

## **INFLUENCIA DEL AMBIENTE LUMÍNICO EN LA DEFENSAS DE LAS PLANTAS**

**Etchevers, Lucas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Cientibecario – Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL-UNL-CONICET*

**Área:** Ciencias biológicas

**Sub-Área:** Biotecnología

**Grupo:** X

**Palabras clave:** fitocromo B, defensas, ácido jasmónico.

### **INTRODUCCIÓN**

Los estímulos ambientales percibidos en un órgano inducen cambios fisiológicos y morfológicos a nivel local que, también, generan efectos en tejidos distantes. Tales efectos son conocidos como efectos sistémicos. La señalización sistémica permite, entonces, preparar otros tejidos de la misma planta para minimizar el daño que podría sufrir en un futuro cercano. Por ejemplo, el daño de un insecto herbívoro induce una respuesta de defensa local y otra en tejidos distantes. La respuesta sistémica de defensa busca generar un estado de hipersensibilidad en otros tejidos para responder de forma más efectiva a futuros ataques.

Los fitocromos (PHY) son fotoreceptores que perciben diferentes aspectos de la luz, como calidad, cantidad y duración controlando la arquitectura final de la planta. Estas proteínas oscilan entre dos estados conformacionales con diferente actividad y diferentes picos de absorción. Así, la forma activa del fitocromo (forma Pfr), tiene su pico de absorción en el RL (730 nm), mientras que, la forma inactiva (Pr) presenta un máximo de absorción en el R (680 nm) (Smith, 2000). De esta manera, la actividad biológica del fitocromo dependerá de la proporción R:RL de la luz incidente. Este mecanismo le permite a la planta detectar la luz enriquecida en RL que proviene de la reflexión de tejidos verdes de plantas vecinas y así anticiparse a la competencia (Ballaré et al., 1990; Casal, 2013). El PHYB juega un rol central en plantas verdes controlando un conjunto de respuestas morfológicas de la planta que maximizan la captación de luz solar para competir mejor con plantas vecinas, conocido como *síndrome de escape al sombreado* (SAS) (Casal, 2012). A pesar de que, el PHYB se expresa en todas las células y tejidos, se demostró que la expresión en el mesófilo es suficiente para suprimir la floración temprana del mutante *phyb* (Endo et al, 2005). Este resultado sugiere que algunas respuestas del PHYB son controladas de forma celular no-autónoma.

Dado que, la expresión del SAS va acompañado de una inmunodepresión de la defensas, nos preguntamos si el PHYB puede regular las defensas inducibles de *Arabidopsis* de forma celular autónoma o no autónoma y, en ese caso, si también lo puede hacer de forma sistémica.

Proyecto: este proyecto se inserta en el proyecto marco PICT2013-3285 denominado "Caracterización funcional de isoformas inestables de represores JAZ durante el proceso de desetiología de *Arabidopsis thaliana*"

Director del proyecto: Javier E. Moreno.

Director del autor: Javier E. Moreno

Para responder esta pregunta en este contexto que mi trabajo vinculado a la Cientibeca, usamos un grupo de líneas transgénicas que expresan al PHYB en tejidos específicos en el background del mutante PHYB9.

## METODOLOGÍA

### Líneas transgénicas y condiciones de cultivo

Para el presente trabajo se utilizaron un set de cinco líneas de *Arabidopsis thaliana* descriptas previamente (Casson and Hetherington, 2014). El mutante de fitocromo B (*phyB-9*) fue complementado con las siguientes construcciones que dirigen diferentes patrones de expresión de PHYB::YFP: 1) *CamV35SproPHYB::YFP*, donde el promotor viral CamV35S dirige la expresión constitutiva en toda la planta; 2) *SUC2proPHYB::YFP*, con expresión en células del floema; 3)  $\beta$ CA1proPHYB::YFP con expresión en células del mesófilo y 4) *SPCHproPHYB::YFP* con expresión en células de la guarda (Casson and Hetherington, 2014).

Las plantas fueron cultivadas en cámaras de fotoperíodo corto (10hs de luz blanca) a 22°C.

### Tratamiento con metil-jasmónico

Plantas de 21 días fueron divididas aleatoriamente en dos grupos: un grupo control y un grupo tratamiento. En este caso el tratamiento de daño fue simulado por aplicación directa de una solución 200µM de ácido metil-jasmónico (MeJA) sobre las plantas. 6 horas después de aplicado se procedió a tomar muestras de hojas de roseta. A las 72 horas de la inducción, también, cosechamos discos de hojas para medir la inducción de compuestos fenólicos totales ( $A_{320}$  nm).

### Mediciones

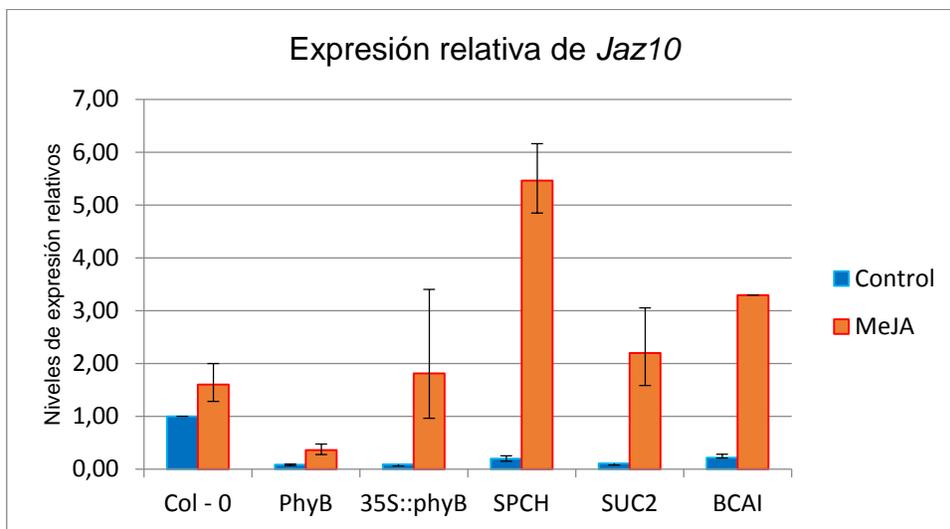
Para poder llevar a cabo el estudio y análisis sobre los niveles de defensas en las plantas se plantearon dos estrategias básicas: 1. medir los niveles de expresión de genes marcadores mediante PCR en tiempo real, 2. medir los niveles de fenólicos totales.

1. Una vez, realizadas las correspondientes extracciones de ARN a partir de tejido fresco de hoja, se realizaron ensayos de qPCR utilizando como gen normalizador actinas y como genes marcadores: PHYB9, ERF1 y JAZ10.11. En particular el gen PHYB9 fue utilizado como control de las líneas mutantes, mientras que, los niveles de expresión de ERF1 y JAZ10 fueron usados como marcadores de la vía de defensa mediada por el JA.
2. Para cuantificar la concentración de compuestos fenólicos totales, a los discos cosechados luego de ser pesados, se les adicionó 400 uL de metanol ácido y fueron conservadas en esta solución durante 48hs a 4°C. A continuación, se le agregaron 300uL de agua desionizada y 700uL de cloroformo para separar la clorofila. La absorbancia del extracto fue medida a 320nm (Ballaré, 2014).

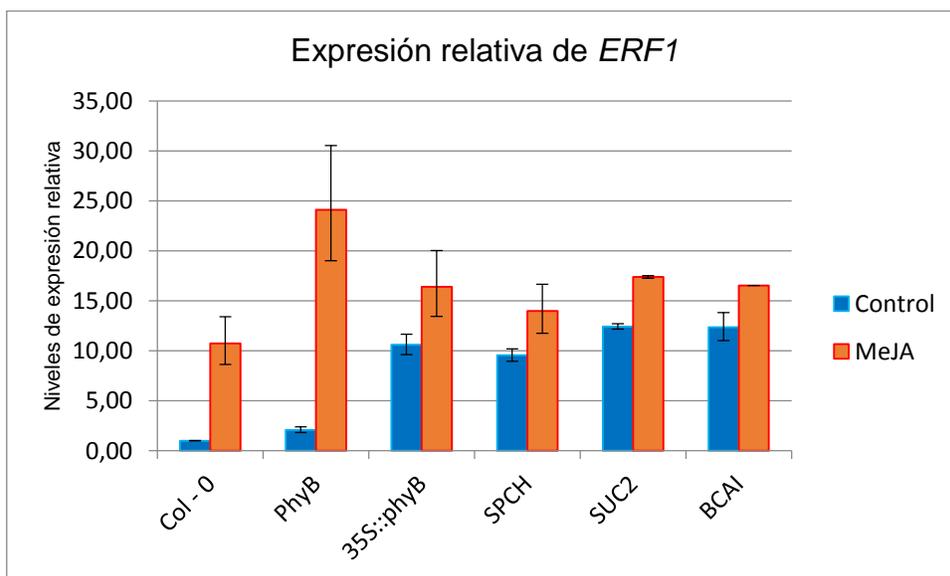
## RESULTADOS

**Análisis de los niveles de expresión de genes marcadores.** El mutante PHYB9 es más sensible a infecciones por *Botrytis cinerea*, un hongo necrotrófico. Por el contrario, la expresión ectópica y constitutiva del PHYB, bajo la regulación del promotor CaMV35S, genera plantas más tolerantes al hongo comparado con plantas de genotipo salvaje. En la misma línea, nuestro grupo demostró que la expresión del PHYB en células de la guarda,

mesófilo y floema es suficiente para restablecer niveles de tolerancia al hongo similares o, en algunos casos, mayores que el genotipo salvaje. Todos estos datos sugieren que el efecto del PHYB sobre la tolerancia a *B. cinerea* es celular-autónoma. En otras palabras, aunque la expresión del fitocromo se dé solo en algún tipo celular, ésta es suficiente para disparar respuestas en toda la hoja. Para verificar si estos patrones de tolerancia a *B. cinerea* tenían un sustento molecular, decidimos medir genes marcadores de la vía del JA en tejidos en respuesta a *B. cinerea* o respuesta a MeJA exógeno.



**Figura 1.** Niveles de expresión relativos del gen *Jaz10* en los diferentes genotipos.



**Figura 2.** Niveles de expresión relativos del gen *ERF1* en los diferentes genotipos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ballaré CL, Scopel AL, Sanchez RA.**,1990. Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* 247:329-332.
- Casal JJ.**, 2012. Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10:e0157.
- Casal JJ.**, 2013. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* 64:403-427.
- Farmer EE, Ryan CA.**, 1990. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7713-7716.
- Farmer EE, Ryan CA.**, 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* 4:129-134.
- Smith H.**, 2000. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* 407:585-591.