



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Rol de los fotorreceptores bacterianos phy 1 y
LOV de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*
DC 3000 en la interacción con
Arabidopsis thaliana

N° 493

Victoria Moriconi

Tutores: Jorge J. Casal - Matías I. Rugnone

Departamento de Investigaciones
2011

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Jorge, por haberme aceptado hace dos años como tesista y hoy día como becario, por estar siempre ante cualquier inquietud y dificultad. Es y será un gusto seguir trabajando y formándome a tu lado.

A Mati, co-director y compañero de grupo. Por enseñarme muchísimo del día a día en el laboratorio, ayudarme siempre con todo y darme ánimos en las malas rachas. Muchísimas gracias!

Al gran grupo de laboratorio del IFEVA que me recibieron con la mejor onda: Gaby, Martin, Santi, María, Pipa, Ely, Pau, Sil, Carlos, Lu, Marcos, Yami, Ro, Sabri, Orne y especialmente a Romi por el aguante en la última etapa! Gracias por hacerme sentir tan cómoda desde el primer día de trabajo!

A mi familia, por apoyarme desde el primer momento en que elegí continuar por el camino de la ciencia y la investigación. Gracias ma, pa, Marti y Flor: sin el aliento y la fuerza de ustedes no hubiese llegado hasta acá! Gracias abuelos por todo el amor, alegrías y anécdotas que dejaron y dejarán.

A Juanjo, por toda la ayuda en la tesis y por elegirme todos los días para compartir la vida juntos. Gracias bonito, te amo!

A mis amigas "porteñas", Ceci, Fabri y Ani, que sin duda fueron lo mejor que me dio esta etapa. Incondicionales.

A mis amigas de la vida, que todavía hoy continúan confiando en mi y apoyándome como siempre lo hicieron; especialmente a Pau y Ro que continuaron conmigo el camino hacia Buenos Aires.

Índice

AGRADECIMIENTOS	3
1. RESUMEN	7
2. ABREVIATURAS	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. INTERACCION PLANTA-PATÓGENO	9
3.1.1. Proceso de entrada de Pst DC 3000 en la planta	9
3.1.2. Primera línea de defensa de la planta	10
3.1.3. Proceso de infección bacteriana	11
3.1.4. Segunda línea de defensa de la planta	13
3.2. ROL DE LA LUZ EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	15
3.2.1. Fotorreceptor de luz Roja: Fitocromo	15
3.2.2. Fotorreceptores de luz Azul: dominio LOV	17
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIALES Y METODOS	18
5.1. Cultivo del Material Vegetal	18
5.2. Crecimiento del cultivo bacteriano.	18
5.3. Inoculación de las plantas.	19
5.3.1. Por contacto superficial.	19
5.3.2. Por infiltración	19
5.4. Tratamientos lumínicos.	19
5.5. Conteo bacteriano	19
5. RESULTADOS	20
5.1. Tratamientos de luz y oscuridad en plantas inoculadas por contacto superficial	20
5.2. Crecimiento de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y mantenidas en luz continua	21
5.3. Crecimiento de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y expuestas a luz roja o luz azul continua	21
5.4. Proliferación de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y expuestas a fotoperiodos de 10 h de luz y 14 h de oscuridad	22
6. DISCUSIÓN	24
7. CONCLUSIÓN	26
8. REFERENCIAS	27

1. RESUMEN

La importancia de la luz, en lo que respecta al control de la interacción planta-patógeno, es un tema que esta cobrando gran interés en los últimos años. Esto se debe al rol protagónico que la luz tiene tanto en el control de las respuestas de defensa de la planta, como en la virulencia de los patógenos. Es aquí donde entran en juego los fotorreceptores de las plantas y las bacterias, estas proteínas son las encargadas de detectar la luz y traducirla en señales intracelulares específicas.

En nuestro laboratorio investigamos el sistema formado por *Arabidopsis thaliana* y *Pseudomonas syringae* patovar tomato DC3000 (Pst DC 3000) para evaluar si la luz percibida por la bacteria influye en su capacidad de interacción. Para ello utilizamos la cepa bacteriana salvaje (WT) y tres líneas mutantes de fotorreceptores como lo es una mutante para fitocromo 1 (phy1) y mutantes para el dominio LOV (LOV A y LOV B). Estas líneas, traídas al país especialmente para esta investigación, poseen anulada su capacidad para detectar la luz roja y azul respectivamente.

En este trabajo caracterizamos el rol de la luz en esta interacción con distintas longitudes de onda durante la infección. Pudimos corroborar la importancia de este estímulo ambiental tanto en la defensa de la planta, como en la proliferación bacteriana. Las plantas que sobrellevaron la infección bajo luz blanca continua tuvieron menor crecimiento bacteriano y mejor tolerancia a la invasión en comparación con las plantas en oscuridad. Resultados similares observamos al ubicar las plantas en un fotoperiodo de 10 horas luz y 14 horas oscuridad. Analizando el crecimiento bacteriano bajo condiciones lumínicas mas específicas, evidenciamos el papel del fotorreceptor de luz azul LOV en la interacción. Las infecciones que se establecieron bajo luz azul mostraron menor crecimiento bacteriano en el WT, y las bacterias deficientes del fotorreceptor LOV (LOV A Y LOV B) no mostraron inhibición en su proliferación. Esto nos permite postular que una de las acciones del fotorreceptor con dominio LOV en bacterias es la represión del crecimiento cuando censan la luz azul.

2. ABREVIATURAS

- Avr: gen dominante de avirulencia.
- CO₂: dióxido de carbono.
- COR: coronatina.
- ETI: del ingles "*effector-triggered innate immune response*".
- HPK: histidina kinasas de proteína.
- HR: respuesta hipersensible.
- IAA: ácido indol acético o auxina.
- LOV: luz, oxígeno, voltaje.
- MgCl₂: cloruro de magnesio.
- NO: óxido nítrico.
- PAMP's : del ingles "*pathogen-associated molecular patterns*".
- Pfr: conformación activa del fitocromo.
- Phy 1: fitocromo 1.
- Pr: conformación inactiva del fitocromo.
- PRR' s: del ingles "*pattern recognition receptors*".

- Pst DC 3000: *Pseudomonas syringae patovar tomato* DC 3000.
- PTI: del inglés “*PAMP-triggered innate immune response*”.
- R: gen dominante de Resistencia.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- RR: del inglés “*response regulator*”.
- SA: ácido salicílico.
- T3SS: sistema de secreción tipo III (tres).
- UFC: unidades formadoras de colonias.
- WT: genotipo salvaje.

3. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución, los organismos han adquirido herramientas que les permiten hacer frente a distintas situaciones de estrés, permitiéndoles crecer y desarrollarse exitosamente colonizando una gran variedad de ecosistemas. A diferencia de los animales, las plantas, por su condición de organismo sésil, han evolucionado para poder tolerar o resistir distintas situaciones adversas que se dan de forma cotidiana. Entre ellas podemos encontrar las altas irradiancias, la escasez de agua y nutrientes, la competencia por la cantidad de luz y la falta de oxígeno en las raíces durante una inundación (Nabors 2006). Estos ejemplos caracterizan situaciones de estrés que se conocen como estrés abiótico debido al origen del agente responsable. Sin embargo, existen situaciones de estrés biótico que son generadas por organismos, como los hongos, virus, insectos y bacterias, que tienen la capacidad de crecer y desarrollarse a expensas del hospedador, poniendo en serio riesgo la posibilidad de completar el ciclo de vida de la planta.

Para hacer frente a este tipo de amenazas, las plantas han desarrollado variados mecanismos de defensa sumamente complejos que involucran cambios a nivel hormonal y de expresión génica coordinados entre sí. Por otro lado, sabemos que la interacción entre las plantas y patógenos ha co-evolucionado permitiendo a cada uno adquirir distintas herramientas (Bisgrove et al., 1994; Alfano et al., 1996; Dang et al., 2001; Chen et al., 2007)

Una cepa bacteriana muy estudiada es *Pseudomonas syringae*. Esta es una bacteria Gram-negativa que tiene la capacidad de infectar distintas especies de plantas. Los diferentes patovares¹ de *Pseudomonas syringae* varían en su capacidad de supervivencia epifítica, los síntomas que provocan y en su rango de hospedadores (Smith et al, 1988). La base molecular de todas estas interacciones es compleja ya que depende de numerosos factores que se solapan entre sí. Entre los factores de virulencia² más importantes encontramos fitotoxinas, fitohormonas, adhesinas, enzimas que degradan la pared, lipopolisacáridos (LPS) y, proteínas efectoras que se traslocan al interior de las plantas mediante el sistema de secreción de tipo III (T3SS), modulando los mecanismos de defensa en el hospedador (Hüeck 1998; Galán et al., 1999).

Existe una base de datos (<http://www.pseudomonas-syringae.org>) muy importante sobre este fitopatógeno donde se pueden encontrar las secuencias de más de 50 patovares de *Pseudomonas syringae*. Hasta el momento tres cepas poseen su genoma completamente secuenciado, una de ellas, *patovar tomato DC3000*, tiene como hospedador la planta de Tomate (*Lycopersicon esculentum*) y *Arabidopsis*; y las otras dos, *patovar syringae BT28a* y *patovar phaseolicola 1448A*, infectan plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) (Buell et al, 2003; Feil et al, 2005; Joardar et al, 2005).

¹ Patovar: tipos de bacterias de una misma especie diferenciados entre sí por la habilidad en infectar determinadas especies hospederas.

² Factores de virulencia: son moléculas producidas por el patógeno que influyen específicamente las funciones de la célula hospedadora, para permitir la colonización e infección del tejido.

La cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst* DC 3000) fue la primera en secuenciarse completamente. Es un derivado espontáneo resistente al antibiótico Rifampicina de la cepa natural DC52. Su genoma fue publicado en 2003 (Buell et al., 2003), mide 6,5 Mega bases y consta de un cromosoma circular y dos plásmidos que, en conjunto, codifican 5.763 posibles secuencias. Se han identificado 298 genes de virulencia (aproximadamente el 5% del genoma) que engloban varias agrupaciones de genes que codifican 50 proteínas efectoras de tipo III (31 de ellas están confirmadas y 19 son predicciones). El genoma de *Pst* DC 3000 presenta numerosos transportadores necesarios para la adquisición de nutrientes, particularmente azúcares, así como genes implicados en la adhesión a la superficie vegetal. Más del 12% de los genes codifican factores de transcripción (Buell et al., 2003).

En este trabajo, se eligió utilizar el sistema formado por *Pst* DC 3000 y la planta *Arabidopsis thaliana*, sobre la planta de tomate ya que *Arabidopsis* presenta algunas ventajas en la medida en que se trata de una planta modelo de experimentación (Glazebrook J., 1997; Meinke et al., 1998), con el genoma totalmente secuenciado (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), planta muy pequeña que produce numerosos descendientes y con un tiempo de generación muy corto, lo que permite ahorrar espacio y tiempo.

Tanto la planta como la bacteria poseen herramientas bioquímicas y moleculares para defenderse del ataque que cada parte del sistema ejercerá sobre el otro. De este modo, cada uno utiliza diferentes estrategias para sobrellevar esta interacción y sobrevivir. A continuación se describen las diferentes etapas de la interacción entre *Arabidopsis thaliana* y *Pst* DC 3000.

3.1. INTERACCION PLANTA-PATÓGENO

3.1.1. Proceso de entrada de *Pst* DC 3000 en la planta

La entrada en el tejido vegetal es el paso crítico para que *Pst* DC 3000 logre establecer la infección foliar. Para acceder a los espacios intercelulares y a los tejidos internos de la hoja, los patógenos deben cruzar la cutícula y la epidermis que son las primeras líneas de defensa en las plantas. Muchos hongos patógenos son capaces de penetrar directamente en la epidermis haciendo uso de la fuerza mecánica o de enzimas que degradan la cutícula y/o la pared celular (Gutierrez 2001). Las bacterias, sin embargo, suelen usar otras estrategias para penetrar en los tejidos. Estas se basan, en general, en usar a su favor caminos preexistentes. Suelen aprovechar todas las aberturas naturales de la planta y algunas no naturales que se producen por accidente. Las aberturas naturales más importantes en cantidad en la parte aérea de la planta son los estomas, pero también se encuentran los hidátodos. Las aberturas no naturales suelen deberse a heridas causadas por insectos, daño mecánico por heladas, granizo, tormentas, o el daño causado por la formación de raíces laterales, ruptura de tricomas, abscisión de hojas, etc. (Melotto et al., 2008).

Los estomas son poros microscópicos en la epidermis de las partes aéreas de las plantas terrestres (**figura 1**). Estos poros son esenciales para la fotosíntesis, ya que permiten la difusión de CO₂ desde el exterior hacia el espacio extracelular en el interior de la lámina foliar. La apertura del poro cambia en respuesta a distintas condiciones del medio ambiente, como la intensidad lumínica, la humedad y la concentración de CO₂ (Melotto et al., 2006). En general, cuando la demanda atmosférica es muy alta (influyendo aquí la radiación incidente, la temperatura, la humedad relativa del aire y el viento) la planta tendrá la mayor parte de los estomas cerrados. En cambio, cuando la demanda atmosférica disminuye, como por ejemplo cuando la humedad ambiental aumenta, los estomas se abren permitiendo así la entrada de CO₂ sin comprometer el nivel hídrico de la planta (De Boera et al. 2011). Las condiciones ambientales, como se ve, son trascendentales para favorecer o evitar las infecciones bacterianas.

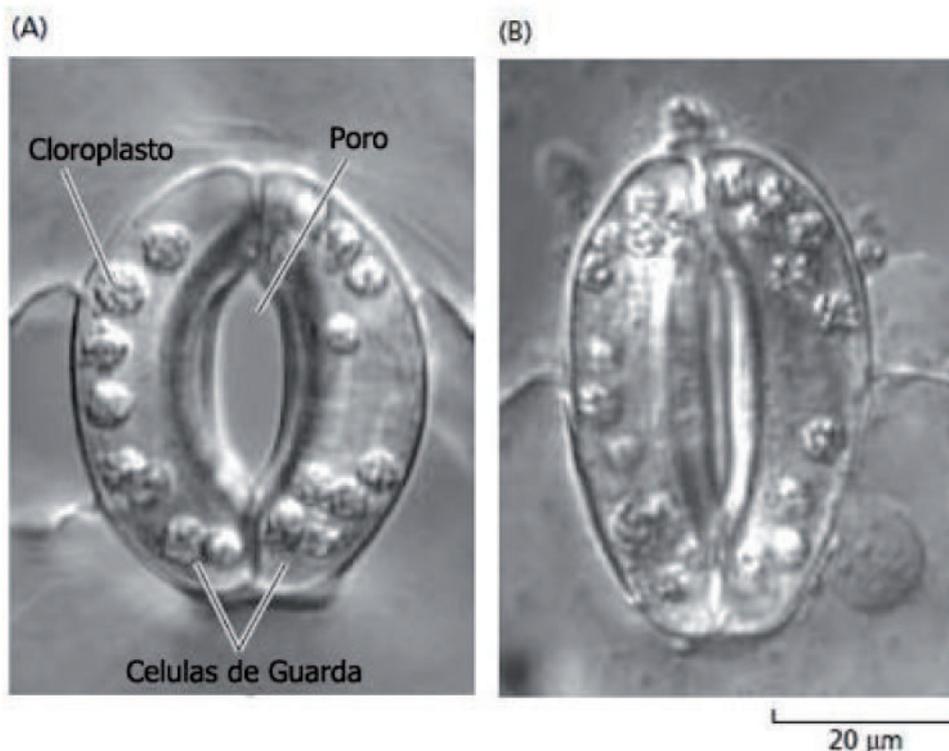


Figura 1. Estoma de *Vicia faba* observado en microscopio electrónico. A) estoma abierto. B) estoma cerrado. También se distinguen a los laterales las células de guarda y los cloroplastos.

El poro estomático está flanqueado por un par de células especializadas llamadas células de guarda. La apertura y cierre de los estomas depende del grado de turgencia de estas dos células y está controlada por una hormona vegetal, el ácido abscísico (ABA) que interviene en las respuestas de la planta a la sequía y a otras situaciones de estrés abiótico (MacRobbie 1998).

Históricamente, los estomas eran considerados una puerta de entrada pasiva para las bacterias patógenas de plantas. Sin embargo, hoy en día hay estudios que sugieren que pueden jugar un rol activo como parte del sistema de defensa innato de la planta ante las invasiones bacterianas (Melloto et al., 2006).

3.1.2. Primera línea de defensa de la planta

Las células vegetales contienen receptores trans-membrana específicos de diversas moléculas presentes en *Pst* DC 3000. Estas moléculas bacterianas se conocen en general como PAMPs (del inglés “*pathogen-associated molecular patterns*”). Los receptores vegetales que los reconocen se denominan PRRs (“*pattern recognition receptors*”). Son las células de la guarda de los estomas las primeras en reconocer la presencia del patógeno a través de los PRRs y, por lo tanto, serán las primeras en generar una respuesta de defensa. Entre los PAMPs del patógeno más estudiados se encuentran: flg22 (péptido de 22 aminoácidos), LPS, el RNP-1 (“*RNA-binding motif*”) y el factor de elongación Tu (EF-Tu) (De Wit, 2002; Hou et al., 2009). Esta respuesta de defensa desencadenada por los PAMPs, y por ello conocida como PTI (del inglés “*PAMP-triggered innate immune response*”), implica en primer lugar la formación de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) y modificaciones en la pared vegetal. El NO es requerido para el cierre de los estomas (Gudesblat et al., 2009). Las ROS generan radicales libres que degradan las membranas y el material genético del patógeno invasor, al mismo tiempo que cumplen la función de eliminar las células infectadas de modo tal de contener la infección bacteriana y evitar así su dispersión por el resto de la hoja. La ruta de transducción de señales de los PAMPs, promueve la expresión de genes como PR1 los cuales permiten la acumulación de ácido salicílico (SA, otra hormona vegetal que se induce siempre tras el ataque de *Pst* DC 3000) y ABA para promover el cierre estomático

y evitar la entrada bacteriana. Estas observaciones ponen de manifiesto la conexión entre la señalización de los PAMPs, del SA y del ABA en la respuesta de las células guarda a la bacteria. (Hou et al., 2009).

3.1.3. Proceso de infección bacteriana

La respuesta generada por la planta frente a los PAMPs pueden ser insuficientes ya que la bacteria dispone de elementos para defenderse y prosperar: cuenta con una gran cantidad y variedad de factores de virulencia que utiliza durante el proceso de entrada y colonización celular. Las opciones a las que recurre para establecerse son enormes y reflejan la adaptación alcanzada a lo largo de su evolución.

Entre los factores de virulencia mejor caracterizados se encuentran la coronatina (COR), la auxina o ácido indol acético (IAA) y los que son secretados por el Sistema de Secreción Tipo III (TTSS o T3SS), como AvrRpt2, AvrRpm1, AvrRps4, AvrHrp, entre otros (Chisholm et al., 2005; Büttner et al., 2009; Shah 2009; Mansfield 2009). En primer lugar, el fitopatógeno *Pst* DC 3000 produce una fitotoxina difusible denominada COR en el apoplasto³ y/o en la superficie de la hoja, la cual provoca la apertura estomática (**Figura 3**). La COR es análogo estructural del ácido jasmónico-isoleucina (JA-Ile), otra hormona vegetal, siendo capaz de sustituirlo ocasionando un desbalance de los niveles hormonales de la célula vegetal. Este desbalance de ABA y SA provoca la reapertura de los estomas (Sreedharan et al., 2006; Melloto et al., 2006). En segundo lugar, la bacteria patógena *Pst* DC 3000 también inyecta efectores a través del T3SS en las células del mesófilo. La finalidad de esta secreción es anular las defensas del hospedador y liberar sus nutrientes. Son mayoritariamente proteínas que interfieren en la maquinaria de síntesis y degradación de proteínas vegetales, alterando así su homeostasis (Hüeck 1998; Galán et al., 1999). Mutantes de *Pseudomonas syringae* deficientes en este sistema de secreción son incapaces de crecer o causar enfermedad en plantas susceptibles, demostrando la importancia del mismo en la virulencia bacteriana (Chen et al., 2004).

La maquinaria del T3SS denominada inyectosoma o complejo aguja, parece tener un origen evolutivo común con el flagelo (Macnab 2003). La principal función conocida del inyectosoma es la liberación de proteínas efectoras en el citosol de las células del hospedador ya que allí se modulan una gran variedad de funciones de la célula hospedadora, incluyendo la respuesta inmune o de defensa (Galán et al., 1999). La disposición básica del complejo aguja está definida por una serie de anillos basales que se extienden desde la membrana interna a la externa y se conectan a una especie de pilus (en *Pseudomonas syringae*). Esta estructura termina en una aguja con un poro de traslocación, el translocón, que es fijado dentro de la membrana plasmática de la célula diana (**Figura 2**). Análisis bioquímicos de la aguja purificada revelan que esta compuesta, por lo menos, por tres proteínas: InvG (miembro de la familia de las secretinas), y dos lipoproteínas, PrgH y PrgK. Una ATPasa conservada se asocia con la base citoplásmica del inyectosoma en la bacteria y aporta la energía necesaria para el transporte (Büttner et al., 2009). Dos clases de chaperonas ayudan en el ensamblaje del inyectosoma, mientras que una tercera clase asiste en la traslocación de las proteínas efectoras.

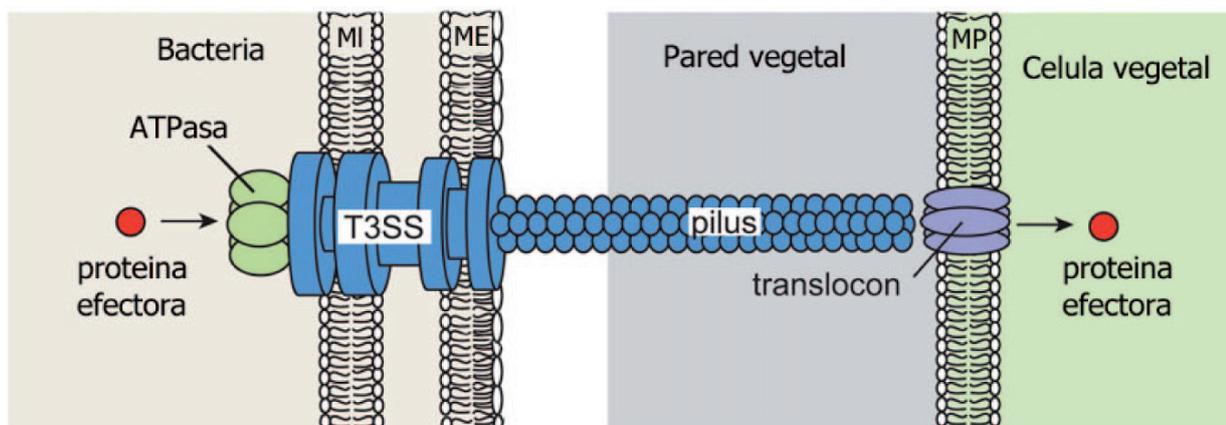


Figura 2. Sistema de secreción tipo 3 (T3SS). Representación esquemática del sistema con sus componentes. MI: membrana interna, ME: membrana externa, MP: membrana plasmática (Büttner et al., 2009)

³ Apoplasto: espacio extracelular periférico a la membrana plasmática de la célula vegetal.

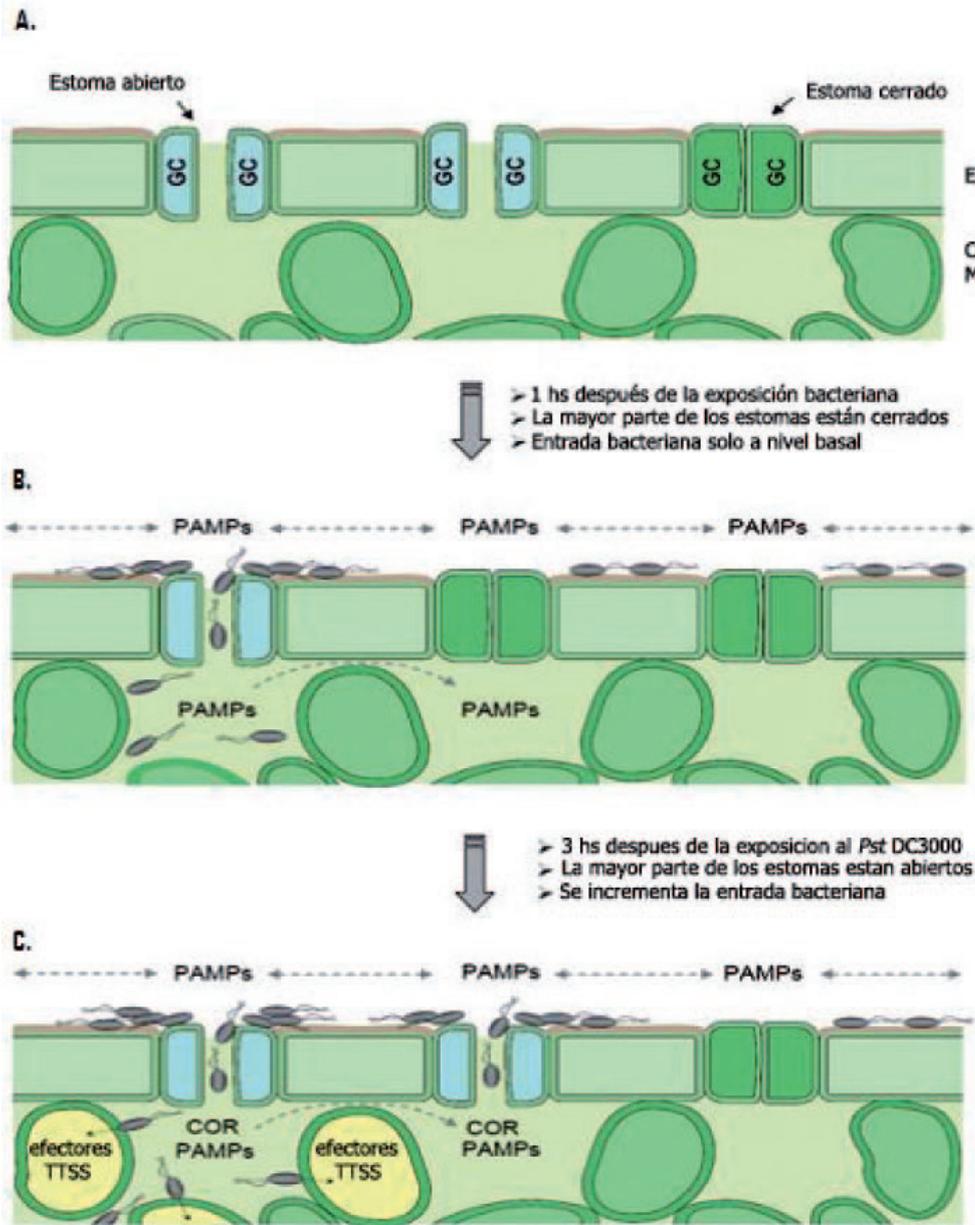


Figura 3. Estomas como puntos de entrada natural para la invasión bacteriana. **A.** Una visión transversal de la epidermis de la hoja y las células del mesófilo muestran que los estomas, formados por pares de células de guarda (GC), están mayoritariamente abiertos en la luz. **B.** Luego de la exposición de las bacterias, las células de guarda perciben los PAMPs y muchos estomas se cierran en una hora. Los estomas que quedan abiertos son una ruta de entrada. Las flechas de puntos indican la difusión de PAMPs de la epidermis al espacio intracelular (apoplasto) entre las células del mesófilo, las cuales suelen percibirlos activando las defensas del hospedador. **C.** En el caso del patógeno *Pst* DC3000, tres horas después de la infección, la bacteria produce coronatina (COR) en el apoplasto y/o en la superficie de la planta para re-abrir los estomas (Underwood et al., 2007)

Otro de los factores de virulencia a los que recurre *Pst* DC 3000 es la hormona IAA, la que contribuye aún más a desbalancear las hormonas de la planta (Chen et al., 2007). La IAA es una de las hormonas endógenas de la planta que interviene en los procesos de proliferación celular y crecimiento de las células, pero la IAA provista por la bacteria hace a la planta más vulnerable ya que, cuando las células están creciendo, la pared celular se ablanda y es más fácil de atacar. Una planta que se defiende de forma activa reprime inmediatamente la maquinaria de síntesis de auxinas y el crecimiento en general (Shah 2009).

3.1.4. Segunda línea de defensa de la planta.

Para estudiar y comprender cualquier interacción planta-patógeno es necesario tomar en cuenta los dos componentes del sistema; se debe estudiar la virulencia o avirulencia de un patógeno siempre en relación a la resistencia o susceptibilidad del hospedante. Para ello es conveniente utilizar los términos *interacción compatible* e *interacción incompatible*. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una cepa virulenta y una planta susceptible, mientras que una relación incompatible se refiere a que el hospedador es resistente y el patógeno es avirulento (Madriz 2002).

Arabidopsis es una planta susceptible, al igual que el tomate, al ataque de *Pst* DC 3000. La bacteria es capaz de inducir la aparición de enfermedad en la planta si las condiciones ambientales son favorables, dando como resultado una interacción compatible. Así que desde el punto de vista de la planta, ser compatible con un determinado fitopatógeno, le genera vulnerabilidad.

Las interacciones incompatibles (hospedante resistente, patógeno avirulento) se dan por que esas plantas disponen de una segunda línea de defensa: ETI (del inglés "*Effector-triggered innate immune response*") que recibe este nombre porque la defensa se desencadena tras el reconocimiento de alguno de los efectores que ha liberado la bacteria dentro de la célula vegetal a través del T3SS (Alfano et al., 1996). La respuesta consiste en la producción mayoritaria, por parte de la planta, de ROS que además de matar a la bacteria va a provocar la muerte de las propias células vegetales. Esto se conoce como HR o respuesta hipersensible, lo que hará que la bacteria quede limitada al tejido infectado e impedirá que la enfermedad se propague a células vecinas (Heath 2000). Este tipo de respuesta está bien descrita desde el punto de vista molecular mediante lo que se conoce como el modelo de interacción gen por gen propuesto por Harold Flor (Flor 1971). Postula que la resistencia de una planta a un patógeno ocurre cuando la planta posee un gen dominante de resistencia llamado R y el patógeno expresa un gen complementario dominante de avirulencia llamado Avr. Si la planta no contiene la proteína R que reconoce al efector Avr, no podrá desencadenar la HR y, por tanto, el efector Avr se considerará un factor de virulencia.

En cambio, en aquellos casos en que Avr es reconocido por una proteína R, la planta activará la HR a las 24h, se defenderá, y el efector se considerará un factor de avirulencia. Al primer tipo de interacción planta-bacteria se le considerará compatible y a la planta susceptible. En cambio, cuando la planta se defiende del patógeno la interacción es considerada incompatible, y la planta resistente (**figura 4**).

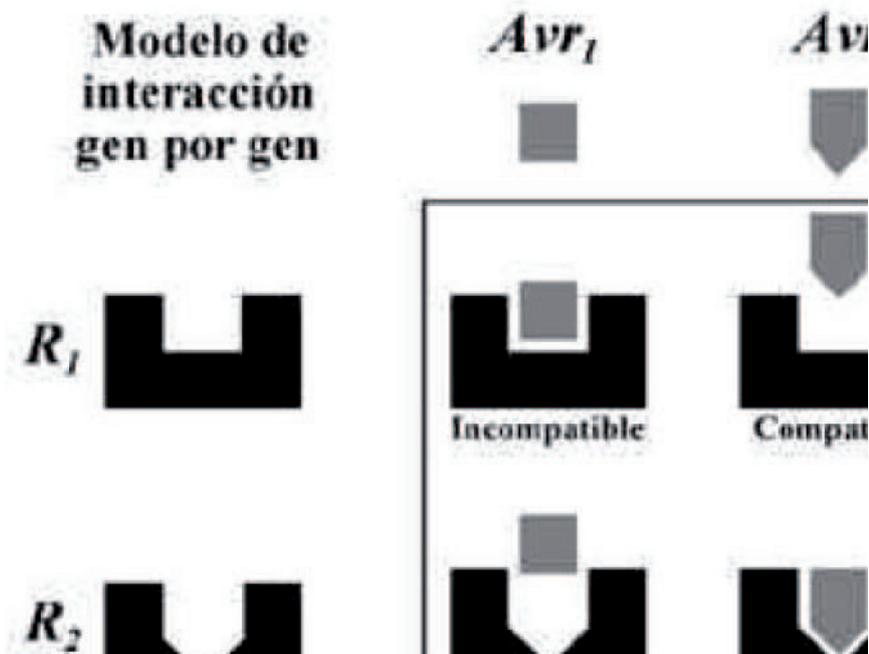


Figura 4. Hipótesis del gen por gen. La figura es un modelo simplificado que ilustra cómo la presencia de diferentes genes R en el hospedante y los correspondientes genes Avr en el patógeno determinan el reconocimiento y definen si la interacción es compatible o incompatible (Madriz 2002).

Este mecanismo fue profundizado en la última década gracias a los avances científicos y tecnológicos. Es así como la hipótesis del gen por gen hoy se reemplaza por la "hipótesis de guardia" (Dang 2001), la cual predice que las proteínas R no reconocen directamente el producto Avr del patógeno, sino que funcionan como intermediarios para detectar y responder a las acciones de las proteínas efectoras bacterianas. Se postula que las proteínas efectoras funcionan suprimiendo o inactivando los mecanismos de resistencia basal en el hospedador a través de la modificación o eliminación de los componentes esenciales de la resistencia basal (Shirasu et al, 2003; Belkhadir et al, 2004).

En *Arabidopsis*, la proteína RPM1 (del inglés "resistance to *Pseudomonas maculicola* protein 1") es la que reconoce la acción de dos proteínas efectoras del T3SS: AvrRpm1 y AvrB, las cuales se encuentran en varias cepas de *Pseudomonas syringae* (Bisgrove et al, 1994). Con el hallazgo de RIN4 (del inglés "RPM1 Interacting Protein 4") se determinó que, ante la presencia de AvrB o AvrRpm1, esta proteína es fosforilada activando la cascada de señalización RPM1 y desencadenando la HR. En ausencia de cualquiera de las proteínas efectoras, RIN4 parece funcionar como un regulador negativo de RPM1, manteniéndolo en un estado inactivo (Mackey et al., 2003). Es imprescindible que RIN4 interactúe con RPM1 para que ésta active la respuesta HR en la planta frente a los dos efectores bacterianos AvrRpm1 y AvrB de Pst DC 3000, inhibiendo el crecimiento de las bacterias (figura 5). Esta respuesta no se da en plantas con niveles bajos de RIN4. Bajos niveles de RIN4 dan lugar a bajos niveles de RPM1 y baja la capacidad de resistencia de la planta a la infección (Desveaux et al, 2007).

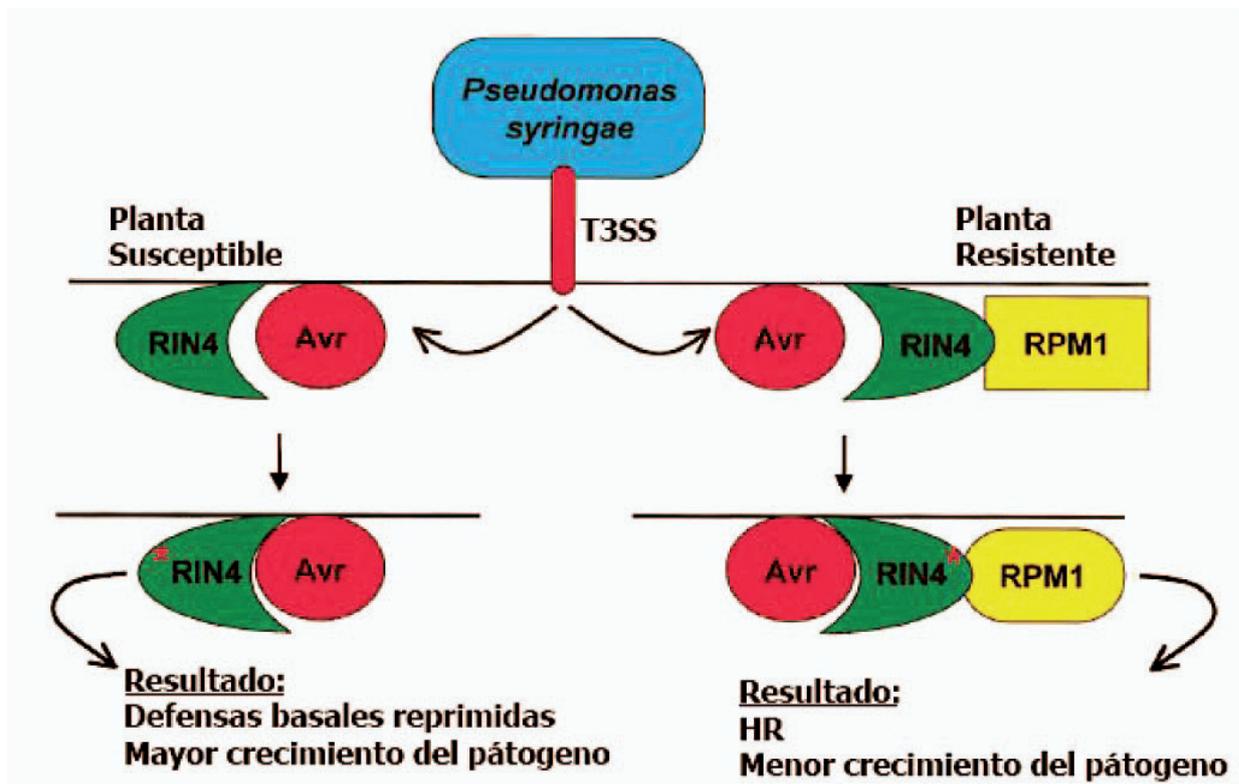


Figura 5. Hipótesis de guardia. Cuando plantas susceptibles son infectadas con *Pseudomonas syringae*, las proteínas Avr interactúan con RIN4, inducen su fosforilación (*) e incrementan su concentración, lo que lleva a la inhibición de las defensas basales y, por tanto, a la susceptibilidad. En cambio, cuando las plantas son resistentes todas estas manipulaciones son de alguna manera censadas por RPM1, que pone en marcha el programa de muerte celular programada que da lugar a la resistencia.

3.2. ROL DE LA LUZ EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

La luz es un factor muy importante en la mayoría de los ecosistemas. La cantidad, dirección y calidad del espectro de luz es censada por los organismos para obtener información sobre el entorno biótico y abiótico en el que están. Muchas especies han adquirido la capacidad para responder a este estímulo extracelular por medio de numerosos fotorreceptores. Estos son la base de las cascadas de traducción de señales que controlan las respuestas por activación de la luz.

En plantas, los fitocromos fueron la primera familia de fotorreceptores descubiertos, los cuales absorben con mayor eficiencia las longitudes de onda del rojo (600-700 nm) y del rojo lejano (700-800 nm) (Quail 2002). Tres familias de fotorreceptores de luz UV-A/azul (320-500 nm) fueron identificadas más recientemente; la familia de las fototropinas (Briggs et al., 2001), la de los criptocromos (Lin, 2002), y la familia de ZEITUPLE (ZTL) (Kim et al., 2007). Este año, se ha descrito el primer fotorreceptor de luz UV-B (280-320 nm), un dímero de la proteína UVR8 (Rizzine et al, 2011).

Es mucho lo que se sabe sobre la interacción de la luz en estos fotorreceptores y su acción sobre las plantas, como por ejemplo que los fitocromos tienen un importante rol en la germinación de las semillas, en la detección del fotoperíodo, el crecimiento celular y la floración (Shinomura et al., 1996; Botto et al., 1996; Somers et al., 1998; Keara et al., 2009; Franklin et al., 2010). Por su parte los fotorreceptores de luz azul gatillan respuestas rápidas como el caso de las fototropinas que intervienen en la apertura estomática y el movimiento de cloroplastos (Assmann 1993; Kinoshita et al., 1999; Eckert et al., 2000; DeBlasio et al., 2003).

Aparte de los efectos directos en la planta, la luz también es determinante en la virulencia de los patógenos ya que afecta la movilidad de los mismos. Análisis en *Agrobacterium tumefaciens* revelan que las bacterias crecidas en luz poseen un reducido número de flagelos, uno o dos, comparado con tres a cinco en bacterias que crecen en oscuridad (Oberpichler et al., 2008).

En bacterias no fotosintéticas, como lo es el género *Pseudomonas*, los fotorreceptores (del tipo fitocromo) fueron descubiertos posteriormente a los de plantas (Davis et al, 1999) y su investigación no cesa ya que todavía hay muchas preguntas sobre la función ecológica y bioquímica de los mismos.

A raíz de esto es que el presente trabajo se centra en los fotorreceptores bacterianos, específicamente en dos mutantes del gen fotorreceptor de luz azul (*LOVA* y *LOVB*) y uno de luz roja (*phy 1*) con el objetivo de poder dilucidar mas y mejor estos complejos mecanismos.

3.2.1. Fotorreceptor de luz Roja: Fitocromo

El fitocromo es un receptor foto reversible, transformándose por el rojo y rojo lejano a través de diferentes conformaciones que absorben la luz (Quail P. et al., 1995). En todos los fitocromos, la fracción sensible a la luz es un cromóforo covalentemente unido a la apoproteína. En plantas, luego de su síntesis en el citoplasma, la apoproteína se une al cromóforo y, ante la ausencia de luz, se pliega en una conformación estable pero biológicamente inactiva. Esta conformación del fitocromo se conoce como Pr. La absorción de luz roja por la forma Pr del fitocromo convierte a la proteína en su conformación activa, Pfr, y migra al núcleo vegetal. Y a su vez, la absorción de rojo lejano por Pfr, revierte su conformación nuevamente a Pr (Nagy et al., 2000) (**figura 6**).

En *Arabidopsis thaliana* existen cinco fitocromos: PHYA, PHYB, PHYC, PHYD Y PHYE. PHYA y PHYB son los fitocromos mejor caracterizados hasta el momento y están involucrados en el control de numerosas respuestas fisiológicas. Si bien muchas de esas respuestas están mediadas por ambos fotorreceptores, estos presentan distintas funciones en la fotopercepción. El PHYB está involucrado en la percepción de los cambios de la relación rojo/rojo lejano, mientras que el PHYA percibe las transiciones entre luz y oscuridad (Casal et al., 1997). En *Arabidopsis*, PHYA y PHYB controlan la germinación, el crecimiento y la orientación gravitropica del hipocotilo, la expansión y apertura de cotiledones, la apertura del gancho apical, la elongación de la raíz principal y la formación de raíces laterales, la síntesis de clorofila y la floración entre otros procesos (Dehesh et al., 1993; Nagatani et al., 1993; Whitelam et al., 1993; Reed et al., 1994; Leu et al., 1995; Robson et al., 1997; Correll 2005).

Aunque anteriormente se creía que este fotorreceptor se limitaba únicamente a las plantas superiores, hoy también se lo incluye en plantas inferiores, algas, cianobacterias y bacterias púrpuras. Sugiriendo que todos los organismos fotosintéticos contienen fitocromo (Hughes et al, 1997; Jiang et al, 1999). Sin embargo, mediante la exploración de bases de datos genómicas⁴, fueron identificadas las primeras regiones codificantes similares a las de fitocromo en los organismos bacterianos no fotosintéticos *Deinococcus radiodurans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Davis et al, 1999).

El descubrimiento de fitocromos procariontas (Huges et al, 1997; Yeh et al, 1997; Davis et al, 1999) fue importante principalmente por que reveló su origen como una histidina quinasa de proteína (HPK), molécula conocida por integrar junto al RR (del inglés "response regulator") los dos componentes del sistema de transducción de señales en los procariontas (West et al, 2001), pero también se conoce en hongos y plantas. Este hallazgo, además, permitió producirlo en alta pureza y en grandes cantidades por medio del uso de bacterias modelos (como lo es *E.coli*), facilitando enormemente los estudios biofísicos en el contexto de la genética molecular (Essen et al, 2008).

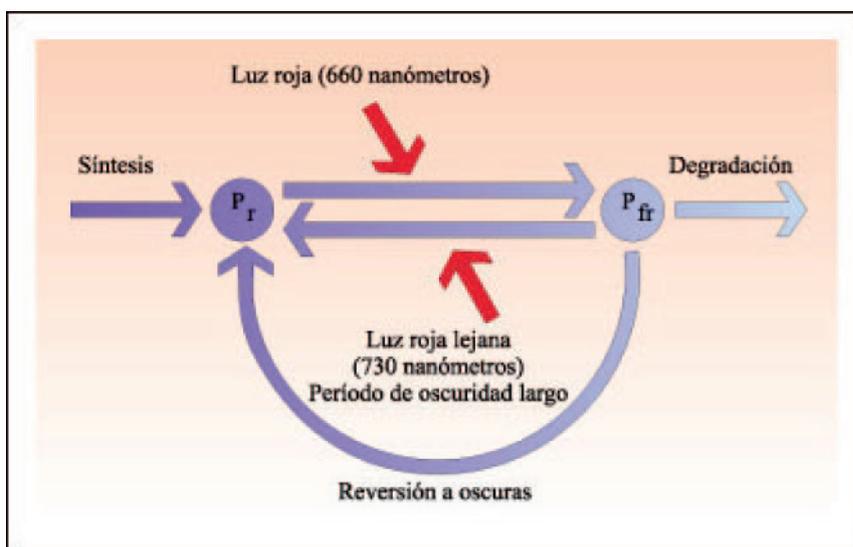


Figura 6. Foto reversión del Fitocromo. Los fitocromos son sintetizados en la forma Pr. Pr cambia a Pfr cuando se lo expone a luz roja. Pfr es la forma activa que induce la respuesta biológica. Pfr revierte a Pr cuando se lo expone a la luz roja lejana (730nm). En la oscuridad, Pfr lentamente revierte a Pr o es degradado, pero la velocidad de estas reacciones depende específicamente del tipo de fitocromo. (Clack et al, 1994)

Básicamente, cualquiera sea su origen, los fitocromos están compuestos por dos regiones: un dominio foto-sensor amino terminal y una región carboxilo terminal que esta involucrada en la dimerización de las cadenas polipeptídicas y en la generación de la señal. La secuencia aminoacídica indica que la región fotosensora esta compuesta por tres dominios adyacentes, PLD-GAF-PHY (figura 7). Donde PDL es un dominio PAS-like (Per-ARNT-Sim), GAF es una cGMP (fosfodiesterasa adenil ciclasa) que no posee una actividad enzimática concreta, y PHY es específicamente el fitocromo. En plantas, la absorbancia máxima del Pf y Pfr es de 670nm/730nm respectivamente, y en bacterias este valor es de 700nm para Pr y 750nm para Pfr (Skarrock 2008).

El cromóforo es la estructura química responsable de la absorción de la luz por parte del fitocromo. Mientras que en bacterias el cromóforo biliverdina (BV) está unido a un residuo de cisteína cerca del extremo N terminal, los fitocromos de plantas y cianobacterias adjuntan su cromóforo llamado fitocromobilina (PB) en el dominio GAF del módulo sensorial central. Sin embargo, el PB es un tetrapirrol lineal derivado del cromóforo de bacterias, lo que representa un valioso vínculo evolutivo (Frankhauser, 2001; Montgomery et al, 2002).

⁴ Base de datos disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi

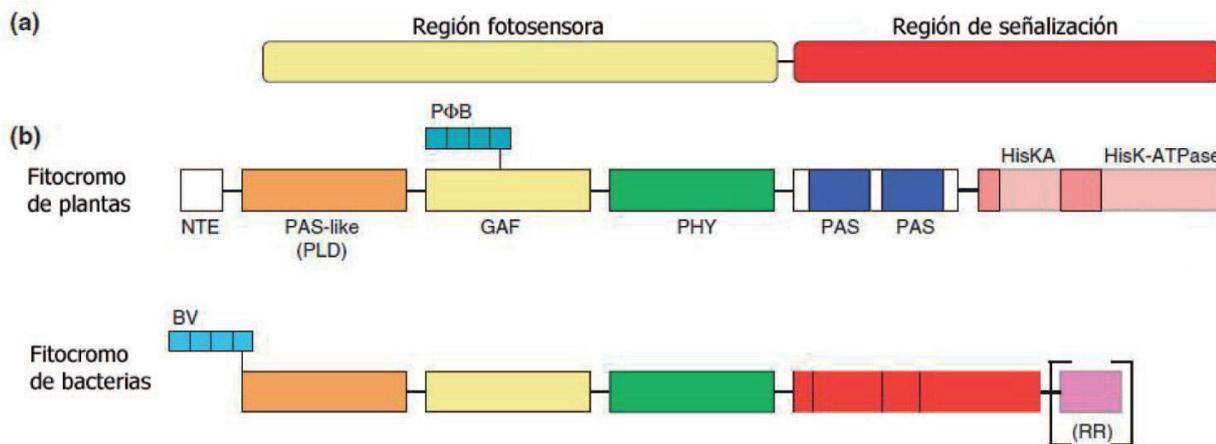


Figura 7. Estructura de los fitocromos. (a) Los fitocromos consisten en dos regiones funcionales, un dominio foto-sensor amino terminal y otro dominio carboxilo terminal involucrado en la dimerización de las cadenas polipeptídicas y en la generación de la señal. (b) Dominios conservados de fitocromos: NTE, extensión amino terminal específica de plantas; PLD, dominio PAS-like; GAF, fosfodiesterasa cGMP; PHY, fitocromo; HisKA, dominio histidina kinasa; HisK-ATPase, ATPasa de la histidina kinasa; RR, dominio regulador (se lo muestra entre corchetes ya que no está presente en todas las bacterias; es más común en fitocromos de hongos); PB y BV: cromóforos específicos de cada especie. (Sharrock 2008)

3.2.2. Fotorreceptores de luz Azul: dominio LOV

Los dominios Luz, Oxígeno y Voltaje (LOV) son un subconjunto de la superfamilia PAS que fueron identificados por primera vez en los loci de absorción de la luz azul en dos fotorreceptores quinasas de plantas conocidos como fototropinas (Huala et al., 1997). Estos fueron llamados LOV1 y LOV2 y se les asignó la función de regular las respuestas fisiológicas dependientes de la luz azul, trabajando como un módulo sensorial que transmite una señal a otros dominios de proteínas con funciones conocidas o supuestas, como la regulación de la expresión génica, la regulación del catabolismo de proteínas y la activación de quinasas (Swartz et al., 2007).

Actualmente se sabe que los dominios LOV están distribuidos en los reinos Eukarya, Archaea y Bacteria (Crosson, 2005). Los primeros dos en bacterias que han sido reportados son YtvA de *Bacillus subtilis*, una proteína LOV-STAS (del inglés, *LOV-Sulfate Transporter and anti-sigma factor antagonist*) y una proteína LOV de *Pseudomonas putida* que no contiene ningún otro dominio conocido (Gaidenko et al, 2006; Losi et al, 2002).

Un porcentaje considerable de las proteínas LOV en bacterias, son miembros de la súper familia de HPK. En bacterias, esta HPK más el RR conforman los dos componentes del sistema de transducción de señales (West et al, 2001).

Análisis de secuencias indican que los genomas de ciertos patógenos (entre ellos se encuentra *Pst DC 3000*) codifican proteínas que contienen un dominio LOV en su extremo amino terminal, y una histidina kinasa que ocupa el extremo carboxilo terminal. Secuencias proteicas y modelos estructurales de estos dominios LOV predicen que los mismos se unen a un mononucleótido de flavina (FMN) y que contienen un residuo de cisteína altamente conservado a unos pocos angstroms del cromóforo (Crosson et al., 2003). En todos los dominios LOV, este residuo de cisteína es encontrado siempre en la misma posición dentro de una secuencia conservada: GXNCRFLQG (Salomon et al, 2000). La base de esta interacción fotoquímica está impulsada por la luz azul que recibe del ambiente, provocando la formación de un enlace covalente entre esta cisteína y el cuarto átomo de carbono del anillo de flavina. En la oscuridad esta unión se rompe en un tiempo variable (de minutos hasta horas) dependiendo de la proteína LOV (Losi et al, 2008).

Actualmente la función exacta de las proteínas LOV en bacterias se desconoce. Sin embargo se estima que actúan como fotorreceptores para la fototaxis, como reguladores de la reparación del DNA y/o en la maquinaria fotosintética (West et al., 2001).

La gran foto actividad que posee este dominio implica que la luz es un factor importante para los microorganismos, y actualmente se sabe que también es requerida para su virulencia y para persistir en el ambiente; por ejemplo *Brucella abortus*, *Acinobacter baumannii* y *Caulobacter crescentus* (Swartz et al., 2007; Mussi et al., 2010; Losi, 2004, respectivamente) son bacterias de gran importancia en la investigación médica y biotecnológica, en las cuales se ha demostrado el efecto y repercusión que la luz posee sobre sus fotorreceptores de luz azul.

Es importante resaltar lo que Swartz et al (2007) muestran en su artículo, que la luz azul aumenta la actividad enzimática (auto fosforilación) del dominio LOV de *Brucella*, acrecentando su virulencia. Bacterias WT que fueron expuestas a la luz azul antes de ponerlas a prueba en el modelo de infección, resultaron ser diez veces más virulentas que las bacterias mantenidas en oscuridad. Inclusive, la delección del gen codificante de la kinasa del dominio LOV de *Brucella*, anula esta respuesta a la luz, reduciendo la proliferación celular.

Por otro lado, los resultados que refieren a *Acinobacter baumannii* indican que tanto la movilidad bacteriana como la capacidad de formar biofilms, se ven afectadas cuando las bacterias son expuestas a la luz azul; pero en oscuridad *Acinobacter baumannii* se mueve eficazmente alejándose del sitio de inoculación y, su capacidad de formar biofilms aumenta de forma considerable (Mussi et al., 2010).

A raíz de estos antecedentes en la acción de la luz sobre bacterias no fotosintéticas, como las descritas anteriormente, surge el interés de investigar en un terreno desconocido para *Pst DC 3000*.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Evaluar si la percepción de luz por las bacterias *Pst DC 3000* afecta su interacción con la planta hospedante *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares:

- Conocer los efectos que provocan mutaciones de los fotorreceptores fitocromo y LOV de bacterias sobre su capacidad de proliferación en la planta.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Cultivo del Material Vegetal.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* accesión Columbia fueron cultivadas en macetas plásticas de 110 cm³, distribuyendo una planta en cada maceta y usando como sustrato mezcla de perlita, vermiculita y turba (2:2:1). Las plantas fueron regadas con solución nutritiva Hakaphos Rojo, Compo 1X dos veces por semana durante el período de crecimiento y cultivadas en una cámara bajo una radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm) de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz blanca provista por tubos fluorescentes Osram universal 40W y Philips TLD 18W con fotoperíodo de día corto (8hs de luz/16hs de oscuridad) y una temperatura de 22-25°C durante 7 semanas.

5.2. Crecimiento del cultivo bacteriano.

Se utilizaron bacterias del género *Pst DC 3000* WT y mutantes *LOV A*, *LOV B* y *phy 1* (las mismas fueron provistas por el Dr. Wolfgang Gärtner integrante del Instituto de Química Bio-inorgánica Max Planck, Mülheim, Alemania). Una alícuota guardada a -80°C en glicerol 30% fue estriada en placas de cultivo conteniendo medio King B. (King et al, 1954) y antibióticos según el caso. Las placas fueron incubadas durante aproximadamente 16hs a 30°C. Los antibióticos utilizados fueron los siguientes: para la cepa

WT se utilizo Rifampicina 50 ugr/ml y Kanamicina 50 ugr/ml; para los mutantes *LOV A* y *LOV B* se uso Kanamicina 50ugr/ml y para *phy1* Spectinomycin 100 ugr/ml.

5.3. Inoculación de las plantas.

5.3.1. Por contacto superficial.

A partir de un cultivo crecido durante la noche (*“over night”*) las bacterias fueron resuspendidas en una solución de $MgCl_2$ 10 mM llevándolas a una concentración final de $OD_{600} = 0,3$ (aproximadamente $1,5 \cdot 10^8$ UFC/ml). Las hojas de *Arabidopsis thaliana* fueron sumergidas durante 1 minuto en la solución de bacterias y silwet-20 0,2%. El agregado de silwet-20 favorece la adhesión bacteriana a la superficie de la hoja ya que elimina los efectos de la tensión superficial del medio acuoso donde se encuentran las bacterias. Una vez infectadas, las plantas fueron agrupadas en bandejas plásticas, las cuales fueron cubiertas con un film para mantener la humedad y favorecer la entrada de la bacteria (Dangl et al., 2001b).

5.3.2. Por infiltración.

Se siguieron los mismos pasos detallados en 5.3.1 pero para generar una solución bacteriana de $OD_{600} = 0,03$ (aproximadamente $1,5 \cdot 10^7$ UFC/ml). La cara abaxial de hojas de *Arabidopsis* fueron infiltradas utilizando una jeringa (sin aguja) de 1 ml cubriendo la lamina foliar con esta solución bacteriana (Zeier et al., 2008).

5.4. Tratamientos lumínicos.

En distintos experimentos las plantas fueron expuestas a diversas condiciones de luz u oscuridad a 22-25°C:

- 5.4.1. Oscuridad continua.
- 5.4.2. Luz blanca continua, consistente en $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ provistos por tubos fluorescentes Osram universal 40W.
- 5.4.3. Luz roja continua, consistente en $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ provista por una lámpara Philips SOX 180W en combinación con filtros de acetato de color rojo y naranja superpuestos (número 106 y 105 respectivamente, de la central de las lámparas, Buenos Aires).
- 5.4.4. Luz azul continua, consistente $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ provista por diodos emisores de luz azul.
- 5.4.5. Fotoperiodos de 10 h luz blanca y 14 h de oscuridad, donde la luz blanca consistía en $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ provistos por tubos fluorescentes Osram universal 40W.

5.5. Conteo bacteriano

En todos los casos las muestras fueron extraídas diariamente durante tres días consecutivos para generar una curva de crecimiento bacteriano. Las hojas de las plantas infectadas por inmersión (5.3.1) se cortaron, se pesaron e incubaron con 1 ml de $MgCl_2$ 10mM estéril durante 60 minutos. Se realizaron diluciones seriadas al décimo y se sembraron 3µl en placas de Petri con medio King B agar (King et al., 1954) con el antibiótico correspondiente. Al cabo de 24 horas se realiza el conteo de colonias. Para obtener las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mg) se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{UFC/mg} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de colonias} \times 10^n) \cdot 1000 \text{ml } MgCl_2)}{\text{mg de hoja fresca}}$$

Donde n es el número de la dilución en la cual se contabilizaron las colonias.

Para el recuento bacteriano de las hojas infectadas por infiltración (5.3.2), se obtuvieron dos discos de 6,3 mm diámetro por hoja infectada (área foliar total extraída= 6,22 cm²). Los discos fueron incubados con agitación durante 60 minutos. Luego se realizaron tres diluciones seriadas al décimo, sembrando 3 µl de cada una en placas de Petri con medio KB agar (King et al., 1954) con el antibiótico correspondien-

te. Al cabo de 24 horas se realizó el conteo de colonias y se las multiplicó por el factor de dilución para obtener las UFC finales. En este caso se relativizó el dato al área foliar extraída en lugar del peso fresco como en el caso anterior.

5. RESULTADOS

Para llevar a cabo el estudio de interacción entre *Pst* DC3000 con *Arabidopsis thaliana* se trabajó con las plantas crecidas bajo condiciones controladas analizando, además, el desarrollo y estado global de las mismas antes y después de la inoculación bacteriana. Como nuestro principal objetivo estuvo enfocado en si la percepción de luz por las bacterias afecta su interacción con la planta hospedante y si las mutaciones provocadas en los fotorreceptores bacterianos alteran dicha interacción, realizamos diferentes formas de inoculación y tratamientos lumínicos.

Los resultados detallados a continuación son el producto del seguimiento de los tres días posteriores a la inoculación con *Pst* DC3000, expresados como UFC/mg y UFC/area, según el método de inoculación empleado.

5.1. Tratamientos de luz y oscuridad en plantas inoculadas por contacto superficial

Ciertos modelos explican la influencia de la luz en la capacidad y virulencia de las bacterias, permitiéndoles la supervivencia, o no, dentro del huésped (Mussi et al., 2010; Swartz et al., 2007; Losi, 2004). Pusimos a prueba esta hipótesis con nuestro sistema de interacción *Pst* DC 3000-*Arabidopsis* comparando las UFC/mg extraídas de plantas crecidas bajo luz blanca continua versus oscuridad continua.

Como se observa en la **figura 8a**, cuando las bacterias crecen en condiciones de luz continua, las líneas mutantes *LOV A* y *LOV B* muestran mayor crecimiento en comparación con el genotipo WT. Al mismo tiempo, no se observaron diferencias entre de la línea WT y la mutante *phy1*. Esta diferencia entre WT y *LOV* no se observa en la **figura 8b**, desaparece cuando la planta es transferida a oscuridad continua luego de la inoculación. En el WT, esta última condición favoreció un aumento del crecimiento de las bacterias, comparada con aquellas crecidas en luz continua. Por su parte las líneas *LOVA* y *LOV B* mostraron resultados similares en luz u oscuridad entre ambos tratamientos.

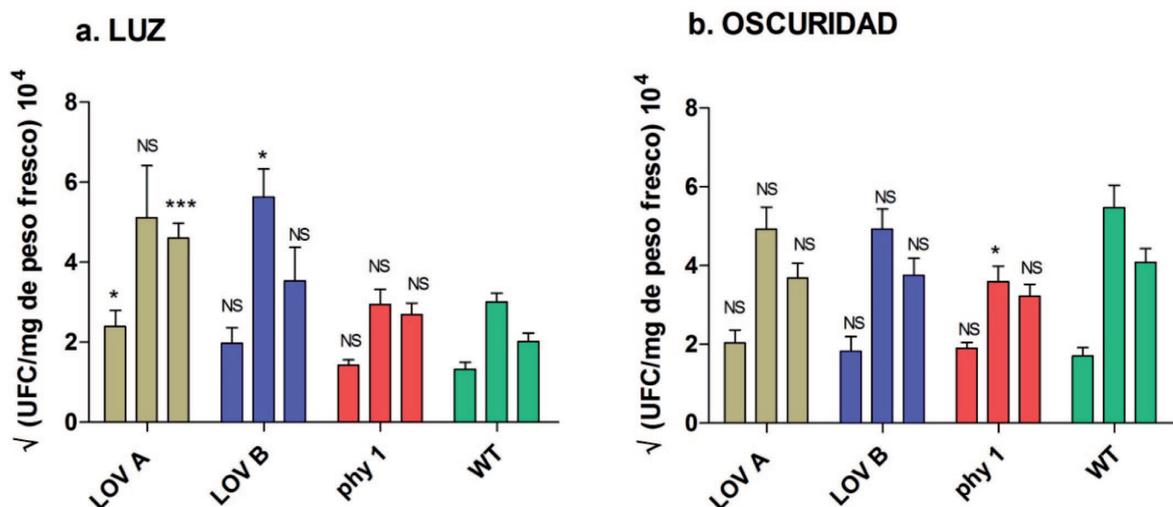


Figura 8. Crecimiento bacteriano bajo luz blanca y oscuridad. a. Raíz cuadrada de las UFC/mg de peso fresco infectadas por contacto superficial con tratamiento lumínico de luz continua durante tres días. **b.** Raíz cuadrada de las UFC/mg de peso fresco infectadas por contacto superficial con tratamiento lumínico de oscuridad continua durante tres días. Los datos son promedios y error estándar de 35 (luz) o 19 (oscuridad) plantas por punto. Fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de un factor, seguido con un test de comparación múltiple de Dunnett con respecto a WT. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS= no significativo.

5.2. Crecimiento de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y mantenidas en luz continua

Al notar que, inoculando las hojas por inmersión, las diferencias significativas se observaban en condiciones de luz, utilizamos esa condición para evaluar el impacto de las mutaciones cuando las bacterias eran inoculadas por infiltración. Al infiltrar las hojas con una jeringa y forzar la entrada de la bacteria, se favorece la infección y se puentea cualquier diferencia entre genotipos asociadas a la capacidad de entrar a la planta. Por este motivo es que en el recuento general, las UFC resultan más elevadas en la **figura 9** que en la **figura 8**.

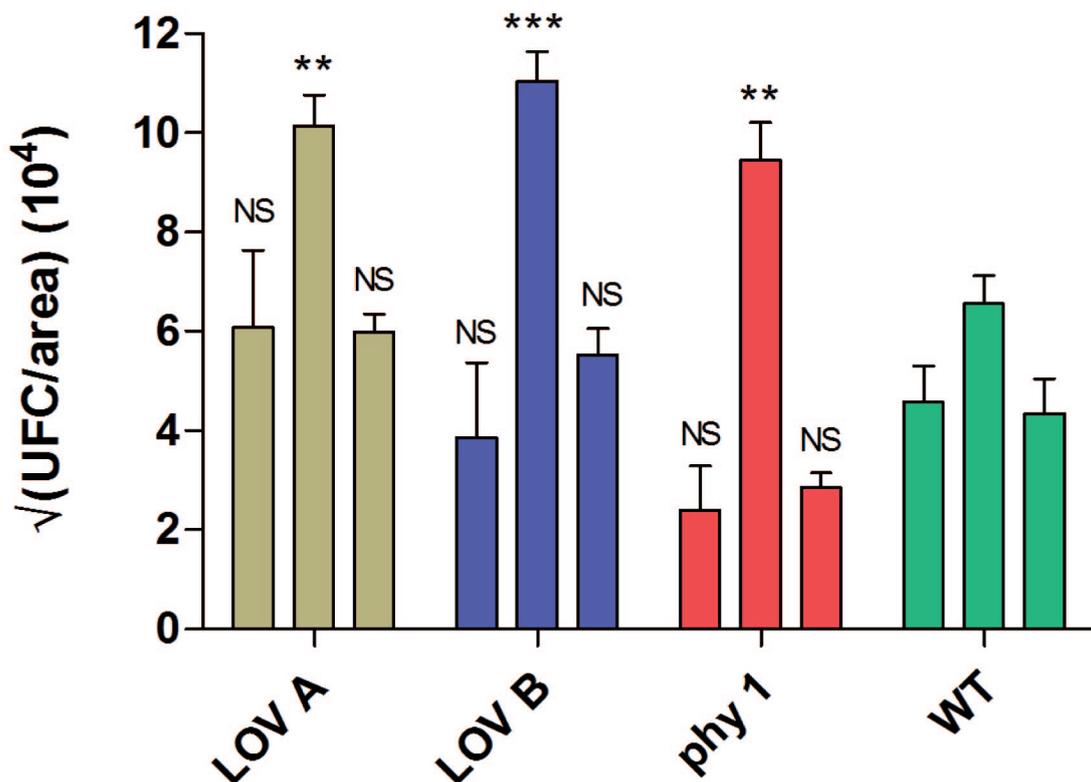


Figura 9. Crecimiento bacteriano bajo luz blanca continua. Raíz de UFC obtenidas por infiltración con tratamiento lumínico luz blanca continua durante tres días. Los datos son promedios y error estándar de 8 plantas por punto. Fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de un factor, seguido con un test de comparación múltiple de Dunnett con respecto a WT. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS= no significativo.

Como muestra el gráfico de la **figura 9**, los efectos de las mutaciones sobre el crecimiento bacteriano tienden a ser los mismos que en plantas inoculadas por inmersión. Esto es, los mutantes **LOV A** y **LOV B** muestran mayor número de UFC que la cepa WT. En cambio, a diferencia de la **figura 8**, la línea mutante para **phy1** también muestra un mayor número de UFC, algo que no se había observado en los experimentos con inoculación por inmersión de la figura anterior.

5.3. Crecimiento de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y expuestas a luz roja o luz azul continua

Este experimento nos permitirá entender si el efecto de las mutaciones LOV es específico de la luz azul.

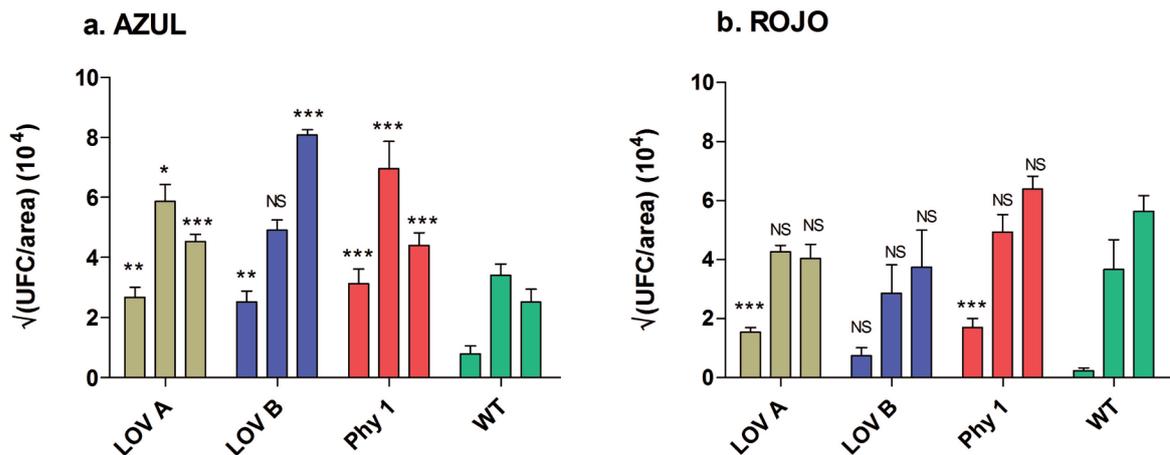


Figura 10. Crecimiento bacteriano bajo luz azul y luz roja. a. Raíz de UFC obtenidas por infiltración con tratamiento lumínico de luz azul continua durante tres días. b. Raíz de UFC obtenidas por infiltración con tratamiento lumínico de luz roja continua durante tres días. Los datos son promedios y error estándar de 12 (azul) o 10 (rojo) plantas por punto. Fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de un factor, seguido con un test de comparación múltiple de Dunnett con respecto a WT. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS= no significantivo.

Como muestra la **figura 10a**, cuando la infección se da bajo tratamientos de luz azul continua, los mutantes LOV mostraron tener mayor capacidad de proliferación dentro de la planta en comparación con las plantas inoculadas con el WT. Los tratamientos de luz roja, **figura 10b**., mostraron que no hay diferencias en el crecimiento bacteriano. Mientras que en los resultados anteriores, los mutantes LOV daban valores mas altos que el WT, aquí las bacterias mutantes del fotorreceptor LOV disminuyeron el número de UFC con respecto al WT.

5.4. Proliferación de las bacterias en plantas inoculadas mediante infiltración con jeringa y expuestas a fotoperiodos de 10 h de luz y 14 h de oscuridad

Los cuatro genotipos bacterianos fueron expuestos a un fotoperiodo de 10 horas de luz blanca y 14 horas de oscuridad, que es un fotoperiodo que se pueden encontrar en condiciones naturales. A lo largo de los tres días posteriores a la inoculación las muestras fueron recolectadas dos veces por días, mientras la planta permanecía en la etapa oscura y, después de 10 horas de luz continua, antes que comience el nuevo ciclo de oscuridad. La información aquí recolectada fue dividida en dos gráficos, según el horario en el que se cosecharon las muestras (**figura 11**).

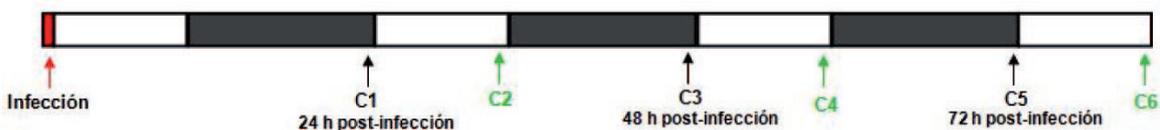


Figura 11. Diagrama de cosechas. Inmediatamente después de la inoculación con la solución bacteriana, las plantas fueron acondicionadas bajo un fotoperiodo de 10 horas luz (recuadros blancos) y 14 horas oscuridad (recuadros negro). Luego de 24 horas de infección bajo este fotoperiodo se procedió a realizar el muestreo, cosechando las hojas infectadas por la mañana temprano, mientras las plantas permanecían en la fase oscura (C1, C3 y C5), y por la tarde, antes de que finalice la etapa lumínica (C2, C4 y C6).

En el grafico de la **figura 12a** se observa el número de UFC saliendo de la etapa de oscuridad y en la **figura 12b** el número de UFC al finalizar la etapa lumínica. El resultado obtenido fue que las bacterias crecieron en el periodo de oscuridad, aumentando la cantidad de UFC en esta etapa. También se puede observar la diferencia entre WT y el resto de los genotipos; en ambos periodos, su crecimiento está disminuido, manteniendo la misma tendencia que se vino observando a lo largo de los diferentes tratamientos lumínicos.

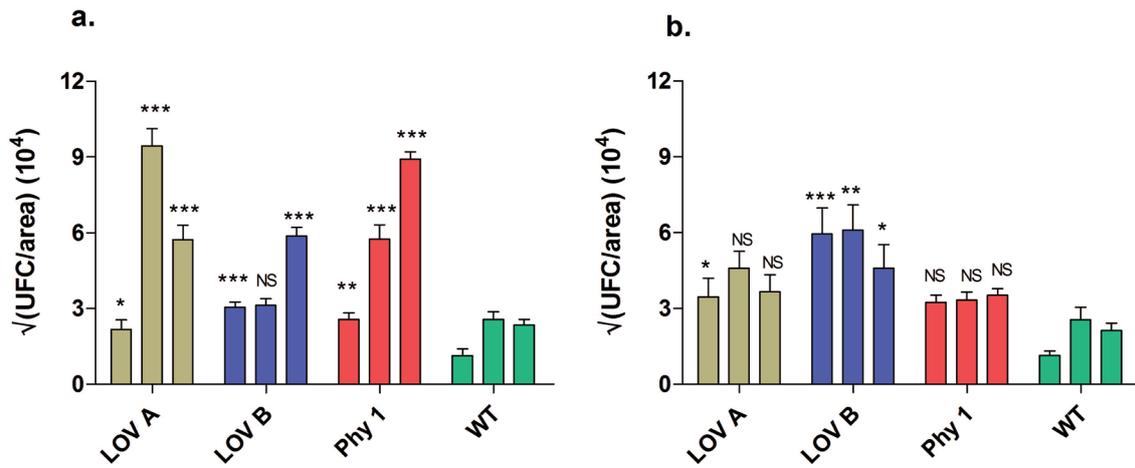


Figura 12. Fotoperiodo 10 h luz/14 h oscuridad. a. Raíz de UFC obtenidas por infiltración, muestras cosechadas en etapa oscura. **b.** Raíz de UFC obtenidas por infiltración, muestras cosechadas en etapa lumínica. Los datos son promedios y error estándar de 15 plantas por punto. Fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de un factor, seguido con un test de comparación múltiple de Dunnett con respecto a WT. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS= no significativo.

6. DISCUSIÓN

La importancia de la luz en la interacción planta-patógeno es cada vez más evidente, y a partir del descubrimiento de los fotorreceptores bacterianos (Davis et al, 1999) se ha puesto un gran interés en conocer el rol de los mismos en esta interacción. Estudios recientes muestran los efectos directos de la luz sobre ambos organismos, tanto en la respuesta de defensa de la planta huésped, como en la virulencia del patógeno atacante (Griebel et al., 2008; Swartz et al., 2007; Chandra-Shekara et al., 2006).

Nuestro modelo de investigación es el sistema formado por la planta *Arabidopsis thaliana* y la bacteria *Pst* DC 3000. En este sistema evaluamos si la luz percibida por la bacteria influye en su capacidad de crecer en la planta. Para ello utilizamos la cepa bacteriana WT y dos líneas mutantes de fotorreceptores: fitocromo (*phy 1*) y LOV (*LOV A* y *LOV B*). De acuerdo con lo que se ha observado en plantas, los fitocromos y criptocromos son fotorreceptores de luz roja y luz azul, respectivamente. Sin embargo, la selectividad espectral in vivo no era conocida en bacterias.

En este trabajo, al comparar los resultados de las plantas inoculadas con bacterias que crecieron en luz continua luego de la inoculación, versus las que crecieron en oscuridad continua (**figura 8**), se puede concluir que la exposición a la luz no resulta favorable para el desarrollo de *Pst* DC 3000 in planta. Esto contrasta con lo que sucede con el genotipo WT de *Brucella*, en ella su patogénesis aumenta considerablemente cuando es expuesta a la luz, momento en el cual incrementa su virulencia para ingresar a su huésped (animales superiores) donde no hay luz (Swartz et al., 2007). A diferencia de lo observado para la cepa WT, las mutantes LOV mostraron valores altos de crecimiento en planta tanto a la luz como en oscuridad. Los valores en oscuridad fueron similares a la de la línea WT. Por lo tanto, el fenotipo de los mutantes LOV es específico de la condición donde el sistema es expuesto a la luz. No se noto cambio alguno con las bacterias mutantes *phy 1*, las mismas muestran un patrón muy similar al observado en las WT. A partir de esto se puede concluir que LOV es el fotorreceptor encargado de percibir la luz que restringe el crecimiento bacteriano en la planta y que el fotorreceptor *phy 1* no tendría un rol específico asociado a esta interacción.

Dado que LOV es considerado un fotorreceptor de luz azul, se procedió a estudiar el comportamiento de la cepa salvaje y sus mutantes bajo condiciones de luz roja (λ 630nm) con condiciones de luz azul (λ 430nm) luego de la infección. Los resultados de la **figura 10a** muestran que las bacterias WT tuvieron un crecimiento reducido bajo luz azul y las líneas mutantes para el fotorreceptor LOV (*LOV A* y *LOV B*) resultaron favorecidas en esta condición lumínica. En cambio, bajo luz roja (**figura 10b**) no se observaron diferencias entre las cepas WT y mutantes de LOV y *phy 1*. Esto indica que el fotorreceptor LOV es activado selectivamente por la luz azul y provoca la disminución del crecimiento bacteriano, contrastando con el genotipo WT de *Brucella*, el cual prolifera de manera exitosa bajo luz azul.

Cabe preguntarse la función que pudiera corresponderle a la inhibición del crecimiento bacteriano en la planta por la luz azul. En tal sentido, la luz es el principal factor externo que influye en el crecimiento y desarrollo de la planta, y el funcionamiento de los mecanismos de defensa de la misma durante la interacción con los patógenos es reforzada por la presencia de luz (Roberts et al., 2006) mientras que la capacidad de defensa de las plantas se ve atenuada durante la noche (Griebel et al., 2008). En este contexto, podría proponerse que las bacterias tengan una estrategia ajustada a la de las plantas y proliferen más intensamente durante la noche, cuando las defensas son más bajas. A favor de esta idea, cuando las plantas infectadas fueron expuestas a fotoperiodos de 10 horas luz y 14 horas oscuridad, el crecimiento bacteriano coincidió con la etapa oscura del fotoperiodo (**figura 12a.**) y se volvió a frenar cuando comenzó la etapa lumínica del día siguiente (**figura 12b.**). Estos resultados sugieren que a *Pst* DC 3000 le es suficiente tener un periodo relativamente corto en oscuridad para disparar el crecimiento bacteriano. Sin embargo, no constituyen una prueba de la ocurrencia de mayor crecimiento bacteriano inducido por la oscuridad en el período en cuestión. Podría darse que simplemente el momento de máximo crecimiento haya coincidido por casualidad con el período de oscuridad. Deberían probarse períodos de oscuridad dados en distintos momentos para evaluar si el crecimiento sigue coincidiendo con el período de oscuridad.

Una hipótesis alternativa es que la luz percibida por el fotorreceptor con dominio LOV permita a la bacteria detectar que está en la planta y no en el suelo (donde la oscuridad es absoluta unos pocos milímetros bajo la superficie). Tal vez, un crecimiento excesivo en la planta podría dañar a la planta eliminando

muy rápidamente el ambiente en que la bacteria se encuentra, poniendo en riesgo a la población. Si bien esta idea es especulativa, permite establecer una coincidencia con los resultados obtenidos en *Brucella*. En efecto, dentro de sus huéspedes (las plantas en *Pst* DC 3000 y los cerdos y vacas en *Brucella*) las bacterias estarían respectivamente expuestas a luz o predominantemente en oscuridad. Esto es, en cada caso, en la condición en que el crecimiento es inhibido. Podría deberse, en ambas bacterias, que una menor agresividad ante el huésped permita una mayor persistencia de la población.

7. CONCLUSIÓN

A lo largo de este trabajo se pudo corroborar, utilizando como modelo de experimentación la bacteria Pst DC3000, la importancia de la luz en su capacidad de proliferación y supervivencia frente a su huésped *Arabidopsis thaliana*. Específicamente logramos evidenciar el papel de fotorreceptor de luz azul LOV en dicha interacción; las infecciones que se establecieron bajo luz azul mostraron menor crecimiento bacteriano en el WT, y las bacterias deficientes del fotorreceptor LOV (*LOV A* y *LOV B*) no mostraron inhibición en su propagación. Esto nos permite concluir que una de las acciones del fotorreceptor con dominio LOV en bacterias es la represión del crecimiento cuando censan la luz azul como parte de un sistema de defensa frente a la represión de la planta.

8. REFERENCIAS

- **Alfano JR. & Collmer A.** (1996). *Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall*. Plant Cell 8(10); 1683-1698.
- **Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) *Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. Nature 408(6814):796-815.
- **Assmann SM.** (1993). *Signal transduction in guard cells*. Annu Rev Cell Biol 9; 345-75.
- Belkhadir Y., Subramaniam R. & Dangl JL. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. Curr Opin Plant Biol. 7(4):391-9.
- **Bisgrove SR., Simonich MT., Smith NM., Sattler A. & Innes RW.** (1994). *A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes*. Plant Cell. 6(7):927-33.
- **Botto JF., Sanchez, RA., Whitelam GC. & Casal JJ.** (1996). *Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in Arabidopsis*. Plant Physiol. 110(2); 439-444.
- **Briggs WR, Christie JM, Salomon M.** (2001). *Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants*. Antioxid Redox Signal. 3(5); 775-88.
- **Buell CR., Joardar V., Lindeberg M., Selengut J., Paulsen IT., Gwinn ML., Dodson RJ., Deboy RT., Durkin, S., Kolonay, JF., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, MJ., Haft, DH., Nelson, WC., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, G., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry K., Utterback, T., Van Aken, S., Feldblyum TV., D'Ascenzo, M., Deng, WL., Ramos, AR., Alfano, JR., Cartinhour, S., Chatterjee, AK., Delaney, TP., Lazarowitz, SG., Martin, CB., Schneider, DJ., Tang, X., Bender, CL., White, O., Fraser, CM. & Collmer, A.** (2003). *The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen Pseudomonas syringae pv. Tomato DC3000*. PNAS 100(18); 10181-10186.
- **Büttner D. & Yang S.** (2009). *Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria*. Plant Physiology. 150; 1656–1664.
- **Casal JJ., Sánchez RA. & Yanovsky M J.** (1997). *The function of phytochrome A*. Plant, Cell & Environment 20, 813-819.
- **Chandra-Shekara AC., Gupte M., Navarre D., Raina S., Raina R., Klessig D. & Kachroo P.** (2006). *Light-dependent hypersensitive response and resistance signaling against Turnip Crinkle Virus in Arabidopsis*. Plant J. 45(3):320-34.
- **Chen Z., Agnew J., Cohen J., He P., Shan L., Sheen J. & Kunkel B.** (2007). *Pseudomonas syringae type III efp effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology*. PNAS 104(50); 20131–20136.
- **Chen Z., Kloek, AP., Cuzick A., Moeder W., Tang D., Innes RW., Klessig DF., McDowell JM. & Kunkel BN.,** (2004). *The Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 functions downstream or independently of SA to promote virulence on Arabidopsis thaliana*. Plant J. 37(4); 494-504.
- **Chisholm ST., Dahlbeck, D., Krishnamurthy N., Day, B., Sjolander K. & Staskawicz BJ.** (2005). *Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the Pseudomonas syringae effector AvrRpt2*. PNAS 102(6); 2087-2092.
- **Clack T, Mathews S. & Sharrock RA.** (1994) *The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE*. Plant Mol Biol. 25(3):413-27.

- **Corell MJ. & Kiss JZ.** (2005). *The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots*. Plant. Cell. Physiol. 46, 317–323.
- **Crosson S.** en *Handbook of photosensory receptor* (2005). Editores Briggs W. & Spudich L. Wiley VCH, Weinheim; 323-336.
- **Crosson S., Rajagopal S. & Moffat K.** (2003). *The LOV family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains*. American Chemical Society 42; 2-10.
- **Curtis H. & Barnes, SN.** (2000). *Biología 6ª edición*. Editorial médica Panamericana.
- **Dang JL., & Jones, JD.** (2001). *Plant pathogens and integrated defense response to infection*. Nature 441; 826-833
- **Dang JL., & Tornero P.** (2001). *A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 28(4);475-481.
- **Davis SJ, Vener AV. & Vierstra RD.** (1999) *Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria*. Science 286(5449):2517-20.
- **De Boera, H., Lammertsma, E., Cremerb, WF., Dilcher, D., Wassena, M. & Dekkera S.** (2011). *Climate forcing due to optimization of maximal leaf conductance in subtropical vegetation under rising CO2*. PNAS 108(10); 4041–4046.
- **De Wit.** (2002). *On guard*. Nature 416; 801- 804.
- **DeBlasio, S., Mullen, J., Luesse, D. & Hangarter R.** (2003). *Phytochrome Modulation of Blue Light-Induced Chloroplast Movements in Arabidopsis*. Plant Physiology 133; 1471-1479
- **Dehesh K., Franci C., Parks BM., Seeley KA., Short TW., Tepperman JM. & Quail PH.** (1993) *Arabidopsis hy8 locus encodes phytochrome A*. Plant Cell 5, 1081-1088.
- **Desveaux D., Singer AU., Wu AJ., McNulty BC., Musselwhite L., Nimchuk Z., Sondek J. & Dangl JL.** (2007). *Type III effector activation via nucleotide binding, phosphorylation, and host target interaction*. PLoS Pathog. 3(3):48.
- **Eckert M. & Kaldenhoff., R.** (2000). *Light-induced stomatal movement of selected Arabidopsis thaliana mutants*. J Exp Bot. 51(349); 1435-42.
- **Essen LO, Mailliet J, Hughes J.** (2008) *The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state*. Proc Natl Acad Sci U S A. 105(38):14709-14.
- **Feil H., Feil WS., Chain P., Larimer F., DiBartolo G., Copeland A., Lykidis A., Trong S., Nolan M., Goltsman E., Thiel J., Malfatti S., Loper JE., Lapidus A., Detter JC., Land M., Richardson PM., Kyrpides NC., Ivanova N. & Lindow SE.** (2005). *Comparison of the complete genome sequences of Pseudomonas syringae pv. syringae B728a and pv. tomato DC3000*. Proc Natl Acad Sci U S A 102(31):11064-9.
- **Flor HH.** (1971). *Current status of the gene-for-gene concept*. Annual Review of Phytopathology 9, 275-296.
- **Frankhauser C.** (2001) *The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptor*. The Journal of Biological Chemistry, 276 (15); 11453-11456.
- **Franklin K., & Quail P.** (2010). *Phytochrome functions in Arabidopsis development*. Journal of Experimental Botany 61(1);11–24.
- **Galán J. & Collmer A.** (1999) *Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells*. Science 284; 1322-1328.

- **Genoud T., Buchala AJ., Chua NH. & Métraux JP.** (2002). *Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis*. *Plant J.* 2002 Jul;31(1):87-95.
- **Glazebrook, J., Rogers, EE. & Ausubel, FM.** (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annu. Rev. Genet.* 31; 547–569.
- **Griebel T. & Zeier J.** (2008). *Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in Arabidopsis: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense*. *Plant Physiology*, 147; 790-801.
- **Gudesblat GE., Torres PS. & Vojnov AA.** (2009) *Stomata and pathogens: Warfare at the gates*. *Plant Signal Behav.* 4(12):1114-6.
- **Gutierrez, CG.** (2001). *Señales entre hongos patógenos y plantas hospedadoras resistentes*. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 7(1); 15-19. Universidad autónoma Chapingo, Mexico.
- **Heath, MC.** (2000). *Hypersensitive response-related death*. *Plant Mol Biol.* 44(3); 321-34.
- **Hou S., Yang Y. & Zhou J.** (2009). *The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen*. *Plant Signaling & Behavior* 4(4); 283-293.
- **Huala E., Oeller PW., Liscum E., Han IS., Larsen E. & Briggs WR.** (1997) *Science* 278; 2120-2123.
- **Hüeck C.** (1998). *Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 26(2); 379-433.
- **Hughes J, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E, Gärtner W, Wilde A. & Börner T** (1997). *A prokaryotic phytochrome*. *Nature* 386(6626):663
- **Jiang Z, Swem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G. & Bauer CE.** (1999) *Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes*. *Science* 285(5426):406-9.
- **Joardar V., Lindeberg M., Jackson RW., Selengut J., Dodson R., Brinkac LM., Daugherty SC., Deboy R., Durkin AS., Giglio MG., Madupu R., Nelson WC., Rosovitz MJ., Sullivan S., Crabtree J., Creasy T., Davidsen T., Haft DH., Zafar N., Zhou L., Halpin R., Holley T., Khouri H., Feldblyum T., White O., Fraser CM., Chatterjee AK., Cartinhour S., Schneider DJ., Mansfield J., Collmer A. & Buell CR.** (2005). *Whole-genome sequence analysis of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition*. *J Bacteriol.* 187(18):6488-98.
- **Kim WY., Fujiwara S., Suh SS., Kim J., Kim Y., Han L., David K., Putterill J., Nam HG. & Somers DE.** (2007). *ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilize by GIGANTEA in blue light*. *Nature* 449; 356-360.
- **King EO., Ward MK. & Raney DE.** (1954). *Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin*. *J Lab Clin Med.* 44(2):301-7.
- **Kinoshita T. & Shimazaki K.** (1999). *Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells*. *EMBO J.* 18(20); 5548-58.
- **Leu WM., Cao XL., Wilson TJ., Snustad DP. & Chua, NH.** (1995). *Phytochrome A and phytochrome B mediate the hypocotyl-specific downregulation of TUB1 by light in Arabidopsis*. *Plant Cell* 7, 2187-2196.
- **Losi A.** (2004) *The bacterial counterparts of plant phototropins*. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 566-574.
- **Losi A., Polverini E, Quest B. & Gärtner W.** (2002). *First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes*. *Biophys J.* 82(5):2627-34.

- **Losi A. & Gärtner W.** (2006). *Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors*. Photochem Photobiol 7(10):1168-78.
- **Mackey D., Holt BF., Wiig A. & Dangl JL.** (2002). *RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in Arabidopsis*. Cell. 108:743–754.
- **Macnab RM.** (2003). *How bacteria assemble flagella*. Annu Rev Microbiol. 57; 77-100.
- **MacRobbie E.** (1998). *Signal transduction and ion channels in guard cells*. Philosophical Transactions of the Royal Society London 353; 1475-1488.
- **Madriz OK.** (2002). *Manejo integrado de plagas*. Costa Rica 63; 22-32
- **Mansfield JW.** (2009). *From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity*. Mol. Plant Pathol. 10; 721- 734.
- **Mao J., Zhang YC., Sang Y., Li QH. & Yang HQ.** (2005). *From the cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening*. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(34):12270-5.
- **Meinke DW., Cherry JM., Dean C., Rounsley SD. & Koornneef M.** (1998) *Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis*. Science 282(5389); 662, 679-82.
- **Melloto M., Underwood W., Koczan J., Normura K. & He SY.** (2006). *Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion*. Cell 126; 969-980.
- **Melotto M., Underwood W., & He SY.** (2007). *Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases*. Annu. Rev. Phytopathol. 46; 101- 122.
- **Mole BM., Baltrus DA., Dangl JL., & Grant SR.** (2007). *Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria*. TRENDS in Microbiol. 15, 363- 371
- **Montgomery BL. & Lagarias JC.** (2002). *Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light*. Trends Plant Science 7(8):357-66.
- **Mussi MA., Gaddy JA., Cabruja M., Arivett BA., Viale AM., Rasia R. & Actis LA.** (2010) *The opportunistic human pathogen Acinetobacter baumannii senses and responds to light*. J Bacteriol. 192(24):6336-45.
- **Nabors MW.** (2006). *Introducción a la botánica*, 1° edición,. Editorial Pearson Educacion.
- **Nagatani A., Reed JW. & Chory J.** (1993). *Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A*. Plant Physiol. 102, 269-277.
- **Nagy F., Kircher S. & Schafer E.** (2000). *Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochromes*. Semin. Cell Dev. Biol. 11; 505-510.
- **Oberpichler I., Rosen R., Rasouly A., Vugman M., Ron EZ. & Lamparter T.** (2008). *Light affects motility and infectivity of Agrobacterium tumefaciens*. Environ Microbiol. 10(8):2020-9.
- **Quail PH.** (2002). *Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms?* Curr. Opin. Cell Biol. 14(2); 180-8.
- **Quail PH., Boylan MT., Parks BM., Short TW., Xu Y. & Wagner D.** (1995). *Phytochromes: photosensory perception and signal transduction*. Science 268, 675-680.

- **Reed JW., Nagatani A., Elich TD., Fagan M. & Chory J.** (1994). *Phytochrome A and Phytochrome B have overlapping but distinct functions in Arabidopsis development*. Plant Physiol. 104, 1039-1049.
- **Rizzini L., Favory JJ., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins GI. & Ulm R.** (2011). *Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein*. Vol. 332(6025); 103-106
- **Roberts MR. & Paul ND.** (2006). *Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens*. New Phytol. 170(4):677-99.
- **Robson PRH. & Smith H.** (1997). *Fundamental and biotechnological applications of phytochrome transgenes*. Plant Cell & Environ. 20, 831-839.
- **Roden LC., & Ingle RA.** (2009). *Lights, rhythms, infection: the role of light and the circadian clock in determining the outcome of plant-pathogen interactions*. Plant Cell, 21; 2546-2552.
- **Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U & Briggs WR.** (2000) *Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin*. Biochemistry 39 (31): 9401-10.
- **Shah, J.** (2009). *Plants under attack: systemic signals in defense*. Current Opinion in Plant Biology 12; 459-464.
- **Sharrock, RA.** (2008) *The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily*. Genome Biology 9, 230.
- **Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M. & Furuya M.** (1996). *Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 93(15); 8129-33.
- **Shirasu K. & Schulze-Lefert P.** (2003) *Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways*. Trends Plant Sci. 8(6):252-8.
- **Smith TH., Dunez J., Lelliot RA., Phillips DH. & Archier SA.** (1988). *Manual de enfermedades de las plantas*. Ediciones Mundi-Presa.
- **Somers DE., Devlin PF. & Kay SA.**(1998). *Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock*. Science 282(5393); 1488-90.
- **Sreedharan A., Vazquez A., Kunkel B. & Bender C.** (2006). *CorR Regulates Multiple Components of Virulence in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(7); 768-779.
- **Stoelzle S., Kagawa T., Wada M., Hedrich R. & Dietrich P.** (2003) *Blue light activates calcium-permeable channels in Arabidopsis mesophyll cells via the phototropin signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 1456-1461.
- **Swartz TE., Tseng TS., Frederickson MA., Paris G., Comerci DJ., Rajashekara G., Kim JG., Mudgett MB., Splitter GA., Ugalde RA., Goldbaum FA., Briggs WR. & Bogomolni RA.** (2007). *Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria*. Science 317(5841); 1090-1093.
- **Tornero P. & Dangl J.** (2001). *A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 28(4):475-481.
- **Underwood W., Melotto M. & He YS.** (2007). *Role of plant stomata in bacterial invasion*. Cellular Microbiology 9(7); 1621-1629.

- **West A. & Stock M.** (2001). *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems*. *Biochemical Science* 26; 369-376.
- **Whitelam GC., Johnson E., Peng J., Carol P., Anderson ML., Cowl JS. & Harberd NP.** (1993). *Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light*. *Plant Cell* 5, 757-768.
- **Yeh KC., Wu SH., Murphy JT. & Lagarias JC.** (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*. 277(5331):1505-8.
- **Zeier J. & Griebel T.** (2008). *Light regulation and daytime dependency of inducible plant defense in Arabidopsis: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense*. *Plant Physiology* 147;790-801.
- **Zeier J., Pink B., Mueller MJ. & Berger S.** (2004) *Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation*. *Planta* 219(4):673-83.