Figura 3.7.

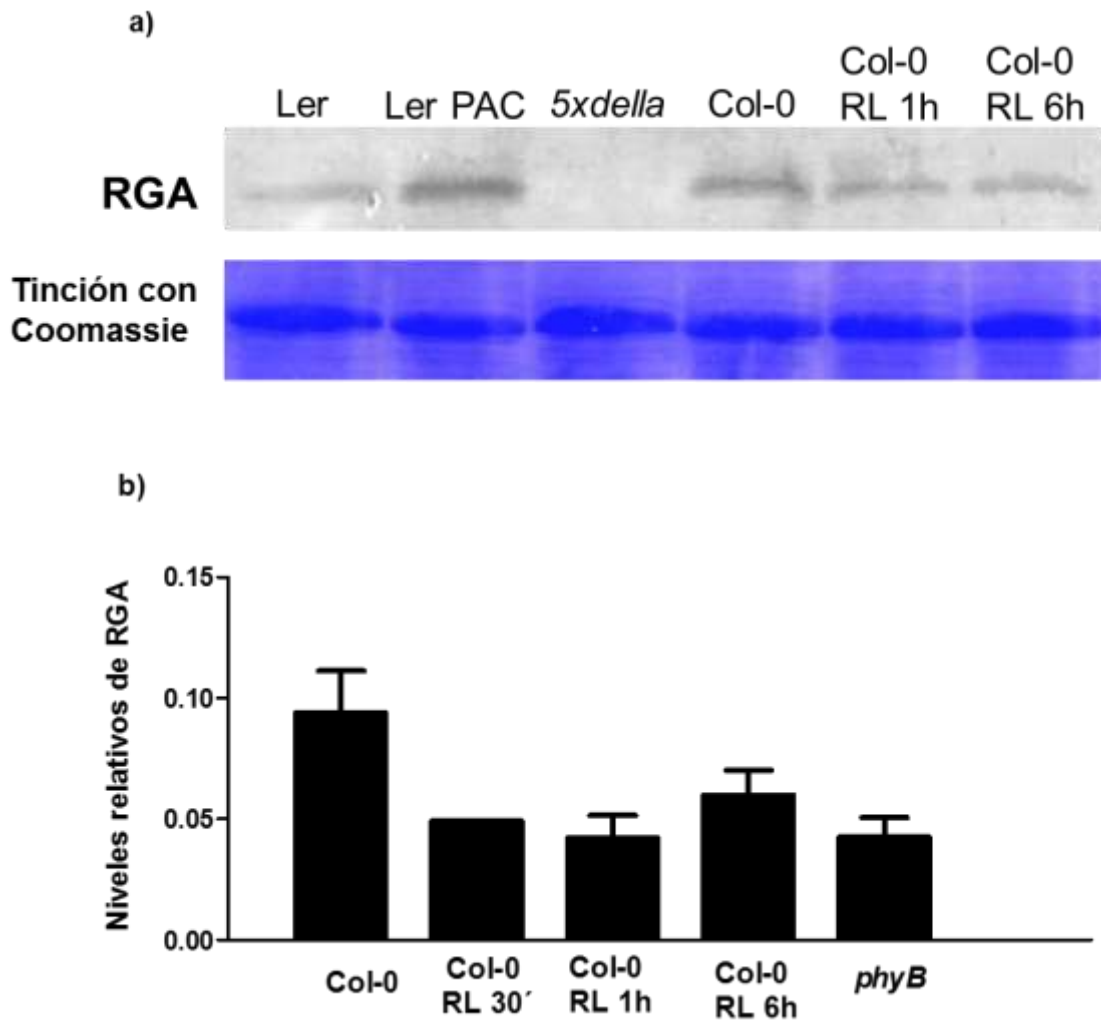


Figura 3.7: La suplementación con luz RL promueve la degradación de las proteínas DELLA. a) Imagen representativa de la degradación de la proteína RGA en plantas de *Arabidopsis* de 12 días expuestas a radiación RL durante 1 y 6 horas (h). La mutante 5xdella (fondo Ler-0) fue utilizada como control negativo; Ler-0 + paclobutrazol (PAC), inhibidor de la síntesis de GA, fue utilizado como control positivo. La proteína RGA fue detectada con un anticuerpo dirigido contra RGA. La tinción de coomassie se usó como control de carga para verificar que la concentración de proteínas fue igual en todas las calles del gel sembradas. b) Cuantificación de los niveles relativos de RGA de los tratamientos relevantes con suplementación de RL a distintos tiempos y en la mutante *phyB*. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=3).

El análisis por inmunotransferencia demostró que las bajas relaciones R:RL causaron una rápida reducción (en minutos) de los niveles de la proteína RGA y que el mutante *phyB* tiene constitutivamente bajos niveles de RGA (Fig. 3.7).

3.7 El efecto de las bajas relaciones R:RL disminuyendo la sensibilidad a los JAs está perdido en la mutante de ganancia de función *gai-1*

Teniendo la evidencia donde mostramos que la inactivación de phyB causa una rápida disminución en los niveles de la proteína RGA (Fig. 3.7), razonamos que la degradación de las proteínas DELLAs puede mediar el efecto de las bajas relaciones R:RL disminuyendo las respuestas a JA. Decidimos poner a prueba esta hipótesis realizando experimentos con mutantes de *Arabidopsis* de ganancia de función, *gai-1* (Koornneef et al. 1985), las cuales codifican una versión estable de la proteína GAI (*gai-1*), la cual es resistente a la degradación inducida por las GAs (Figura 3.8)(Peng et al. 1997).

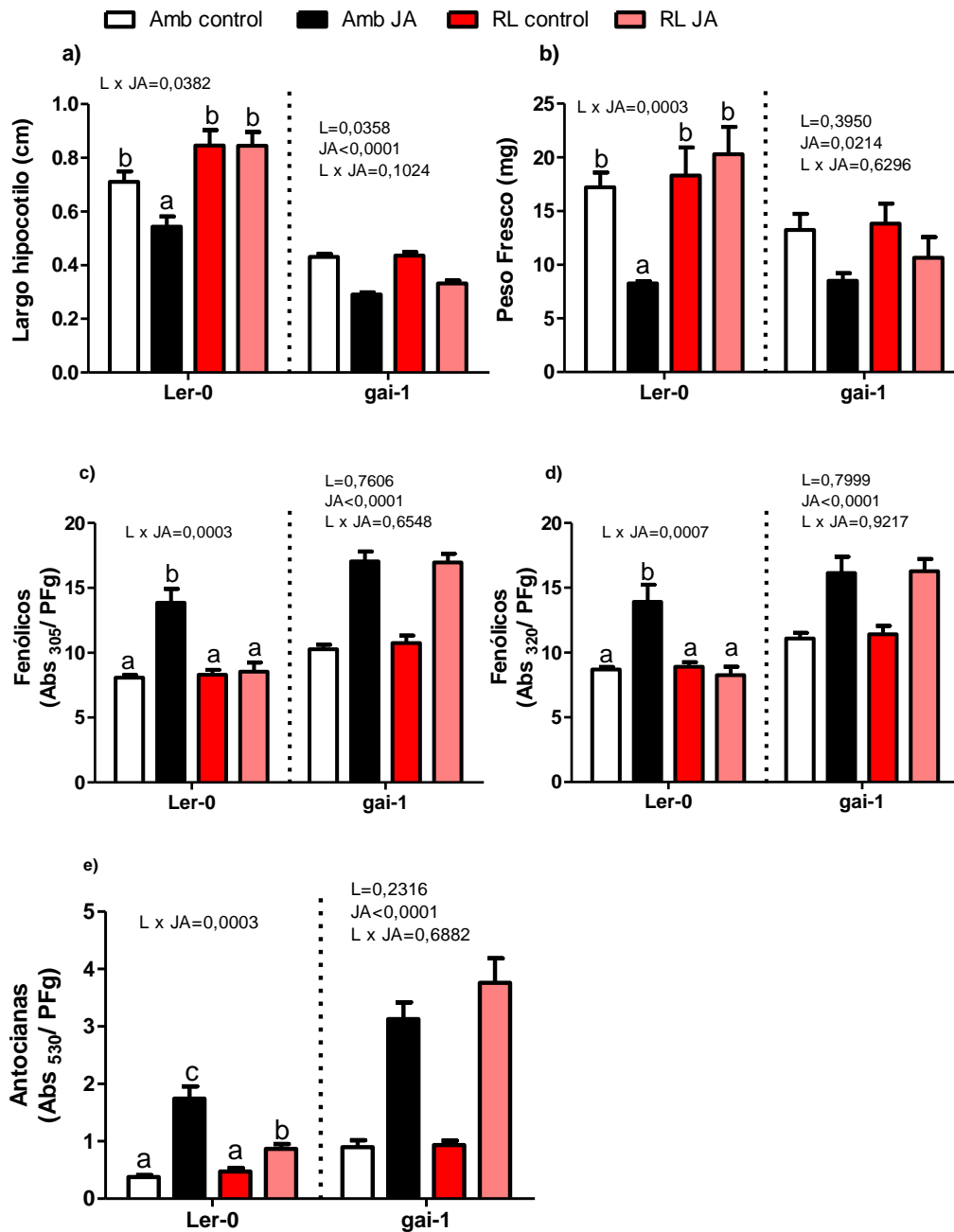


Figura 3.8: La degradación de GAI1 es requerida para que se produzca el efecto inhibitorio de las bajas relaciones R:RL sobre las respuestas a JA en plantas de *Arabidopsis*. a) Largo de hypocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *gai-1*: mutantes de ganancia de función insensible a la degradación por giberelinas. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=8). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hypocotilo, peso fresco y antocianinas del genotipo Ler-0 y los datos de antocianinas del genotipo *gai-1* fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Estos experimentos mostraron que el efecto de las bajas relaciones R:RL cancelando la respuesta a JA, tanto para las variables de crecimiento (Figura 3.8a,b) como de defensa (Figura. 3.8c,d,e), no está presente en una mutante de ganancia de función que produce una versión estable de la proteína DELLA GAI1.

Estos resultados tomados en conjunto: 1) la insensibilidad a la inducción respuestas a JA en las mutantes *5xdella* y *4xdella* (Figuras 3.4 y 3.5), 2) el aumento en la degradación de la proteína RGA frente a bajas relaciones R:RL (Figura 3.7) y 3) la sensibilidad a JA y ausencia de respuesta a RL observada en la mutante *gai-1* (Figura 3.8), son coherentes con la idea de que el efecto de bajas relaciones R:RL, reduciendo la sensibilidad a JA, está causado por un aumento en la degradación de DELLAs (mediada por GAs).

3.8 Las bajas relaciones R: RL estabilizan a la proteína JAZ10

Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que el efecto de la inactivación de phyB, disminuyendo la defensa frente al hongo patógeno *Botrytis cinerea*, que es dependiente de JA, requiere de la presencia del represor JAZ10 (Cerrudo et al. 2012, Cargnel et al. 2014). Trabajos previos en plantas de *Arabidopsis* demostraron que phyA, otro miembro de la familia de los fitocromos no involucrado en las respuestas a las bajas relaciones R: RL, es requerido para la degradación de JAZ1 (Robson et al. 2010). También, recientemente, ha sido demostrado que la suplementación con RL regula la abundancia de algunas proteínas JAZ, incluyendo JAZ1, JAZ5, JAZ7, JAZ9, JAZ10, JAZ11 y JAZ12 (Chico et al. 2014). Basados en estos antecedentes decidimos evaluar el efecto de los tratamientos con RL sobre JAZ10 en líneas transgénicas transformadas con el constructo *35s::JAZ10-GUS*, las cuales expresan JAZ10-GUS bajo el control de un promotor constitutivo (35s) (Chico et al. 2014).

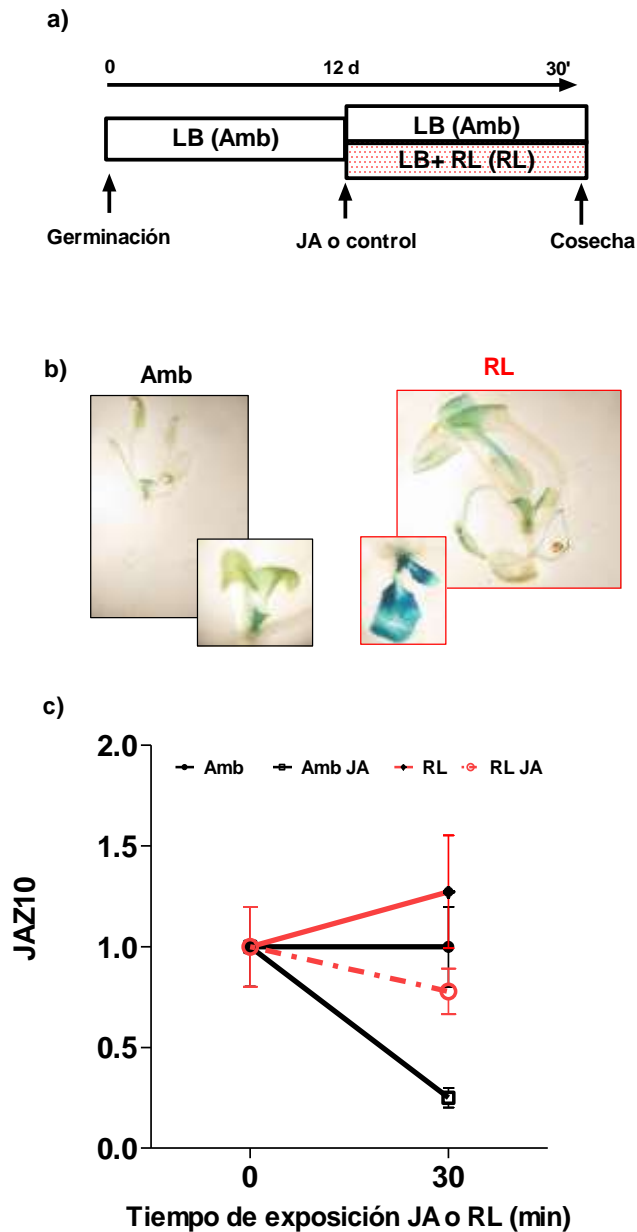


Figura 3.9: Las bajas relaciones R:RL incrementan la estabilidad de la proteína JAZ10. a) Protocolo usado para evaluar el efecto la luz en la cinética de JAZ10. Las plantas fueron germinadas y cultivadas por 12 días bajo luz blanca (LB) (14h de luz/ 10 h de oscuridad). Luego fueron tratadas con MeJA (20 μ M) o agua y transferidas a los tratamientos lumínicos: LB o LB + RL (rojo lejano). Después de 30 minutos fueron cosechadas. b) Fotografía representativa de las plantas *35s::JAZ10-GUS* luego de 4h de exposición a LB o RL. c) Cinética de la actividad de JAZ10-GUS en los distintos tratamientos de luz y MeJA. Los valores están relativizados a los valores del tiempo 0. Las barras indican ± 1 SE ($n = 7$).

Al finalizar estos experimentos encontramos que los niveles de JAZ10-GUS fueron significativamente mayores en las plantas que habían recibido tratamientos con luz RL que las sometidas a LB únicamente. Las plantas tratadas con MeJA mostraron una disminución importante en los niveles de JAZ10, como era de esperarse, pero la suplementación con RL contrarrestó el efecto del MeJA en las plantas expuestas a RL + MeJA (Figura 3.9 c).

A diferencia de lo observado en los experimentos realizados con las *35s::JAZ10-GUS*, no encontramos diferencias en los niveles de *35s::JAZ1-GUS* cuando las plantas fueron tratadas con RL (Fig. 3.10).

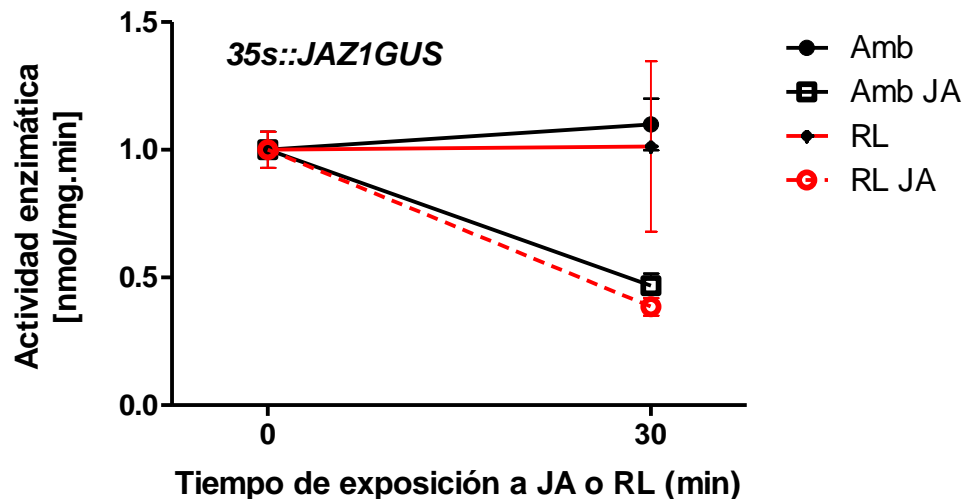


Figura 3.10: Actividad enzimática de la línea *35s::JAZ1-GUS*. Las bajas relaciones R:RL no aumentan la estabilidad de las proteínas JAZ1. Las plantas fueron germinadas y crecidas por 12 días en luz blanca (14 h de luz/ 10 h de oscuridad). Fueron tratadas con MeJA (20 μ M) o agua (control) y transferidas a los tratamientos lumínicos: LB (Amb) o LB + RL (RL). Después de 30 minutos las plantas fueron cosechadas para medir la actividad de GUS. Los valores están relativizados a los valores del tiempo 0. *35s::JAZ1GUS*: líneas transgénicas sobre-expresantes de JAZ1. Las barras indican ± 1 SE ($n = 4-5$).

En conjunto, estos resultados sugieren las bajas relaciones R:RL estabilizan a la proteína JAZ10 pero no a JAZ1. La estabilización de JAZ10 en condiciones que llevan a la inactivación de phyB podría representar uno de los mecanismos por los que las bajas relaciones R:RL reprimen las respuestas a JA.

3.9 La disminución de la sensibilidad a JA por las bajas relaciones R:RL requiere de JAZ10

El paso siguiente fue tratar de comprender si JAZ10 es necesaria para que se produzca la disminución de la sensibilidad a JA frente a bajas relaciones R:RL empleando el conjunto de respuestas testigo que pusimos a punto en los experimentos descritos más arriba. Para abordar esta pregunta, comenzamos por una aproximación genética utilizando mutantes nulos de *jaz10* (Demianski et al. 2012) (Figura 3.11) y una línea donde la expresión del gen *JAZ10* fue silenciada por ribointerferencia (RNAi7) (Yan et al. 2007) (Figura 3.12).

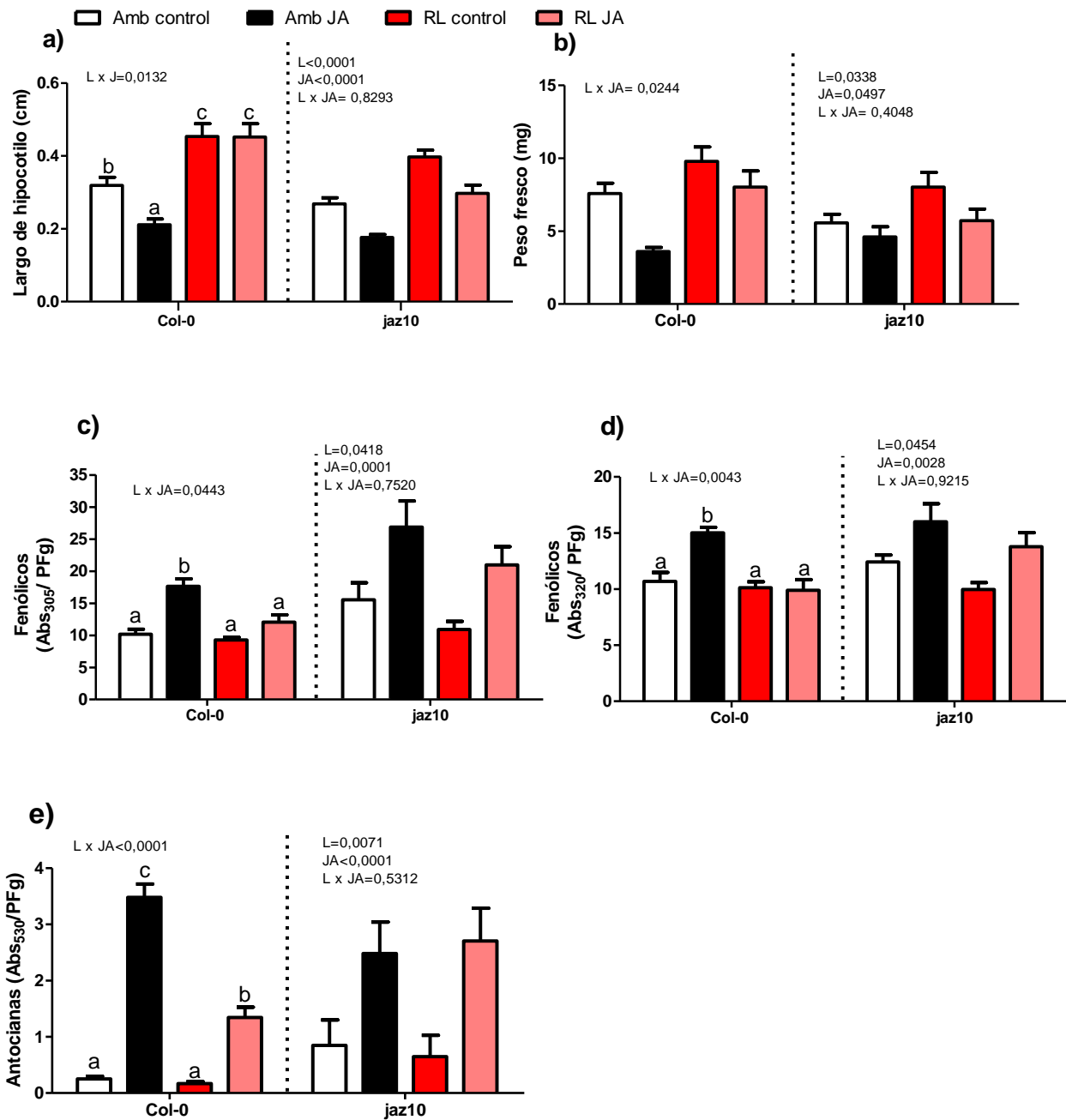


Figura 3.11: Las bajas relaciones R:RL no inhiben las respuestas a JA en una mutante nula de *jaz10*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *jaz10*: mutantes de *jaz10*. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=6-8). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo y fenólicos (Abs= 305 y 320) de ambos genotipos y los datos de peso fresco del genotipo *jaz10* fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

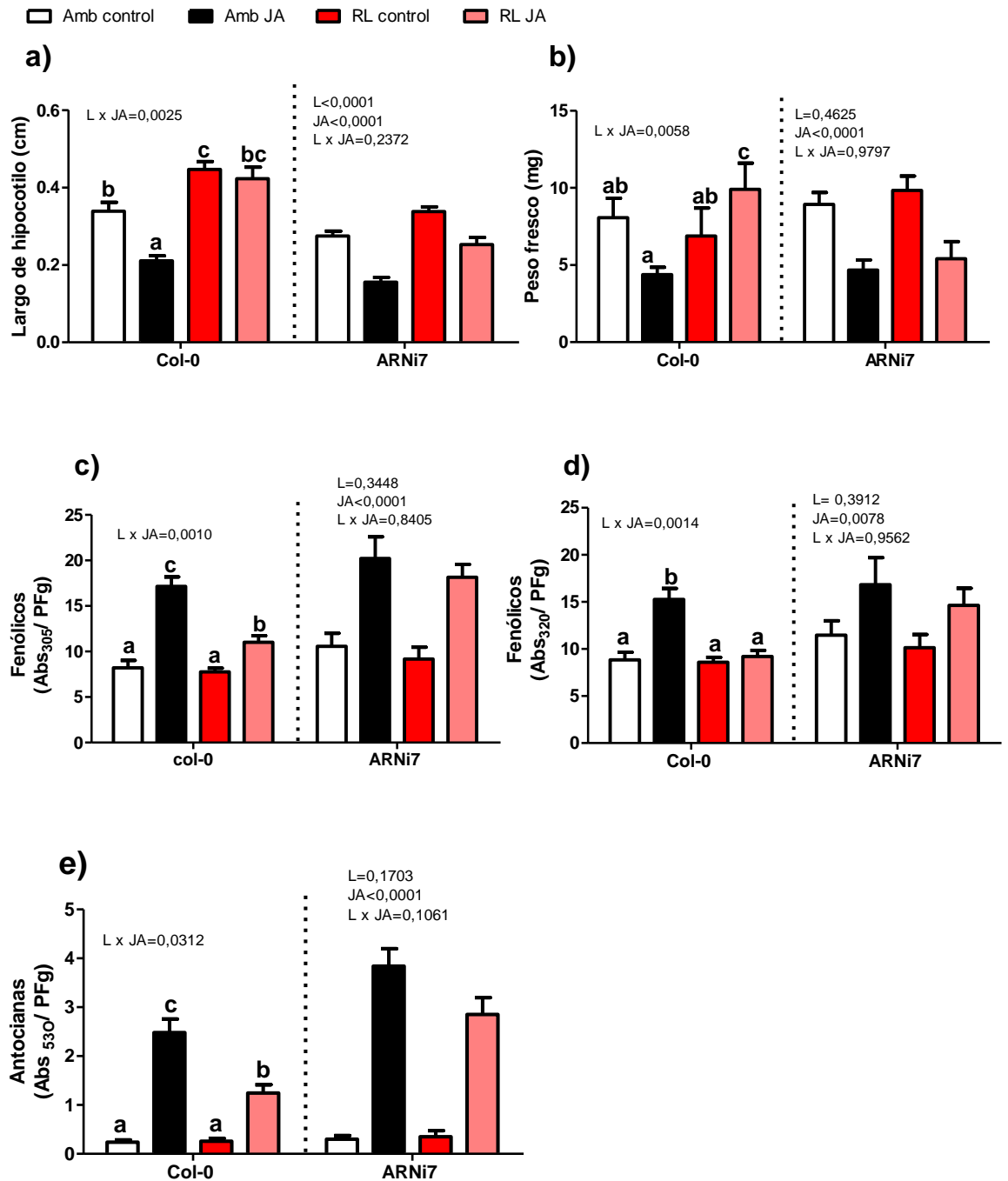


Figura 3.12: Las bajas relaciones R:RL no inhiben la respuesta a JA en la línea ARNi7. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; ARNi7: mutantes de jaz10. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=8). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); JA (Metil-Jasmonato o control). Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo del genotipo Col-0 y los datos de peso fresco de ambos genotipos fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Encontramos que en ambos genotipos (*jaz10.1* y *RNAi7*), el efecto de bajas relaciones R:RL deprimiendo la respuesta a JA, estaba significativamente atenuado o casi perdido, tanto en las variables de inhibición de crecimiento como en la acumulación de compuestos fenólicos (Fig.3.11 y 3.12).

3.10 JAZ8 y JAZ9 no serían necesarias en la de-sensibilización a JA causada por bajas relaciones R:RL

Basándonos en la evidencia que muestra que JAZ8 es estable a la inducción de la degradación mediada por JA (Demianski et al. 2012, Shyu et al. 2012) y que JAZ9 interacciona con el dominio GRAS de la proteína RGA (Hou et al. 2010, Yang et al. 2012) decidimos evaluar si la inactivación por mutaciones en los genes que codifican para dichas proteínas revierten el fenotipo de insensibilidad a JA que observamos en plantas de tipos salvaje al exponerlas a bajas relaciones R:RL (Figuras 3.13 y 3.14). Cabe aclarar que la mutante de *jaz8* utilizada en esta tesis no es una línea mutante nula pero presenta niveles muy reducidos de JAZ8 con respecto a la planta salvaje (Jiang et al. 2014). Sobre la mutante de *jaz9* no hemos medido niveles de expresión pero al igual que la mutante de *jaz8* suponemos que los niveles son muy bajos o inexistentes.

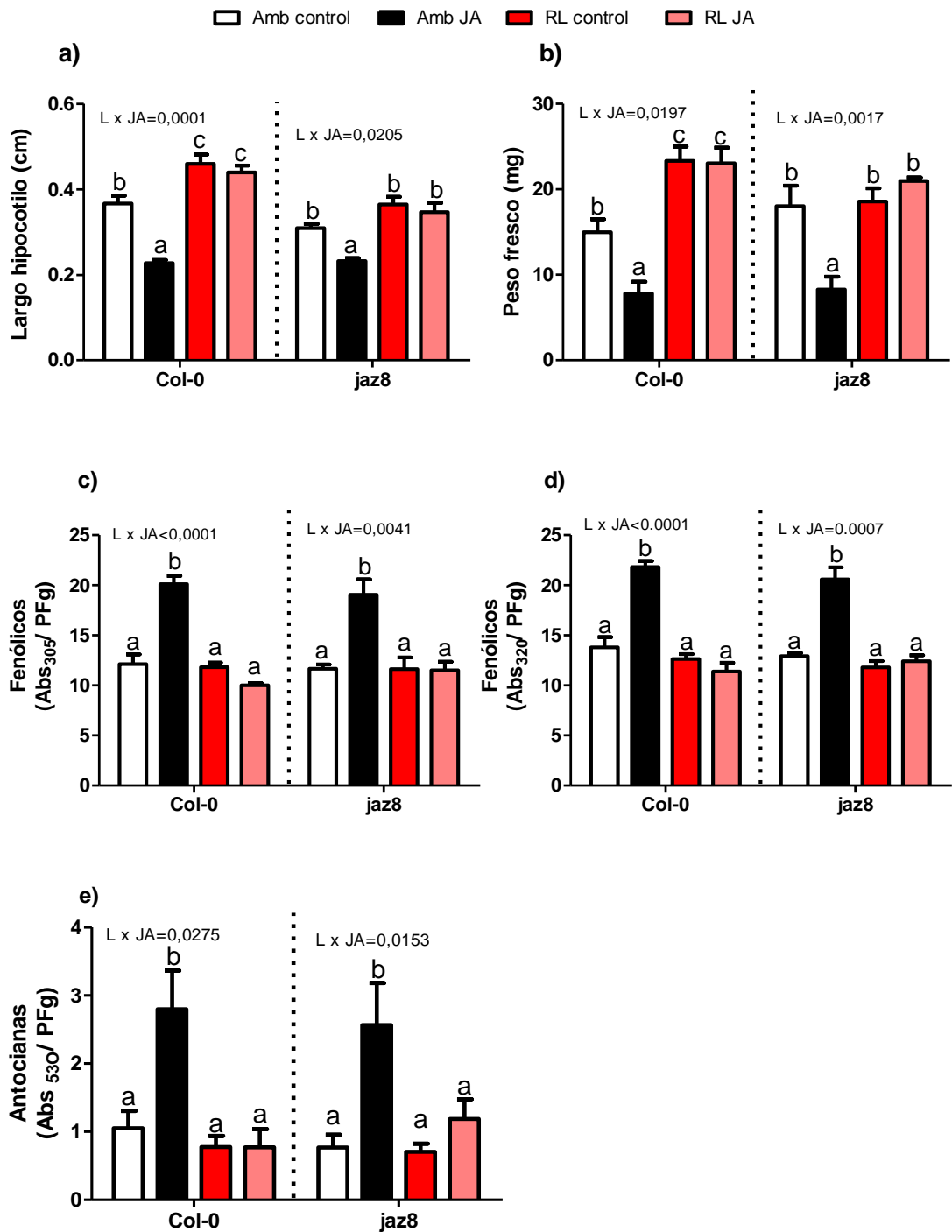


Figura 3.13: El efecto de las bajas relaciones R:RL como antagonista de la respuesta a JA está conservado en plantas mutantes de *jaz8* de *Arabidopsis*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *jaz8*: mutantes de JAZ8. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=5). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo de ambos genotipos y los datos de peso fresco del genotipo Col-0 fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

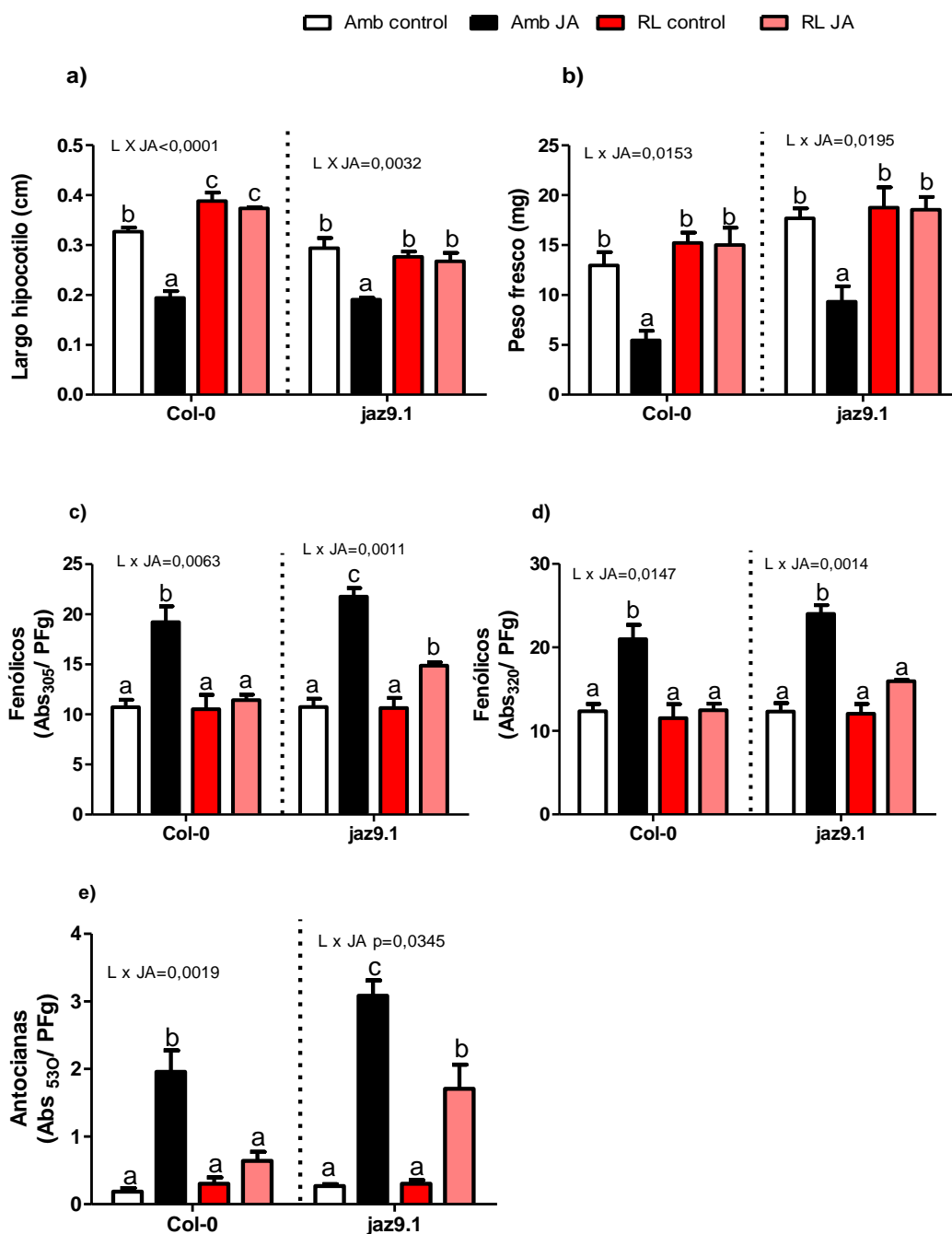


Figura 3.14: El efecto de las bajas relaciones R:RL como antagonista de la respuesta a JA está conservado en plantas mutantes *jaz9.1* de *Arabidopsis*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas. Amb: luz blanca; RL: bajas relaciones R:RL; JA: Metil-Jasmonato; L, tratamiento lumínico (Amb/ RL); Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *jaz9.1*: mutantes de *jaz9*. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=4). Cada variable fue analizada de forma factorial y se indica el valor p asociado. Cuando la interacción entre LxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de hipocotilo del genotipo *jaz9.1* fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

Ambas líneas mutantes en dos proteínas JAZ distintas presentan una respuesta al RL similar al genotipo salvaje Col-0 y no parecen ser insensibles al RL, por lo menos en las variables evaluadas en ésta tesis. Estos experimentos en conjunto, sugieren que el efecto de las bajas relaciones de R:RL reduciendo la sensibilidad a JA requiere principalmente JAZ10 pero no JAZ8 (presente en bajas cantidades) o JAZ9.

3.11 JAZ10 es partícipe necesario en la reducción de la sensibilidad a JA causada por la inactivación de phyB

Con el objetivo de avanzar en la comprensión del rol que juega JAZ10 en el mecanismo por el que la inactivación del phyB disminuye la sensibilidad a JA, en el laboratorio se generaron plantas doble mutantes, introduciendo la mutación *jaz10.1* en un fondo genético *phyB* (Figura 3.15).

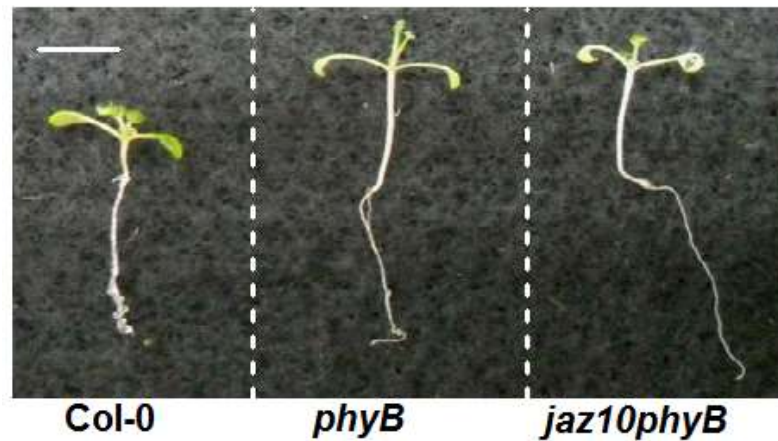


Figura 3.15: Fenotipo de la doble mutante *jaz10phyB*. Fotografía de una plántula de 10 días de *Arabidopsis* que muestra el fenotipo elongado, SAS, de la línea doble mutante *jaz10phyB*, que es similar al fenotipo de las plantas simples mutantes de *phyB*.

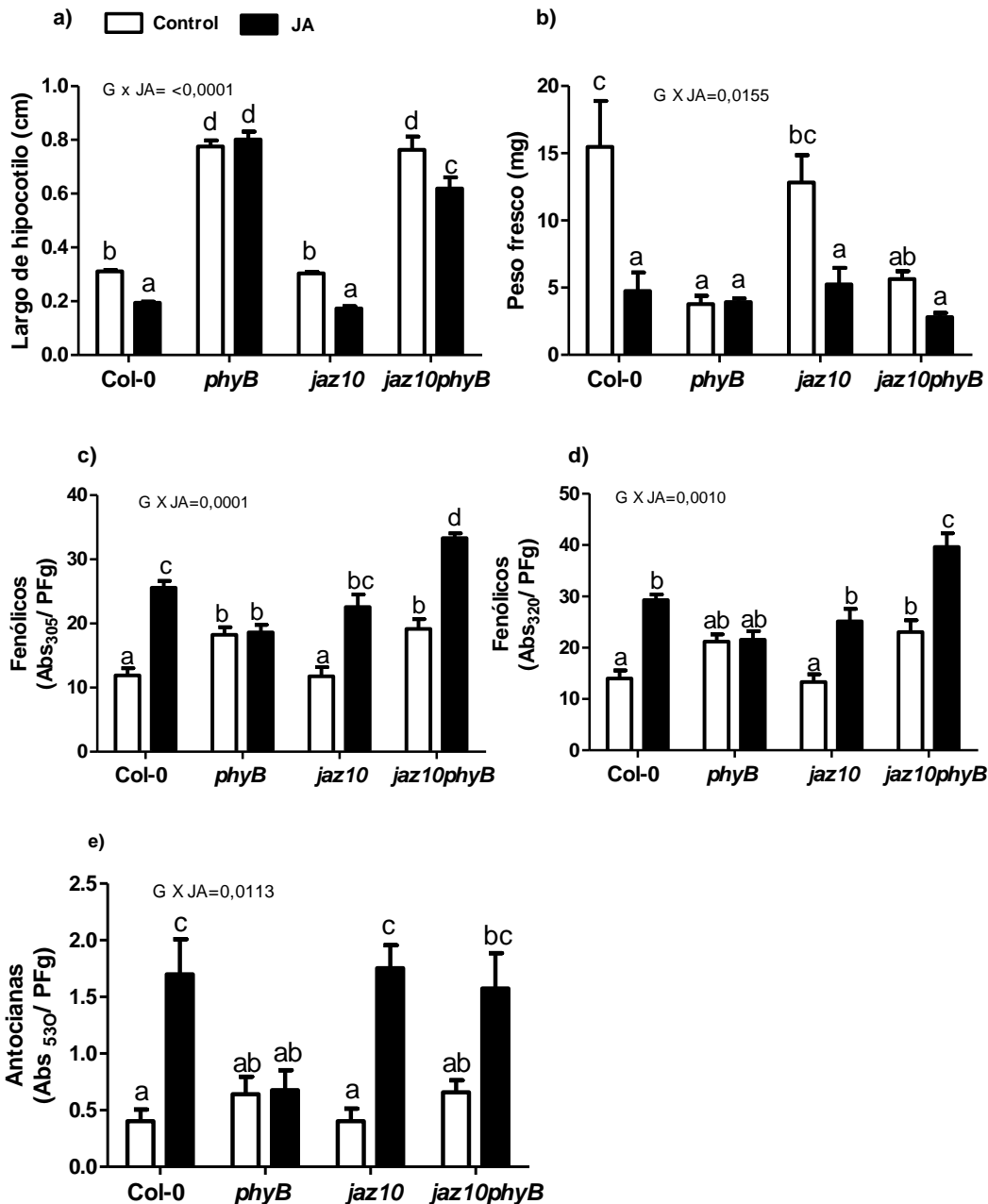


Figura 3.16: La mutación *jaz10* rescata el fenotipo de insensibilidad a JA que observamos en la mutante *phyB*. a) Largo de hipocotilo. b) Peso fresco. c) d) Acumulación de compuestos fenólicos. e) Acumulación de antocianinas.). G, genotipo; JA: Metil-jasmonato; Abs₅₃₀: absorbancia a 530nm; Abs₃₀₅: absorbancia a 305nm; Abs₃₂₀: absorbancia a 320nm; PF: peso fresco; Col-0: genotipo salvaje; *phyB*: mutantes de *phyB*; *jaz10*: mutantes de *jaz10*; *jaz10phyB*: dobles mutantes de *jaz10* y *phyB*. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES (n=5). Cuando la interacción entre GxJA fue significativa las medias se analizaron por separado usando el test de Tukey, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos de Largo de hipocotilo y peso fresco fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA.

El fenotipo de respuesta a JA en las plantas doble mutantes *jaz10.1phyB* fue evaluado en las distintas variables: largo de hipocotilo y peso fresco (crecimiento) y acumulación de compuestos fenólicos y antocianinas (defensa) y encontramos que la falta de JAZ10 le devuelve a la mutante *phyB* la capacidad de respuesta a JA en todas las variables medidas (Figura 3.16).

En conjunto, podemos concluir que es necesaria la presencia de JAZ10 funcional para la expresión del efecto inhibitorio de las respuestas a JA causado por la inactivación del *phyB*.

3.12 Las síntesis de GA serían requeridas para que bajas relaciones R:RL disminuyan la sensibilidad a JA

Las GAs y los JAs regulan antagónicamente el crecimiento y la defensa mediante la alteración del equilibrio entre las proteínas DELLAs y JAZs. Las GAs reprimen la vía de señalización de los JAs (Navarro et al. 2008) y la evidencia indica que esta represión es dependiente de la degradación de las DELLAs, lo que hace que las proteínas JAZ estén más disponibles para reprimir las respuestas a JA (Hou et al. 2010). Los experimentos realizados en esta tesis nos permitieron determinar que el RL reprime el efecto de JA en algunas variables de crecimiento y defensa. Pensamos que podría ser factible que las GAs estuviesen involucradas en determinar el efecto de bajas relaciones R:RL sobre la sensibilidad a JA. En primer lugar realizamos experimentos con plantas salvajes (Col-0) tratadas con GA e inhibiendo la síntesis de GA con PAC en plantas expuestas a RL (Figura 3.17)

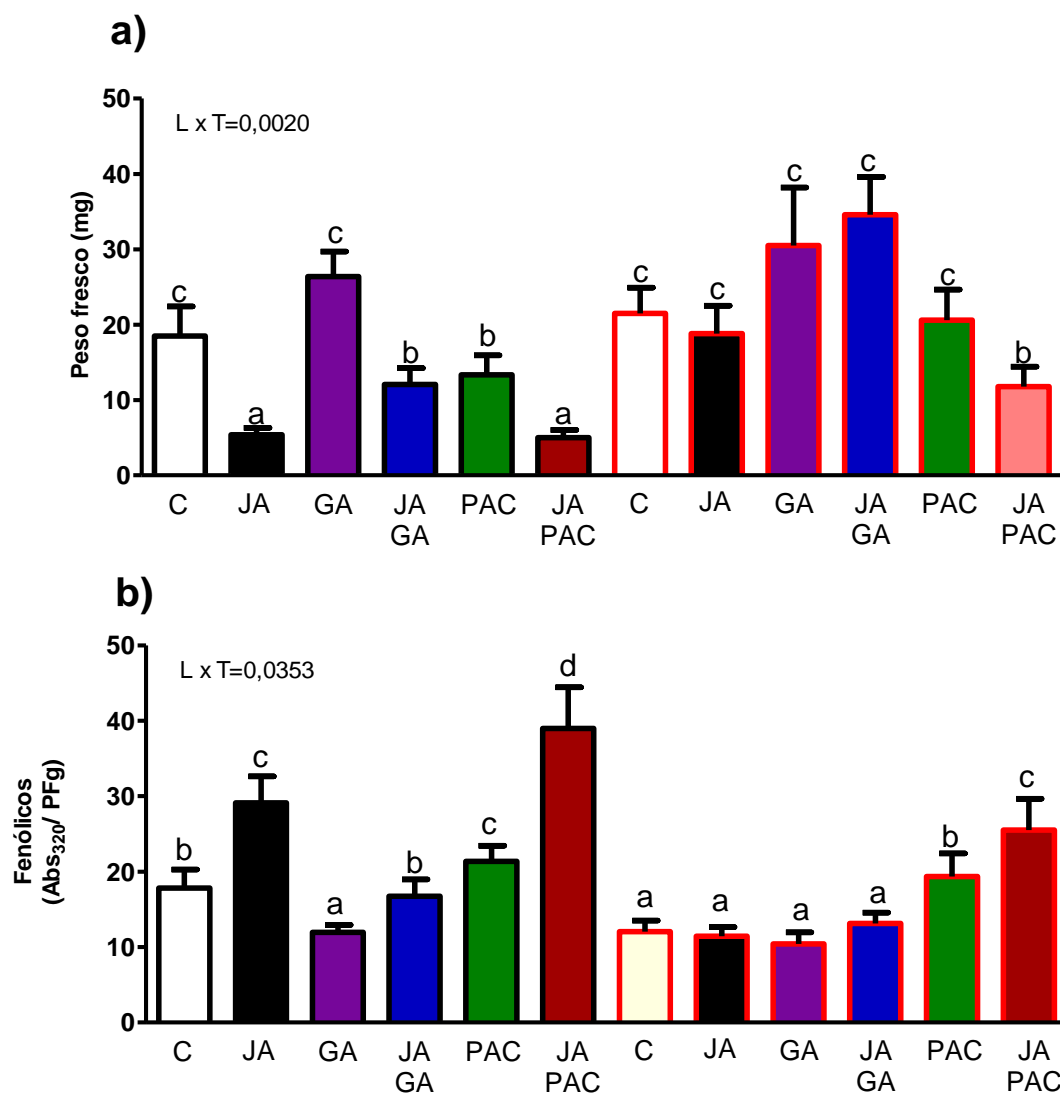


Figura 3.17: GA suprime las respuestas inducidas por JA, y la síntesis de GA es necesaria para que se manifieste el efecto represor de RL sobre las respuestas a JA. Las plantas fueron crecidas bajo luz blanca (LB) ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 7 días y luego fueron expuestas a los tratamientos de LB o RL (Rojo Lejano) durante 5 días; en el día 3 de tratamiento se agregó GA (Giberelinas)/ PAC (paclobutrazol)/ MeJA (metil-jasmonato) o las combinaciones de hormonas al medio donde estaban creciendo. Finalmente, fueron cosechadas a los 14 días. a) Las giberelinas eliminan la inhibición de crecimiento inducida por JA. b) GA suprime la acumulación de compuestos fenólicos promovida por la vía JA. El efecto del RL, disminuyendo las respuestas a JA, es cancelado mediante la inhibición de la biosíntesis de GA con paclobutrazol (PAC) en la inhibición del peso fresco (a) y en la acumulación de compuestos fenólicos (b). L: tratamiento lumínico; T: tratamiento hormonal. (n=3). Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES. Las barras con bordes negros representan los plantas expuestas a luz blanca y las barras con bordes rojos representan las plantas expuestas a luz blanca y suplementadas con luz rojo lejano. Las medias se analizaron por separado usando el test de DGC, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA. C: plantas control.

El agregado de GA suprime el efecto de JA como inhibidor del crecimiento (Fig. 3.17 a) y disminuye la acumulación de compuestos fenólicos promovida también por la vía JA (Fig. 3.17b). En este sentido, los efectos de GA son semejantes a los de RL. Más aún, el efecto del RL, disminuyendo la sensibilidad de los tejidos a JA, es eliminado cuando se inhibe la síntesis de GA, utilizando PAC, y los compuestos fenólicos se ven aumentados (Fig. 3.17 b).

Estos experimentos sugieren que el efecto de bajas relaciones R:RL, como supresoras de las respuestas a JA, requiere de la biosíntesis de GA.

3.13 Las GAs promueven la estabilización de la proteína represora JAZ10

Las relaciones R:RL reprimen las respuestas a JA mientras que promueven la señalización de GA (Ballaré 2014). El JA provoca una rápida degradación de las proteínas JAZ, incluyendo JAZ10 (Figura 3.9 c) (Chini et al. 2007, Thines et al. 2007, Browse 2009, Fonseca et al. 2009, Pauwels and Goossens 2011) y este efecto puede ser retardado por la inactivación de phyB generada por la suplementación con RL o por mutación del phyB (Figura 3.2) (Chen et al. 2012, Leone et al. 2014). Para comprender mejor los mecanismos por los cuales las bajas relaciones R: RL antagonizan la vía JA, decidimos estudiar el rol de las GAs sobre la estabilidad de JAZ10. Para ello, llevamos a cabo experimentos con las líneas transgénicas *35S::JAZ10-GUS* (Figura 3.18 a y c).

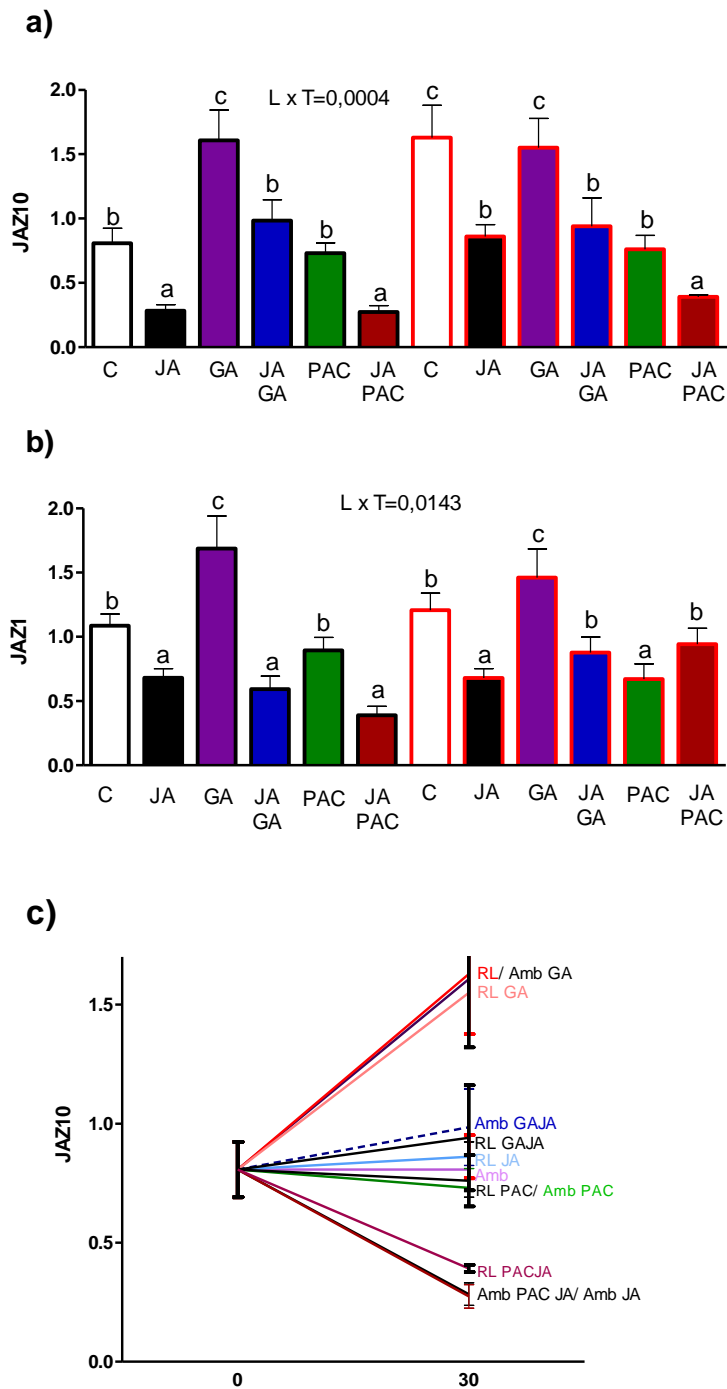


Figura 3.18: Las GAs aumentan los niveles de proteínas JAZ10 y JAZ1. a) y b) Actividad enzimática representada en gráficos de barras de las líneas 35S::JAZ10GUS y 35S::JAZ1GUS, respectivamente. L: tratamiento lumínico; T: tratamiento hormonal. (n=3). Las medias se analizaron por separado usando el test de DGC, las distintas letras indican diferencias significativas entre las medias de los distintos tratamientos. Los datos fueron transformados para cumplir con los supuestos del ANOVA. C: plantas control. Las barras con bordes negros representan las plantas expuestas a luz blanca y las barras con bordes rojos representan las plantas expuestas a luz blanca y suplementadas con luz rojo lejano. Las barras representan la media de cada tratamiento +1 ES. c) Actividad enzimática representada en gráfico de cinética (0 y 30 minutos) de la línea 35S::JAZ10GUS. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 12 días con luz blanca. Las plantas fueron tratadas con MeJA, GA, PAC (20 μ M) con una solución control y fueron transferidas a los tratamientos lumínicos: luz blanca o luz blanca más rojo lejano. Después de 30' fueron cosechadas para medir actividad enzimática de β -glucuronidasa (GUS).

Encontramos que las GAs, al igual que las bajas relaciones R:RL, aumentan los niveles de JAZ10-GUS (Figura 3.18 a y c) en comparación con las plántulas control (no tratadas con JA) y revierten el efecto de JA sobre la estabilidad de JAZ10-GUS. Más aún, este efecto protector de bajas relaciones R: RL sobre JAZ10, pudo ser cancelado inhibiendo la síntesis de GA por el agregado de PAC JAZ10-GUS (Figura 3.18 a y c). Hou et al. (2010) observaron que las GAs no afecta la estabilidad de JAZ1-GUS en tejido de la raíz a diferencia de lo que observamos en nuestros experimentos (Figura 3.18 b). Los niveles de JAZ1-GUS son mayores en plantas tratadas con GA.

Estos resultados indican que las GAs aumentan la estabilidad de las proteínas JAZ10 y JAZ1 (en menor grado) y retardan la degradación inducida por JA (sobre las proteínas JAZ10). Las GAs cumplen un rol importante en el mecanismo por el cual la radiación RL reprime las defensas inducidas por JA en condiciones de sombreado, ya que promueven la degradación de las DELLAs y, de ese modo, liberan a las JAZ dejándolas en condiciones de reprimir la vía JA. Según estos últimos experimentos, parecería haber un mecanismo adicional por el que GA reprime las respuestas a JA y éste sería dependiente de la estabilización de proteínas JAZ.

CAPÍTULO 4

Discusión

Capítulo 4. Discusión

La disminución de la sensibilidad a JA producida por las bajas relaciones R: RL, es uno de los mecanismos por los cuales las plantas intolerantes a la sombra redirigen recursos de la defensa hacia un rápido crecimiento cuando se enfrentan a un mayor riesgo de competencia. Esta re-dirección de recursos tiene importantes implicancias para la sanidad de los cultivos en entornos agrícolas (Ballaré et al. 2012). Los experimentos llevados a cabo en esta tesis, sugieren que las bases moleculares de esta reducción de la sensibilidad a JA, en plantas expuestas a bajas relaciones R: RL, implican un cambio en el equilibrio entre las proteínas DELLA y JAZ, lo que resulta en la represión de la vía JA. La rápida degradación de las proteínas DELLA, demostrada en esta tesis con RGA (Figura 3.7), nos sugiere un mecanismo por el cual la inactivación del phyB en canopeos densos disminuye la expresión de la respuesta a JA (defensas).

En esta tesis demostramos que: 1) para 5 variables medidas conectadas con crecimiento (largo de hipocotilo y peso fresco) y defensas putativas (acumulación de compuestos fenólicos y antocianinas), la mutante *5xdella* fue similar a la mutante *phyB* en cuanto a la pérdida de respuesta a JA (Figuras 3.4 y 3.2, respectivamente), y que la mutante *gai-1*, que codifica una versión estable de una de las proteínas DELLA (GAI), falla en responder a las bajas relaciones R:RL y no muestra una sensibilidad reducida a JA (Figura 3.8). Este último resultado sugiere que, al menos para las variables fisiológicas medidas en esta tesis, la estabilización de GAI es suficiente para eliminar el efecto de las bajas relaciones R: RL.

Las proteínas DELLAs regulan positivamente las defensas (Navarro et al. 2008) al interferir con la capacidad de las proteínas represoras JAZ (Hou et al. 2010). Por lo tanto, debido a la rápida degradación de las proteínas DELLAs, activada por las bajas relaciones R:RL que demostramos en esta tesis (Figura 3.7), se prevé que las proteínas JAZ serían liberadas de los complejos JAZ-DELLA, y esto facilitaría la represión de las respuestas a JA (Figura 4.1). Además de la reducción de la abundancia de las DELLAs, las bajas proporciones de R:RL aumentarían la disponibilidad de factores de transcripción, PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIF), los cuales son inactivados en presencia de la forma activa de phyB (Lorrain et al. 2008, Hornitschek et al. 2012, Li et al. 2012). Como los PIF también interactúan con las DELLAs y son reprimidos por las mismas (de Lucas et al. 2008, Feng et al. 2008) un aumento en los niveles de la proteína PIF generado por las bajas relaciones R: RL, generaría una reducción en el número de moléculas DELLA disponibles para la interacción con JAZ, y esta interacción disminuida se traducirá en más represión de las respuestas JA (Figura 4.1). La represión de las respuestas JA por las bajas relaciones R: RL no se produce únicamente por los cambios en la disponibilidad de las proteínas DELLA. Nosotros encontramos que los tratamientos con RL producen el aumento de los niveles de proteína JAZ10-GUS (Figura 3.9) lo que es consistente con un trabajo recientemente publicado (Chico et al. 2014). Este aumento en la estabilidad de JAZ10 podría tener un efecto importante en la atenuación de las respuestas a los JAs, como lo demuestran nuestros experimentos utilizando la mutante nula *jaz10* (Figura 3.11). No nos queda muy en claro, porque no encontramos estabilización en la proteína JAZ1-GUS (Figura 3.10), a diferencia de lo reportado en otro trabajo (Chico et al. 2014); la diferencia podría estar relacionada con el uso de diferentes líneas 35S::JAZ1-GUS o deberse a que en los tratamientos de R: RL utilizados por Chico et al. (2014) la proporción de R: RL (0,2) fue menor que la utilizada en nuestros ensayos (0,55). Es importante destacar que otro nivel de regulación es la desestabilización de los factores de transcripción MYC, en condiciones de bajo R: RL, que también podría contribuir de

forma directa con la atenuación de las respuestas a los JAs (Chico et al. 2014) (Figura 4.1).

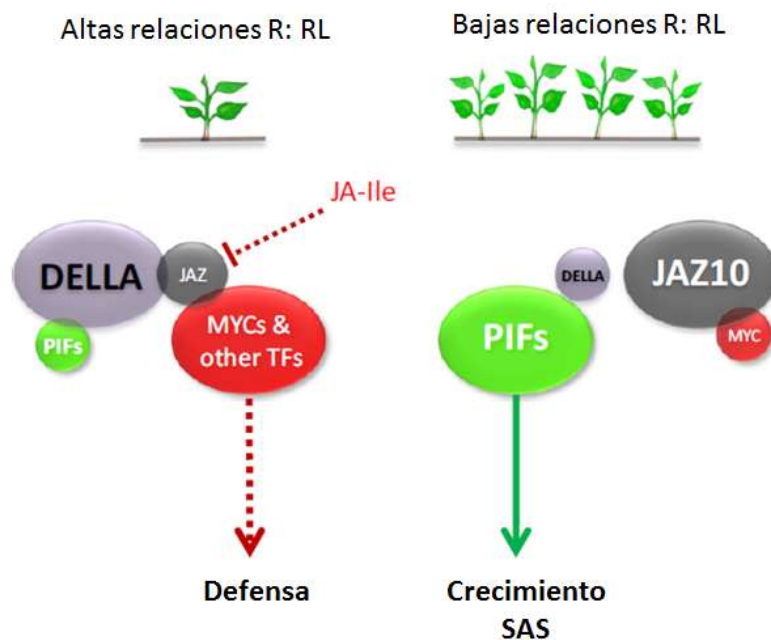


Figura 4.1: Modelos de mecanismos por los cuales las bajas relaciones R: RL disminuye la sensibilidad a los JAs. Cuando las plantas son expuestas a altas relaciones R: RL, aumentan los niveles de phyBPfr y se reduce la actividad de los factores de transcripción PIF (que interactúan con el fitocromo) (Lorrain et al. 2008, Hornitschek et al. 2012, Li et al. 2012, Park et al. 2012). Los PIF son inhibidos por las proteínas DELLAs (de Lucas et al. 2008, Feng et al. 2008) que, a su vez, reclutan a las proteínas JAZ impidiendo que repriman a los factores de transcripción blanco, como por ejemplo los MYCs (Hou et al. 2010). Bajo estas condiciones, el crecimiento y la elongación del hipocotilo son reprimidos y las respuestas de defensas inducidas por la vía JA son rápidamente activadas. Cuando las relaciones R: RL son bajas, los niveles de PIF aumentan y las proteínas DELLAs son degradadas rápidamente (Figura 3.7), promoviendo la aparición del SAS. La degradación promueve la liberación (Chico et al. 2014) y la estabilización de las proteínas JAZ (Figura 3.9) impulsando la represión de los factores de transcripción que inducen la defensa. JA-ile: Jasmonyl-isoleucina; JAZ: Jasmonate ZIM Domain; PIF: PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR; TF: factores de transcripción; SAS: Shade Avoidance Syndrome. Adaptado de (Ballaré 2014).

La familia de proteínas JAZ es numerosa y en *Arabidopsis* se conocen 13 genes que codifican para las 13 proteínas y varios estudios genéticos han revelado una gran redundancia funcional entre las diversas proteínas. Las plantas de *Arabidopsis* mutantes *knockouts* simples en los loci JAZ1, JAZ2, JAZ5, JAZ7 y JAZ9 no muestran fenotipos sensibles a los JAs (Thines et al. 2007, Demianski et al. 2012). Sin embargo, en *Populus*, la estabilización de una sola proteína JAZ (Pt JAZ6) parecería ser suficiente para bloquear la señalización JA durante el mutualismo entre esta planta y el hongo *Laccaria bicolor* (Plett et al. 2014).

La interacción de las DELLAs con varias proteínas JAZ, incluidas JAZ1, JAZ3, JAZ4, JAZ9, JAZ10 y JAZ11, ha sido evidenciada y diferentes trabajos muestran que las JAZ interactúan fuertemente con los dominios conservados GRAS de las proteínas DELLAs (Hou et al. 2010, Yang et al. 2012). Nosotros nos enfocamos en JAZ10 ya que estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que el efecto

del RL, aumentando la sensibilidad de *Arabidopsis* al hongo necrótrofo *Botrytis cinerea*, estaba perdido en la mutante *jaz10* y en las dos líneas ARNi (que poseen interrumpida la expresión de *JAZ10*) (Cerrudo et al. 2012, Cargnel et al. 2014). Los resultados que surgieron de esta tesis, claramente demuestran que *JAZ10* es requerida para mediar la acción represiva que ejercen las bajas relaciones R: RL sobre algunas respuestas a los JAs (Figura 3.11). Además mostramos que la baja sensibilidad que poseen las plantas de *Arabidopsis*, mutantes en *phyB*, a MeJA puede ser recuperada con el agregado de la mutación *jaz10*, aunque la presencia de la mutación no revierta el fenotipo constitutivo SAS de la mutante *phyB* (Figura 3.16). Otras mutaciones evaluadas en nuestros experimentos (*jaz8* y *jaz9*) no mostraron un fenotipo insensible a RL para la represión de la respuesta a JA (Figuras 3.13 y 3.14). En conjunto, la evidencia genética obtenida en esta tesis indica que la proteína *JAZ10* juega un papel importante en el vínculo entre la inactivación de *phyB* y la atenuación de las respuestas a los JAs en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Las GAs disminuyen la sensibilidad de los tejidos a JA aumentando la degradación de las proteínas DELLAs y liberando a las JAZ para reprimir la respuesta a JA (Hou et al. 2010). Nuestros resultados sugieren que, además de actuar por este mecanismo, las GAs estarían afectando la sensibilidad a JA por una estabilización de las proteínas JAZ (Figura 3.18 a y c). Este es un mecanismo nuevo de regulación que requiere de mayor estudio para comprender sus bases moleculares pero representa un pie inicial que nos abre otras puertas para avanzar en la comprensión de las interacciones de las vías de señalización vinculadas al crecimiento y la defensa.

La capacidad de percibir las señales lumínicas del entorno permite a las plantas realizar ajustes fisiológicos y morfológicos frente a cambios en las condiciones de crecimiento en ambientes altamente dinámicos. Comprender en profundidad como las plantas detectan a sus vecinas y activan los mecanismos de respuesta a la densidad de la población podría llevar al desarrollo de estrategias de mejoramiento y tecnologías de producción para aumentar el rendimiento de los cultivos. En estos últimos años se han obtenido muchos avances en los mecanismos que regulan las respuestas SAS, pero quedan varias cuestiones abiertas que requieren estudios adicionales.

El entendimiento de cómo las plantas activan mecanismos regulatorios que les permiten ajustar su funcionamiento en respuesta a las señales del ambiente que las rodea constituye uno de los temas de investigación que se encuentra en continuo progreso. El mecanismo presentado en esta tesis, en conjunto con los trabajos citados, permiten ampliar el conocimiento sobre las interacciones moleculares entre las vías de señalización asociadas al crecimiento y la defensa.

Comprender los mecanismos moleculares y fisiológicos de estas interacciones puede proveer las herramientas futuras para obtener cultivares de importancia económica que resistan mejor el ataque de insectos y microorganismos patógenos en diversas condiciones de cultivo, incluyendo condiciones de alta densidad como la que prevalecerán en la agricultura intensiva del corriente siglo.

CAPÍTULO 5

Conclusiones generales

Capítulo 5. Conclusiones generales

La disminución en la señalización de los JAs en condiciones lumínicas que indiquen un alto riesgo de competencia ha sido documentada para una amplia gama de respuestas fisiológicas en varias especies. Usando un conjunto de variables que responden ante la inducción con MeJA en plantas jóvenes de *Arabidopsis*, nosotros concluimos que la degradación de las proteínas DELLA y el aumento en la estabilidad de JAZ10 juegan un rol importante en los mecanismos moleculares por los cuales la señalización JA es reprimida en plantas expuestas a bajas relaciones R: RL. La evidencia obtenida en esta tesis, sumada a otros estudios recientes sugiere que la regulación de las respuestas a JA por señales de competencia tiene numerosos niveles de control que incluyen: un pool reducido de proteínas DELLA disponibles para interactuar con las proteínas represoras JAZ; un aumento de la estabilidad de las JAZ; un incremento en la estabilidad y/o actividad de los PIFs (promotores del crecimiento) y una pérdida en la estabilidad de los MYCs (promotores de la defensa). Además, estudios recientes han sugerido que el efecto de la inactivación de phyB es local, restringido a la porción de la planta expuesta al RL (Izaguirre et al. 2013). Esta regulación local y en múltiples niveles moleculares puede proporcionar un mecanismo poderoso para definir la fuerza de las respuestas de defensa mediadas por JA en función de la intensidad y de la distribución espacial de las señales lumínicas que indica una amenaza de competencia.

Como primer hipótesis en esta tesis, planteamos que la de-sensibilización de los tejidos frente a JA está mediada principalmente por la inactivación del phyB (Moreno et al. 2009) pero involucraría la participación de otros fitocromos estables (phyD y phyE) (Franklin and Quail 2010). Para ello realizamos experimentos con plantas mutantes de phyB y triples mutantes *phyBDE*. Esta hipótesis es aceptada parcialmente ya que encontramos en la simple mutante una pérdida completa de efectividad del RL, como señal de de-sensibilización frente a JA.

La segunda hipótesis que planteamos fue que la de-sensibilización de los tejidos a los JAs involucra un aumento de la degradación de las proteínas DELLAs. Las GAs, actuando a través de las proteínas DELLAs, están involucradas en la regulación de los mecanismos de defensa, al interactuar con la vía de señalización de los JAs (Cheng et al. 2004, Hou et al. 2008, Navarro et al. 2008, Hou et al. 2010, Wild and Daviere 2012, Yang et al. 2012). Contábamos con evidencia que las DELLAs son degradadas en órganos que se encuentran alargándose rápidamente frente a bajas relaciones R:RL (hipocotilos y pecíolos) (Djakovic-Petrovic et al. 2007) pero no había estudios previos de la dinámica de DELLAs a nivel de planta entera que permitieran explicar los efectos rápidos de la inactivación de phyB sobre la expresión de genes de defensa. Para abordar el rol de las DELLAs, comenzamos evaluando el efecto de las bajas relaciones R:RL sobre la sensibilidad a JA en mutantes *della* (tanto mutantes nulos como de ganancia de función) y, el efecto de bajas relaciones R:RL sobre la degradación de las proteínas de interés. Estos resultados sugieren que una o más proteínas DELLA (no RGL3) son requeridas para las respuestas de inhibición de crecimiento (largo de hipocotilo y peso fresco) y activación de defensas (acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos) inducidas por los JAs. También encontramos que la degradación de las proteínas DELLAs cumple un rol en la disminución de la sensibilidad a JA, generada por la inactivación del phyB o por exposición a bajas relaciones R: RL, por lo cual, la H2 es aceptada.

Como tercera hipótesis postulamos que la de-sensibilización de los tejidos a JAs, generada por las bajas relaciones de R: RL, involucra la estabilización de las proteínas JAZ. Basándonos en los resultados de Cerrudo et al. (2012) y Cargnel et al. (2014), quienes encontraron que JAZ10 es necesaria para los efectos del RL reduciendo la resistencia de *Arabidopsis* al patógeno *B. cinerea*, evaluamos la estabilidad de JAZ10 en plantas 35S::JAZ10-GUS. Los resultados presentados en ésta tesis sugieren que las bajas relaciones R:RL promueven la estabilización o retardan la degradación de la proteína JAZ10, aún en presencia de JA. En conjunto, los resultados sugieren que únicamente JAZ10 jugaría un rol preponderante en el mecanismo por el que las bajas relaciones R:RL reprimen la vía de señalización de JA. La H3 es aceptada.

La cuarta hipótesis fue que la de-sensibilización de los tejidos frente a JA podría involucrar la estabilización de otras proteínas JAZ. La familia de proteínas JAZ está compuesta por 13 miembros en *Arabidopsis thaliana* (JAZ1-JAZ13) (Chini et al. 2007, Staswick 2008, Pauwels and Goossens 2011, Thireault et al. 2015). En experimentos realizado en esta tesis y en el laboratorio, hemos documentado que las bajas relaciones R:RL generan una estabilización de la proteína JAZ10 (Cerrudo et al. 2012). JAZ8 es estable a la degradación inducida por JA (Shyu et al. 2012) y JAZ9 interacciona con el dominio GRAS de RGA, una de las proteínas DELLAs (Hou et al. 2010, Yang et al. 2012). Basándonos en esto, decidimos evaluar si la inactivación por mutaciones en los genes que codifican para dichas proteínas, revierten el fenotipo de insensibilidad a JA que observamos en plantas expuestas a bajas relaciones R:RL. Llevamos a cabo experimentos con dos genotipos mutantes, *jaz8* y *jaz9-1*, de *Arabidopsis thaliana* y medimos las variables de crecimiento y defensa en respuesta los tratamientos con RL y JA. Ambas líneas mutantes presentan una respuesta al RL similar al genotipo salvaje Col-0 y no parecen ser insensibles al RL. Estos resultados sugieren que, a diferencia de JAZ10, estas proteínas no son necesarias para disminuir la sensibilidad a JA en condiciones lumínicas que inactivan al phyB. La H4 no es aceptada al menos para estas proteínas.

La última hipótesis planteada fue que la de-sensibilización de los tejidos a JA involucraría a las GAs, por un mecanismo independiente de degradación de proteínas DELLAs. Las GAs y los JAs regulan antagonicamente el crecimiento y las defensas mediante la alteración del equilibrio entre las proteínas DELLAs y JAZs. GA reprime la vía de señalización de JA (Navarro et al. 2008) y la evidencia indica que ésta represión es dependiente de la degradación de las DELLAs, lo que hace que las proteínas JAZ estén más disponibles para reprimir las respuestas a JA (Hou et al. 2010). Para comprender un poco mejor los mecanismos por los cuales las bajas relaciones R: RL antagonizan la vía JA, decidimos estudiar el rol de las GAs sobre el balance de las proteínas JAZ10 y JAZ1. Para ello realizamos experimentos con plantas transgénicas que expresan los constructos 35S::JAZ10-GUS y 35S::JAZ1-GUS, tratadas con GA y PAC. Encontramos que las GAs cumplen un rol importante en el mecanismo por el cual la radiación RL reprime las defensas inducidas por JA en condiciones de sombreado y según nuestros últimos experimentos podría existir un mecanismo alternativo independiente de la degradación de las DELLAs y dependiente de la estabilización de proteínas JAZ. La H5 es aceptada.

Como conclusión general, podemos decir que no parece existir un único mecanismo que explique la disminución de la sensibilidad a JA por las bajas relaciones R:RL, sino que la represión se produciría por cambios en el balance de proteínas represoras (DELLA y JAZs) y factores de transcripción que activan el crecimiento (PIFs) y las defensas (MYCs) (Figura 4.1). Un camino a seguir como continuación de

los resultados presentados en este trabajo sería explorar en mayor profundidad la interacción entre estas dos vías de crecimiento y defensa, con el fin de adquirir un grado mayor de conocimiento que permita aplicar modificaciones en los cultivos a gran escala de modo de garantizar la expresión del sistema de defensas en un amplio rango de densidades de siembra.

Bibliografía

- Achard, P. and P. Genschik. 2009. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* **60**:1085-1092.
- Achard, P., L. Liao, C. Jiang, T. Desnos, J. Bartlett, X. Fu, and N. P. Harberd. 2007. DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol* **143**:1163-1172.
- Agrawal, A. A. 1998. Induced responses to herbivory and increased plant performance. *Science* **279**:1201 - 1202.
- Arimura, G., K. Matsui, and J. Takabayashi. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol* **50**:911-923.
- Baldwin, I. T. 1998. Jasmonate-induced responses are costly but benefit plants under attack in native populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**:8113 - 8118.
- Ballaré, C. L. 1999. Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms. *Trends Plant Sci* **4**:201.
- Ballaré, C. L. 2009. Illuminated behaviour: phytochrome as a key regulator of light foraging and plant anti-herbivore defence. *Plant, Cell & Environment* **32**:713-725.
- Ballaré, C. L. 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science* **16**:249-257.
- Ballaré, C. L. 2014. Light regulation of plant defense. *Annu Rev Plant Biol* **65**:335-363.
- Ballaré, C. L., C. A. Mazza, A. T. Austin, and R. Pierik. 2012. Canopy light and plant health. *Plant Physiology* **160**:145-155.
- Bevan, M., Walsh, S. 2005. The Arabidopsis genome: A foundation for plant research. *Genome Research* **15**:1632–1642.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Briggs, W. R. and J. M. Christie. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**:204-210.
- Browse, J. 2009. Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* **60**:183-205.
- Browse, J. and G. A. Howe. 2008. New Weapons and a Rapid Response against Insect Attack. *Plant Physiology* **146**:832–838.
- Cargnel, M. D., P. V. Demkura, and C. L. Ballaré. 2014. Linking phytochrome to plant immunity: low red : far-red ratios increase Arabidopsis susceptibility to *Botrytis cinerea* by reducing the biosynthesis of indolic glucosinolates and camalexin. *New Phytol* **204**:342-354.
- Casal, J. 2013. Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade. *Annual Review of Plant Biology* **64**:8.1–8.25.
- Casal, J. J., S. R. A., and J. F. Botto. 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* **49**:127-138.
- Cerrudo, I., M. M. Keller, M. D. Cargnel, P. V. Demkura, M. de Wit, M. S. Patitucci, R. Pierik, C. M. Pieterse, and C. L. Ballaré. 2012. Low Red/Far-Red Ratios Reduce Arabidopsis Resistance to *Botrytis cinerea* and Jasmonate Responses via a COI1-JAZ10-Dependent, Salicylic Acid-Independent Mechanism. Pages 2042–2052 *Plant Physiology*.

- Cipollini, D. 2004. Stretching the limits of plasticity: can a plant defend against both competitors and herbivores? *Ecology* **85**:28-37.
- Cipollini, D. F., C. B. Purrington, and J. Bergelson. 2002. Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied Ecology* **4**:79 - 85.
- Chen, J., K. Sonobe, N. Ogawa, S. Masuda, A. Nagatani, Y. Kobayashi, and H. Ohta. 2012. Inhibition of arabidopsis hypocotyl elongation by jasmonates is enhanced under red light in phytochrome B dependent manner. *J Plant Res* **126**:161-168.
- Chen, J., K. Sonobe, N. Ogawa, S. Masuda, A. Nagatani, Y. Kobayashi, and H. Ohta. 2013. Inhibition of arabidopsis hypocotyl elongation by jasmonates is enhanced under red light in phytochrome B dependent manner. *J Plant Res* **126**:161-168.
- Cheng, H., L. Qin, S. Lee, X. Fu, D. E. Richards, D. Cao, D. Luo, N. P. Harberd, and J. Peng. 2004. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**:1055-1064.
- Cheyrier, V., G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, and S. Martens. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem* **72**:1-20.
- Chico, J. M., G. Fernandez-Barbero, A. Chini, P. Fernandez-Calvo, M. Diez-Diaz, and R. Solano. 2014. Repression of Jasmonate-Dependent Defenses by Shade Involves Differential Regulation of Protein Stability of MYC Transcription Factors and Their JAZ Repressors in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**:1967-1980.
- Chini, A., S. Fonseca, G. Fernandez, B. Adie, J. M. Chico, O. Lorenzo, G. Garcia-Casado, I. Lopez-Vidriero, F. M. Lozano, M. R. Ponce, J. L. Micol, and R. Solano. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**:666-671.
- Chung, H. S., T. F. Cooke, C. L. Depew, L. C. Patel, N. Ogawa, Y. Kobayashi, and G. A. Howe. 2010. Alternative splicing expands the repertoire of dominant JAZ repressors of jasmonate signaling. *Plant J* **63**:613-622.
- Chung, H. S. and G. A. Howe. 2009. A critical role for the TIFY motif in repression of jasmonate signaling by a stabilized splice variant of the JASMONATE ZIM-domain protein JAZ10 in Arabidopsis. *Plant Cell* **21**:131-145.
- de Lucas, M., J.-M. Daviere, M. Rodriguez-Falcon, M. Pontin, J. M. Iglesias-Pedraz, S. Lorrain, C. Fankhauser, M. A. Blazquez, E. Titarenko, and S. Prat. 2008. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**:480-484.
- de Wit, M., S. Spoel, G. Sanchez-Perez, C. Gommers, C. Pieterse, L. Voesenek, and P. R. 2013. Perception of low red:far-red ratio compromises both salicylic acid- and jasmonic acid-dependent pathogen defences in Arabidopsis. *Plant Journal* **75**:90-103.
- Delker, C., I. Stenzel, B. Hause, O. Miersch, I. Feussner, and C. Wasternack. 2006. Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**:297-306.
- Demianski, A. J., K. M. Chung, and B. N. Kunkel. 2012. Analysis of Arabidopsis JAZ gene expression during Pseudomonas syringae pathogenesis. *Mol Plant Pathol* **13**:46-57.
- Demkura, P. V., G. Abdala, I. T. Baldwin, and C. L. Ballare. 2010. Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* **152**:1084-1095.
- Dicke, M. 2009. Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ* **32**:654-665.

- Dill, A. and T. Sun. 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**:777-785.
- Djakovic-Petrovic, T., M. de Wit, L. A. Voesenek, and R. Pierik. 2007. DELLA protein function in growth responses to canopy signals. *Plant Journal* **51**:117-126.
- Feng, S., C. Martinez, G. Gusmaroli, Y. Wang, J. Zhou, F. Wang, L. Chen, L. Yu, J. M. Iglesias-Pedraz, S. Kircher, E. Schafer, X. Fu, L.-M. Fan, and X. W. Deng. 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**:475-479.
- Feussner, I. and C. Wasternack. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**:275-297.
- Fonseca, S., A. Chini, M. Hamberg, B. Adie, A. Porzel, R. Kramell, O. Miersch, C. Wasternack, and R. Solano. 2009. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat Chem Biol* **5**:344-350.
- Franklin, K. A. 2008. Shade avoidance. *New Phytologist* **179**:930-944.
- Franklin, K. A. and P. H. Quail. 2010. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**:11-24.
- Franklin, K. A. and J. R. Shinkle. 2009. PHOTOMORPHOGENESIS in NATURAL LIGHT ENVIRONMENTS
- Franklin, K. A. and G. C. Whitelam. 2005. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany* **96**:169-175.
- Fu, X. and N. P. Harberd. 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**:740-743.
- Fu, X., D. E. Richards, B. Fleck, D. Xie, N. Burton, and N. P. Harberd. 2004. The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**:1406-1418.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**:205-227.
- Griffiths, J., K. Murase, I. Rieu, R. Zentella, Z. L. Zhang, S. J. Powers, F. Gong, A. L. Phillips, P. Hedden, T. P. Sun, and S. G. Thomas. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**:3399-3414.
- Heil, M. 2008. Indirect defence via tritrophic interactions. *New Phytol* **178**:41-61.
- Heil, M. and I. T. Baldwin. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**:61 - 67.
- Heinrich, M., C. Hettenhausen, T. Lange, H. Wunsche, J. Fang, I. T. Baldwin, and J. Wu. 2013. High levels of jasmonic acid antagonize the biosynthesis of gibberellins and inhibit the growth of *Nicotiana attenuata* stems. *Plant J* **73**:591-606.
- Hermes, D. and W. Mattson. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**:283-335.
- Holmes, M. G. and H. Smith. 1977. THE FUNCTION OF PHYTOCHROME IN THE NATURAL ENVIRONMENT—II. THE INFLUENCE OF VEGETATION CANOPIES ON THE SPECTRAL ENERGY DISTRIBUTION OF NATURAL DAYLIGHT. *Photochemistry and Photobiology* **25**:539-545.
- Hornitschek, P., M. V. Kohnen, S. Lorrain, J. Rougemont, K. Ljung, I. Lopez-Vidriero, J. M. Franco-Zorrilla, R. Solano, M. Trevisan, S. Pradervand, I. Xenarios, and C. Fankhauser. 2012. Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J* **71**:699-711.

- Hou, X., L. Ding, and H. Yu. 2013. Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. *Plant Cell* **32**:1067-1074.
- Hou, X., W. W. Hu, L. Shen, L. Y. Lee, Z. Tao, J. H. Han, and H. Yu. 2008. Global identification of DELLA target genes during Arabidopsis flower development. *Plant Physiol* **147**:1126-1142.
- Hou, X., L. Y. Lee, K. Xia, Y. Yan, and H. Yu. 2010. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental Cell* **19**:884-894.
- Howe, G. A. and G. Jander. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* **59**:41-66.
- Huq, E., B. Al-Sady, M. Hudson, C. Kim, K. Apel, and P. H. Quail. 2004. Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **305**:1937-1941.
- Huq, E. and P. H. Quail. 2002. PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in Arabidopsis. *EMBO J* **21**:2441-2450.
- Izaguirre, M. M., C. A. Mazza, M. S. Astigueta, A. M. Ciarla, and C. L. Ballare. 2013. No time for candy: passionfruit (*Passiflora edulis*) plants down-regulate damage-induced extra floral nectar production in response to light signals of competition. *Oecologia* **173**:213-221.
- Izaguirre, M. M., C. A. Mazza, M. Biondini, I. T. Baldwin, and C. L. BallarÃ©. 2006. Remote sensing of future competitors: Impacts on plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:7170-7174.
- Jaime, R., P. J. Rey, J. M. Alcantara, and J. M. Bastida. 2013. Glandular trichomes as an inflorescence defence mechanism against insect herbivores in Iberian columbines. *Oecologia* **172**:1051-1060.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo journal* **6**:3901 -3907.
- Jiang, Y., G. Liang, S. Yang, and D. Yu. 2014. Arabidopsis WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *Plant Cell* **26**:230-245.
- Jiao, Y., O. S. Lau, and X. W. Deng. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet* **8**:217-230.
- Kami, C., S. Lorrain, P. Hornitschek, and C. Fankhauser. 2010. Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**:29-66.
- Kazan, K. and J. Manners. 2011. The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *J Exp Bot* **62**:4087-4100.
- Kazan, K. and J. M. Manners. 2012. JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**:22-31.
- Kazan, K. and J. M. Manners. 2013. MYC2: the master in action. *Mol Plant* **6**:686-703.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**:2141 - 2144.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2002a. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* **53**:299-328.
- Kessler, A. and I. T. Baldwin. 2002b. PLANT RESPONSES TO INSECT HERBIVORY: The Emerging Molecular Analysis. *Annual Review Plant Biology* **53**:299-328.
- Khanna, R., E. Huq, E. A. Kikis, B. Al-Sady, C. Lanzatella, and P. H. Quail. 2004. A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated

- phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**:3033-3044.
- Koornneef, A. and C. M. Pieterse. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol* **146**:839-844.
- Koornneef, M., A. Elgersma, C. J. Hanhart, E. P. van Loenen-Martinet, L. van Rijn, and J. A. D. Zeevaart. 1985. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **65**:33–39.
- Koornneef, M., Meinke, D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* **61**:909-921.
- Lee, S., H. Cheng, K. E. King, W. Wang, Y. He, A. Hussain, J. Lo, N. P. Harberd, and J. Peng. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development* **16**:646-658.
- Leivar, P., E. Monte, B. Al-Sady, C. Carle, A. Storer, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and P. H. Quail. 2008. The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* **20**:337-352.
- Leivar, P. and P. H. Quail. 2011a. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* **16**:19-28.
- Leivar, P. and P. H. Quail. 2011b. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Science* **16**:19-28.
- Leone, M., M. M. Keller, I. Cerrudo, and C. L. Ballare. 2014. To grow or defend? Low red : far-red ratios reduce jasmonate sensitivity in *Arabidopsis* seedlings by promoting DELLA degradation and increasing JAZ10 stability. *New Phytol* **204**:355-367.
- Li, L., K. Ljung, G. Breton, R. J. Schmitz, J. Pruneda-Paz, C. Cowing-Zitron, B. J. Cole, L. J. Ivans, U. V. Pedmale, H. S. Jung, J. R. Ecker, S. A. Kay, and J. Chory. 2012. Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* **26**:785-790.
- Lorrain, S., T. Allen, P. D. Duek, G. C. Whitelam, and C. Fankhauser. 2008. Phytochrome-mediated inhibition of shade avoidance involves degradation of growth-promoting bHLH transcription factors. *Plant Journal* **53**:312-323.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.
- Martinez-Garcia, J. F., M. Gallemi, M. J. Molina-Contreras, B. Llorente, M. R. Bevilaqua, and P. H. Quail. 2014. The shade avoidance syndrome in *Arabidopsis*: the antagonistic role of phytochrome a and B differentiates vegetation proximity and canopy shade. *PLoS ONE* **9**:e109275.
- McGinnis, K. M., S. G. Thomas, J. D. Soule, L. C. Strader, J. M. Zale, T. P. Sun, and C. M. Steber. 2003. The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**:1120-1130.
- Meinke, D., Cherry, JM., Dean, C., Rounsley, SD., Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Genome* **282**:662-682.
- Mewis, I., H. M. Appel, A. Hom, R. Raina, and J. C. Schultz. 2005. Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol* **138**:1149-1162.
- Michael Wild, Jean-Michel Davière, Soizic Cheminant, Thomas Regnault, Nicolas Baumberger, Dimitri Heintz, Rachel Baltz, Pascal Genschik, and P. Achard.

2012. The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell* **24**:3307–3319.
- Montgomery, B. L. and J. C. Lagarias. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**:357-366.
- Moreno, J., Shyu C, Campos ML, Patel LC, Chung HS, Yao J, He SY, and H. GA. 2013. Negative Feedback Control of Jasmonate Signaling by an Alternative Splice Variant of JAZ10 *Plant Physiology* **162**:1006-1017.
- Moreno, J. E., Y. Tao, C. J., and C. L. Ballaré. 2009. Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:4935-4940.
- Murase, K., Y. Hirano, T. P. Sun, and T. Hakoshima. 2008. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**:459-463.
- Nagy, F. and E. Schafer. 2002. Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**:329-355.
- Navarro, L., R. Bari, P. Achard, P. Lison, A. Nemri, N. P. Harberd, and J. D. Jones. 2008. DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* **18**:650-655.
- Ni, M., J. M. Tepperman, and P. H. Quail. 1999. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**:781-784.
- Oh, E., J. Kim, E. Park, J. I. Kim, C. Kang, and G. Choi. 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**:3045-3058.
- Olszewski, N., T. P. Sun, and F. Gubler. 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**:S61-80.
- Park, E., J. Park, J. Kim, A. Nagatani, J. C. Lagarias, and G. Choi. 2012. Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters. *Plant J* **72**:537-546.
- Pauwels, L., G. F. Barbero, J. Geerinck, S. Tilleman, W. Grunewald, A. C. Perez, J. M. Chico, R. V. Bossche, J. Sewell, E. Gil, G. G. Casado, E. Witters, D. Inze, J. A. Long, G. D. Jaeger, R. Solano, and A. Goossens. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464**:788-791.
- Pauwels, L. and A. Goossens. 2011. The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. *Plant Cell* **23**:3089–3100.
- Peng, J., P. Carol, D. E. Richards, K. E. King, R. J. Cowling, G. P. Murphy, and N. P. Harberd. 1997. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development* **11**:3194-3205.
- Pierik, R. and M. de Wit. 2014. Shade avoidance: phytochrome signalling and other aboveground neighbour detection cues. *J Exp Bot* **65**:2815-2824.
- Pieterse, C. M., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, and S. C. Van Wees. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**:489-521.
- Pieterse, C. M., C. Zamioudis, R. L. Berendsen, D. M. Weller, S. C. Van Wees, and P. A. Bakker. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu Rev Phytopathol* **52**:347-375.
- Plett, J. M., Y. Daguere, S. Wittulsky, A. Vayssieres, A. Deveau, S. J. Melton, A. Kohler, J. L. Morrell-Falvey, A. Brun, C. Veneault-Fourrey, and F. Martin. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the

- Populus JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:8299-8304.
- Quail, P. H. 2002. Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:85-93.
- Quail, P. H. 2007. Phytochrome-regulated Gene Expression. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**:11-20.
- Rabino, I. and A. L. Mancinelli. 1986. Light, Temperature, and Anthocyanin Production. *Plant Physiology* **81**:922-924.
- Rizzini, L., J. J. Favory, C. Cloix, D. Faggionato, A. O'Hara, E. Kaiserli, R. Baumeister, E. Schafer, F. Nagy, G. I. Jenkins, and R. Ulm. 2011. Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* **332**:103-106.
- Robson, F., H. Okamoto, E. Patrick, S. R. Harris, C. Wasternack, C. Brearley, and J. G. Turner. 2010. Jasmonate and phytochrome A signaling in Arabidopsis wound and shade responses are integrated through JAZ1 stability. *Plant Cell* **22**:1143-1160.
- Sasaki, A., H. Itoh, K. Gomi, M. Ueguchi-Tanaka, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D. H. Jeong, G. An, H. Kitano, M. Ashikari, and M. Matsuoka. 2003. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* **299**:1896-1898.
- Schafer, E. and C. Bowle. 2002. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep* **3**:1042-1048.
- Schoonhoven, L., J. van Loon, and M. Dicke. 2005. *Insect-Plant Biology*. Ed 2nd. Oxford University Press, New York.
- Shyu, C. and T. P. Brutnell. 2015. Growth-defence balance in grass biomass production: the role of jasmonates. *J Exp Bot* **66**:4165-4176.
- Shyu, C., Figueroa P, Depew CL, Cooke TF, Sheard LB, Moreno JE, Katsir L, Zheng N, Browse J, and H. GA. 2012. JAZ8 Lacks a Canonical Degron and Has an EAR Motif That Mediates Transcriptional Repression of Jasmonate Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**:536-550.
- Silverstone, A. L., C. N. Ciampaglio, and T. Sun. 1998. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**:155-169.
- Smith, H. 1982. Light quality, photoperception, and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**:481-518.
- Smith, H. 1992. The ecological functions of the phytochrome family. Clues to a transgenic programme of crop improvement. *Photochemistry and Photobiology* **56**:815-822.
- Smith, H. 1995. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology* **46**:289-315.
- Smith, H. 2000. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature* **407**:585-591.
- Smith, H. and G. Whitelam. 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment* **20**:840-844.
- Staswick, P. E. 2008. JAZing up jasmonate signaling. *Trends Plant Sci* **13**:66-71.
- Sun, T. P. 2011. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol* **21**:R338-345.
- Thaler, J. S., P. T. Humphrey, and N. K. Whiteman. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**:260-270.

- Thines, B., L. Katsir, M. Melotto, Y. Niu, A. Mandaokar, G. Liu, K. Nomura, S. Y. He, G. A. Howe, and J. Browse. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**:661-665.
- Thireault, C., C. Shyu, Y. Yoshida, B. St Aubin, M. L. Campos, and G. A. Howe. 2015. Repression of jasmonate signaling by a non-TIFY JAZ protein in Arabidopsis. *Plant J* **82**:669-679.
- Tian, D., J. Tooker, M. Peiffer, S. H. Chung, and G. W. Felton. 2012. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* **236**:1053-1066.
- Tyler, L., S. G. Thomas, J. Hu, A. Dill, J. M. Alonso, J. R. Ecker, and T. P. Sun. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**:1008-1019.
- Van der Does, D., A. Leon-Reyes, A. Koornneef, M. C. Van Verk, N. Rodenburg, L. Pauwels, A. Goossens, A. P. Korbes, J. Memelink, T. Ritsema, S. C. Van Wees, and C. M. Pieterse. 2013. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. *Plant Cell* **25**:744-761.
- Walling, L. L. 2000. The Myriad Plant Responses to Herbivores. *J Plant Growth Regul* **19**:195-216.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* **100**:681-697.
- Wasternack, C. and B. Hause. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*.
- Wild, M. and J. M. Daviere. 2012. The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* **24**:3307-3319.
- Willige, B. C., S. Ghosh, C. Nill, M. Zourelidou, E. M. Dohmann, A. Maier, and C. Schwechheimer. 2007. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**:1209-1220.
- Wittstock, U. and J. Gershenzon. 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **5**:300-307.
- Xie, D. X., B. F. Feys, S. James, M. Nieto-Rostro, and J. G. Turner. 1998. COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**:1091-1094.
- Yan, Y., S. Stolz, A. Chetelat, P. Reymond, M. Pagni, L. Dubugnon, and E. E. Farmer. 2007. A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**:2470-2483.
- Yang, D. L., J. Yao, C. S. Mei, X. H. Tong, L. J. Zeng, Q. Li, L. T. Xiao, T. P. Sun, J. Li, X. W. Deng, C. M. Lee, M. F. Thomashow, Y. Yang, Z. He, and S. Y. He. 2012. Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:E1192-1200.
- Yu, H., T. Ito, Y. Zhao, J. Peng, P. Kumar, and E. M. Meyerowitz. 2004. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**:7827-7832.

- Zhang, Y., O. Mayba, A. Pfeiffer, H. Shi, J. M. Tepperman, T. P. Speed, and P. H. Quail. 2013. A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in Arabidopsis. *PLoS Genet* **9**:e1003244.
- Zhang, Y. and J. G. Turner. 2008. Wound-Induced Endogenous Jasmonates Stunt Plant Growth by Inhibiting Mitosis. *PLoS ONE* **3**:e3699.
- Zhu, Z. 2014. Molecular basis for jasmonate and ethylene signal interactions in Arabidopsis. *J Exp Bot* **65**:5743-5748.
- Zhu, Z., F. An, Y. Feng, P. Li, L. Xue, M. A. Z. Jiang, J. M. Kim, T. K. To, W. Li, X. Zhang, Q. Yu, Z. Dong, W. Q. Chen, M. Seki, J. M. Zhou, and H. Guo. 2011. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:12539-12544.