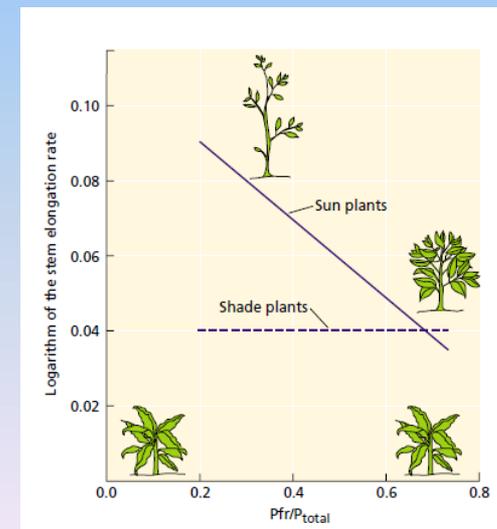
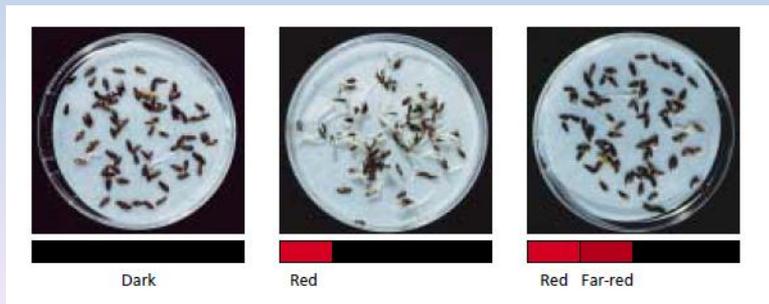


TP Fotomorfogénesis: control de la elongación de tallos y pecíolos por la relación Rojo: Rojo lejano en *Phaseolus vulgaris*



Unidad 12 Fotomorfogénesis: La luz como fuente de información para las plantas. El ambiente lumínico. El microclima lumínico del canopeo. Fotorreceptores. Los Fitocromos, criptocromos y fotorreceptores del UV. Espectros de absorción. Relación rojo/rojo lejano (ζ). Fotoequilibrio (ϕ). Procesos en los que participan los fitocromos. Percepción del entorno, desetiolación, germinación, **elongación del tallo**, macollaje y ramificación, vuelco de los cereales, apertura del gancho plumular. Posibles aplicaciones de la fotomorfogénesis a la producción vegetal. Sobre y subexpresión génica del fitocromo.

Fotomorfogénesis

Etimológicamente: 'morfogénesis inducida por la luz'

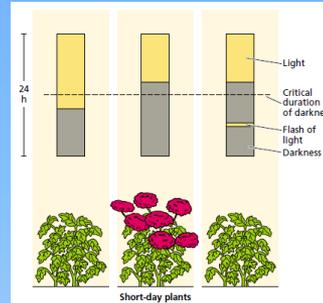
Efectos de la luz (en su carácter informativo) sobre la morfo-fisiología de las plantas



Aspectos informativos de la luz

Densidad de flujo fotónico

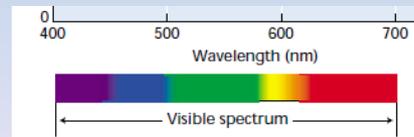
Duración (fotoperiodismo)



Dirección (fototropismo)

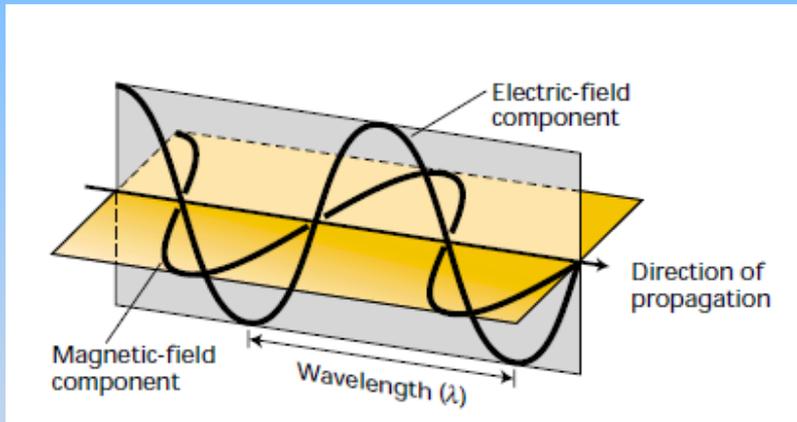


Composición espectral
(= 'calidad')



En esta clase nos focalizaremos en este aspecto informativo de la luz

Recordemos la naturaleza dual de la luz = onda y partícula

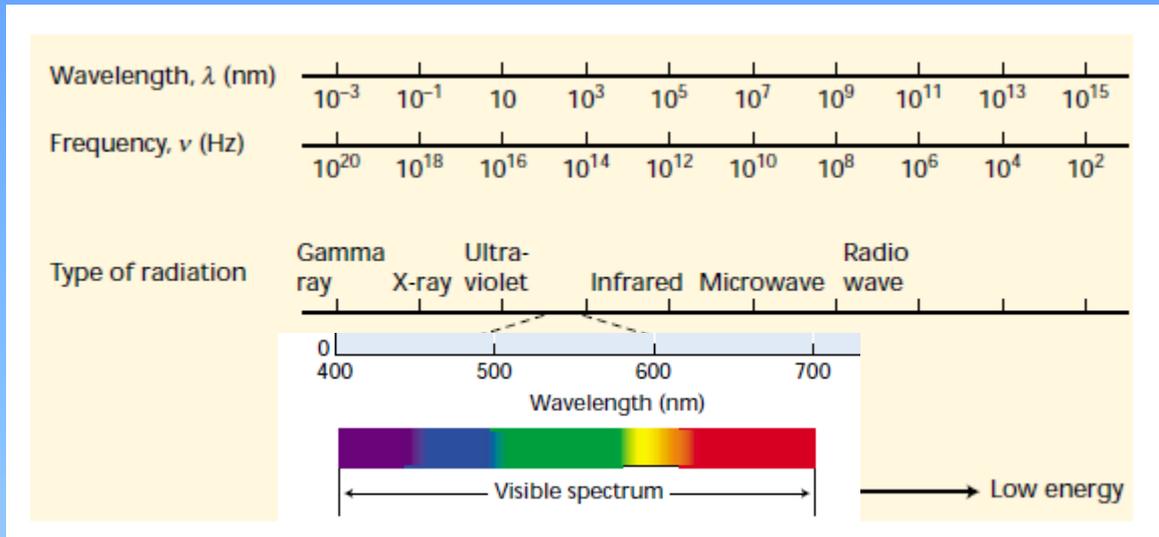


Densidad de Flujo Fotónico Fotosintético (DFFF) o 'irradiancia'

longitud de onda (λ)

(nm)

$\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$



Azul \cong 450 nm

Verde \cong 550 nm

Rojo \cong 660 nm

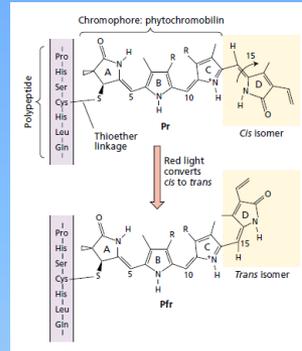
Rojo lejano \cong 730 nm

¿A qué nos referimos cuando hablamos de colores?

¿Cómo perciben las plantas la información de la luz?: fotorreceptores



Fotorreceptor



Transducción de la señal (regulación de enzimas, des-represión de genes etc.)

Respuesta

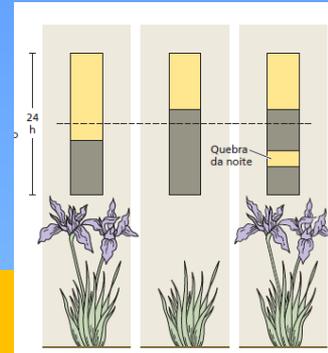
Algunos fotorreceptores de plantas...

Fitocromos
(rojo, rojo lejano)



Fotoblastismo de semillas

Des-etiolación en plántulas

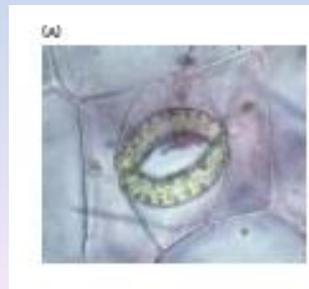


Respuestas fotoperiódicas

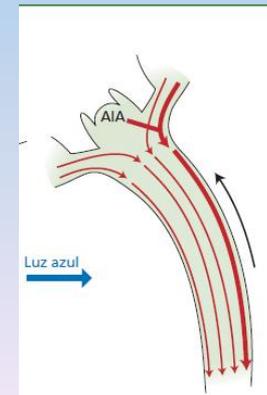
Elongación de tallos y pecíolos ('escape al sombreado')



Fototropinas (UV-azul)



Apertura estomática



Fototropismo

Algunos fotorreceptores de plantas...

**Criptocromos (UV-
azul)**



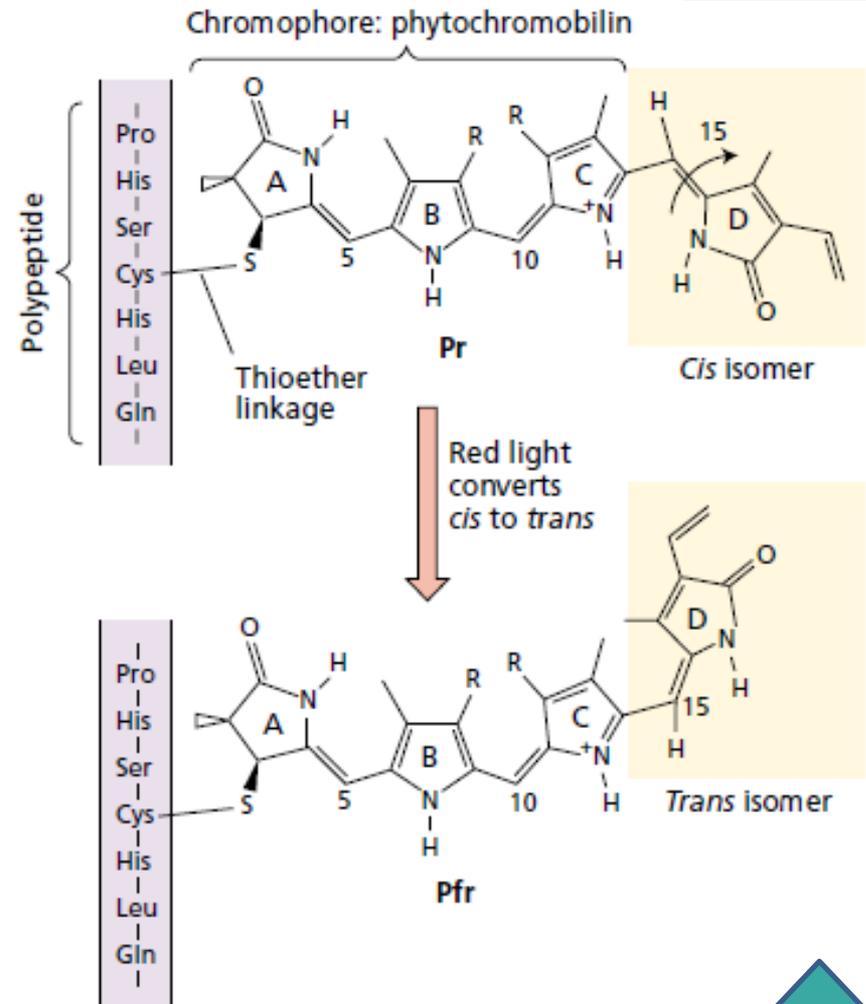
**Diversas funciones en
la fotomorfogénesis**

P_r

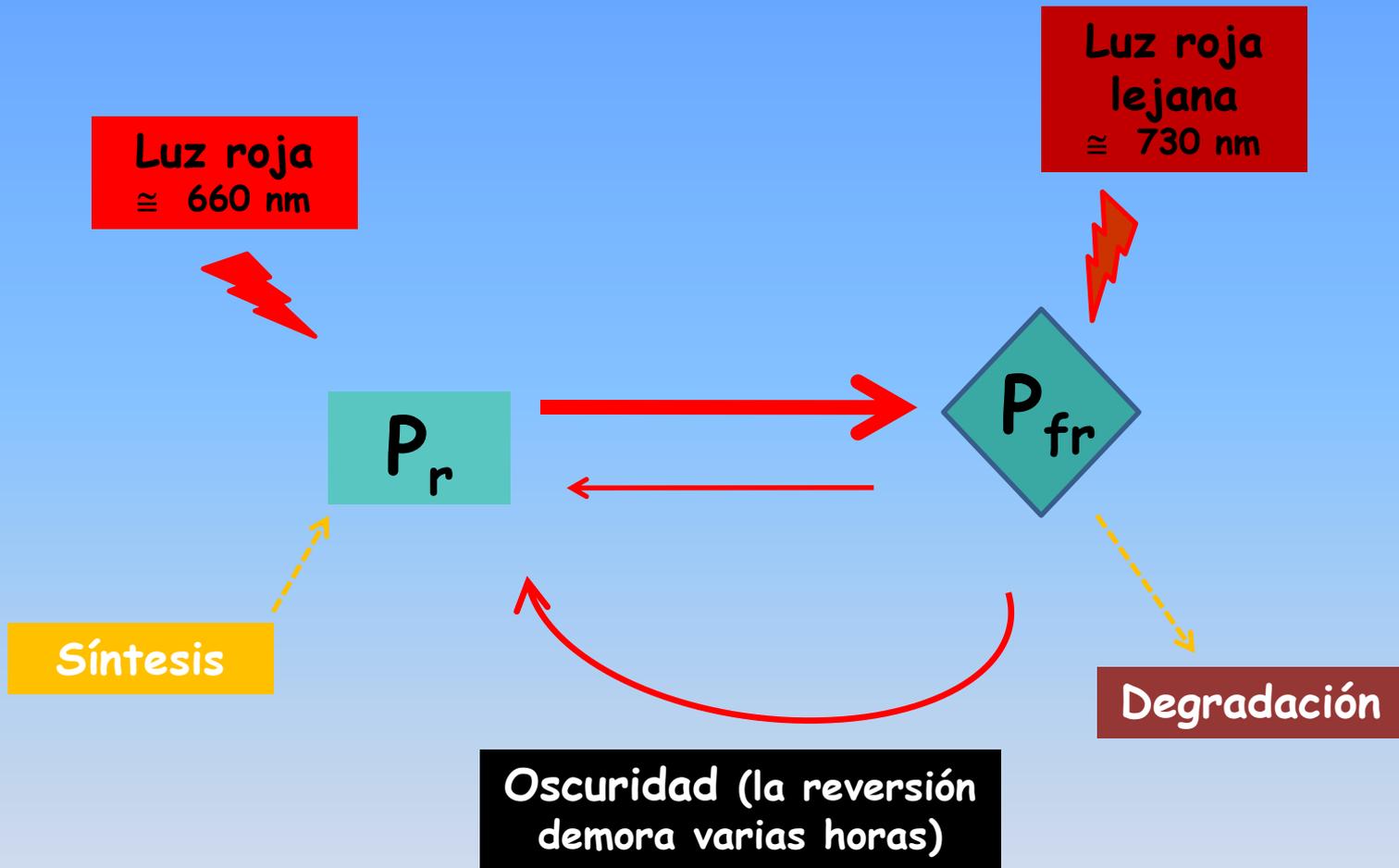
Los Fitocromos

Cromóforo (bilina) y una apoproteína

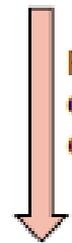
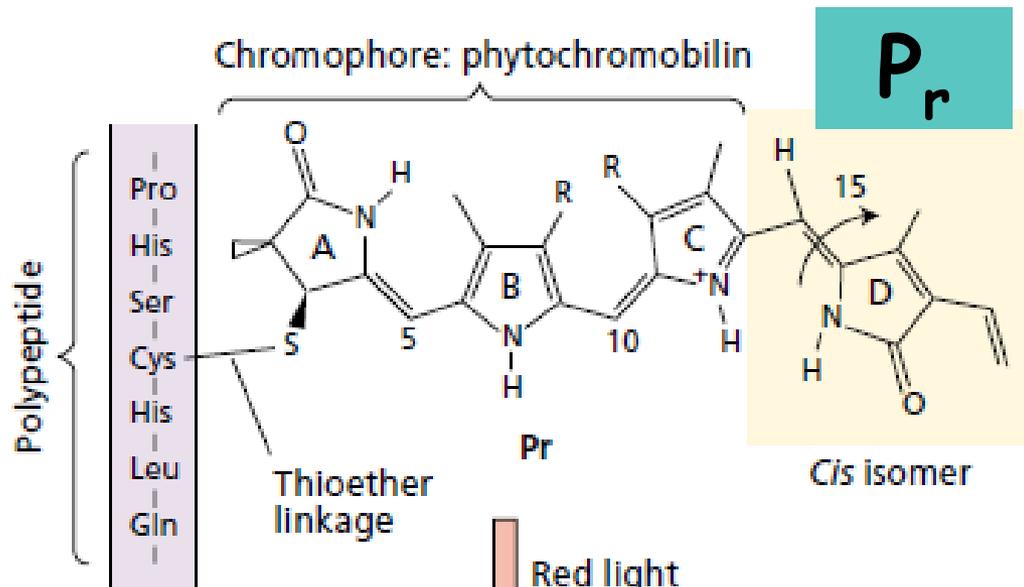
- Dos formas fotoconvertibles



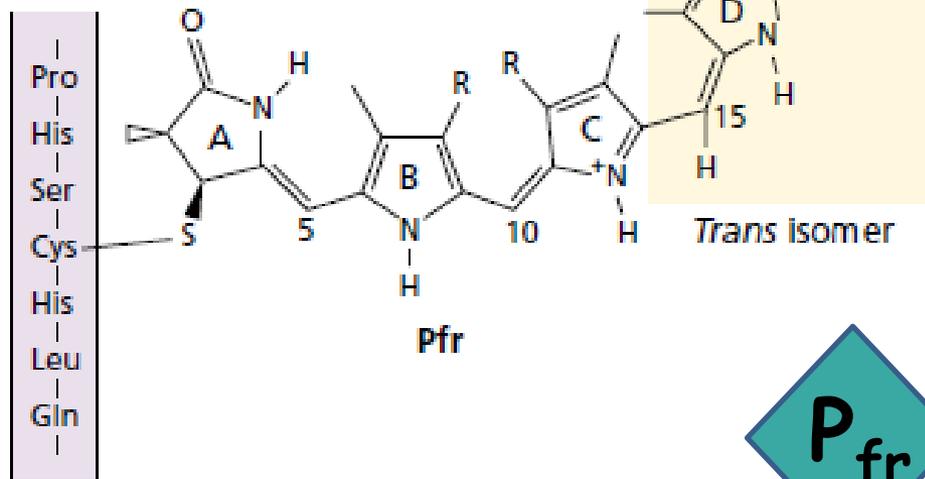
P_{fr}



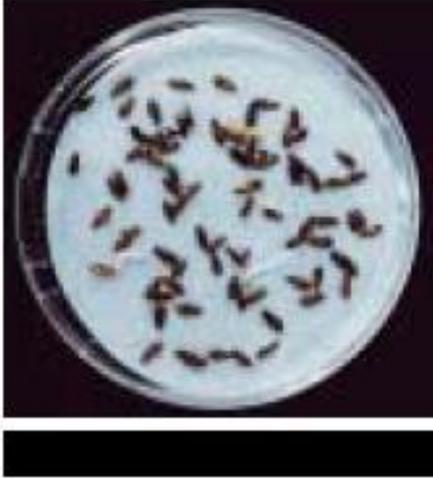
Forma biológicamente activa = P_{fr}



Red light
converts
cis to *trans*



Recordando el descubrimiento del fitocromo: Fotoblastismo en semillas



Dark



Red



Red Far-red



Red Far-red Red

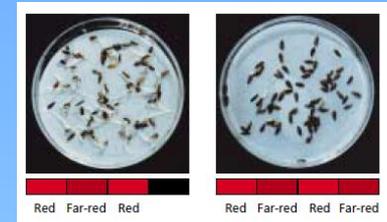
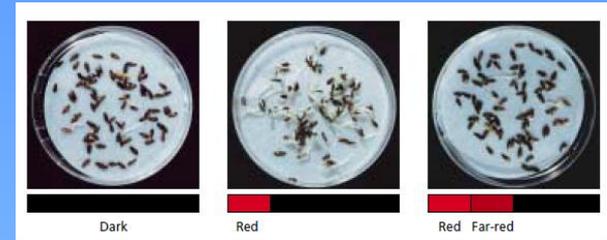


Red Far-red Red Far-red

El % de germinación depende del último pulso de luz (rojo o rojo lejano...)

Este fenómeno se conoce como 'Fotorreversibilidad'

'Tiempo de escape' : tiempo umbral a partir del cual la inducción de la respuesta se hace irreversible (y por ende un pulso luz RL no es efectivo para inhibir la germinación...)



O sea, la fotorreversibilidad no ocurrirá si superamos ese umbral o tiempo de escape de la respuesta

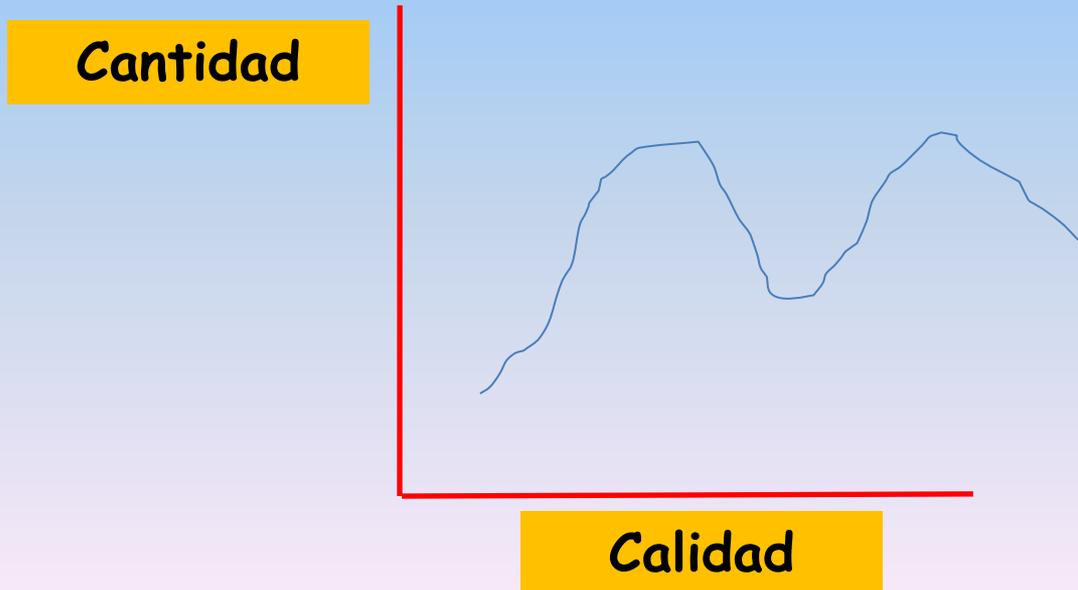
Antes de continuar, vamos a introducir dos conceptos muy importantes en fotomorfogénesis:

Espectro de absorción y espectro de acción

¿Cómo relacionar un proceso (= respuesta) con un fotorreceptor ?

Dos 'herramientas' metodológicas y conceptuales importantes en fotomorfogénesis son los espectros 'de absorción' y 'de acción'

¿Qué es un 'espectro'?

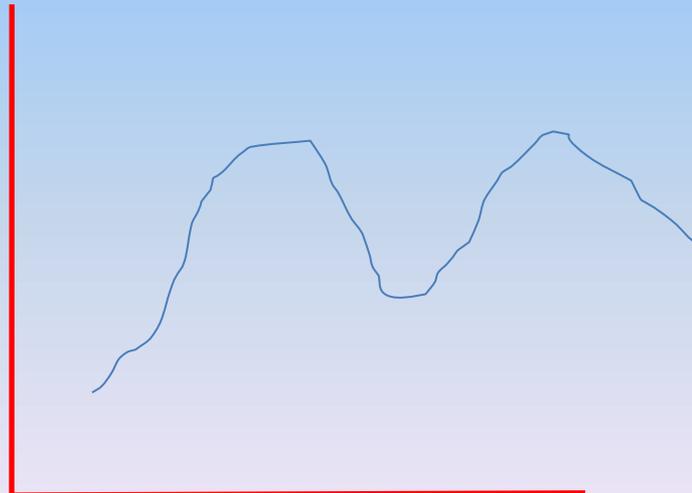


Espectro 'de absorción' (propio de cada pigmento)

Caracteriza la absorción de un pigmento a las diferentes longitudes de onda

Los espectros de absorción de los pigmentos se obtienen con un espectrofotómetro (pigmento en solución)

Absorbancia



Longitud de onda (nm)

Espectro 'de acción' (de procesos o respuestas)

Caracteriza la intensidad de un proceso como respuesta a las diferentes longitudes de onda

Los espectros de acción se obtienen analizando la intensidad de un proceso a diferentes longitudes de onda

Intensidad de respuesta



Longitud de onda (nm)

¿Cómo relacionar un proceso (= respuesta) con un fotorreceptor ?

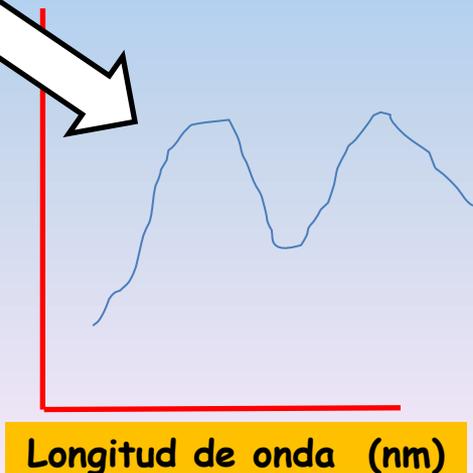
Espectro de absorción del fotorreceptor 'x'

Absorbancia



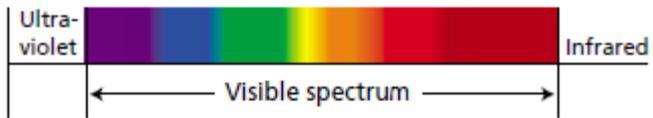
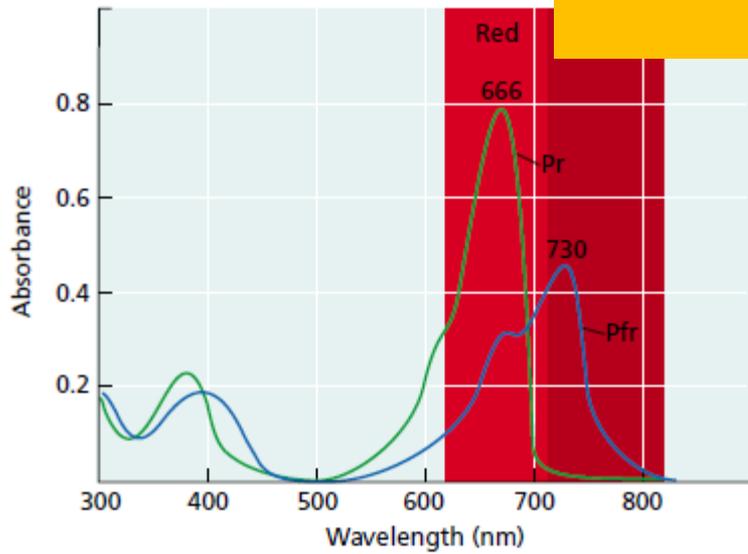
Espectro de acción del proceso 'y'

Intensidad de respuesta

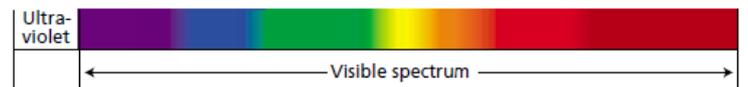
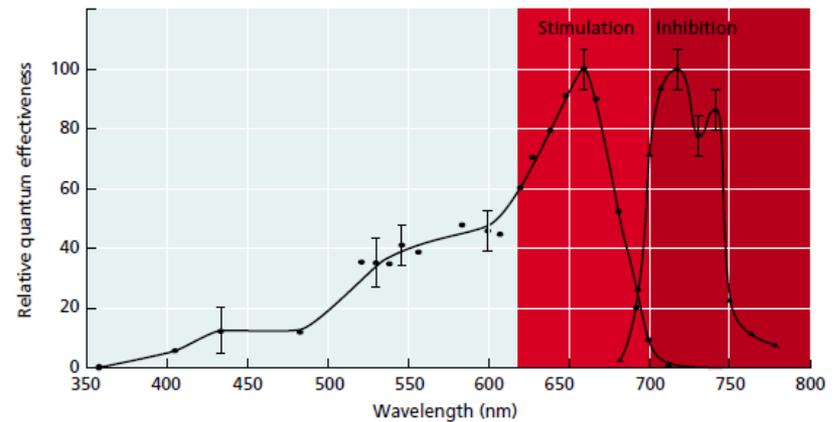


Si el espectro de acción de un proceso tiene una forma similar al espectro de absorción de un pigmento (postulado como fotorreceptor) esto sugiere que éste podría ser el responsable de esa respuesta que se está estudiando

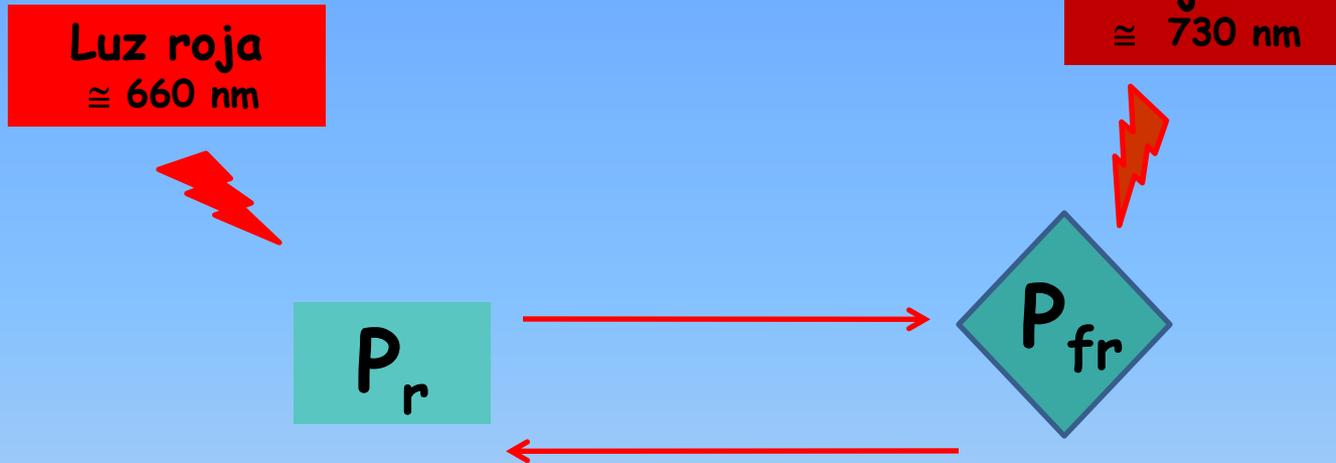
Espectros de absorción de Pr y Pfr



Espectro de acción (germinación)



¿De qué depende el nivel de Pfr ...?
Para analizar esto es útil definir el concepto de 'fotoequilibrio'



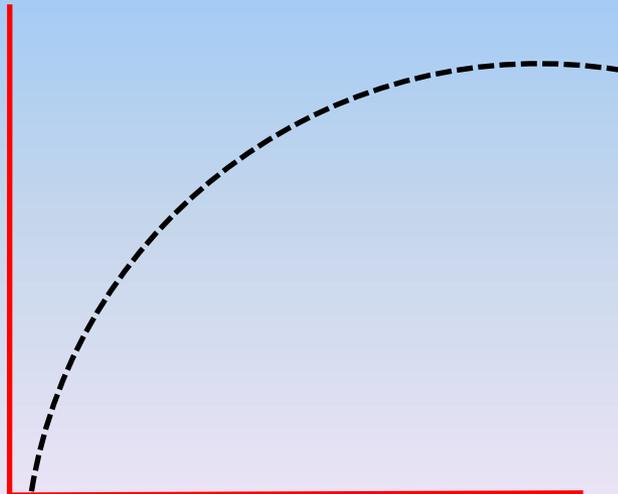
Fotoequilibrio del fitocromo (ϕ) = P_{fr} / P_{total}

$$\phi = P_{fr} / (P_r + P_{fr})$$

¿De qué variable depende el valor que tendrá el
Fototequilibrio ? = relación R: RL
(antiguamente conocida como ζ 'zeta')

R: RL = cantidad de fotones de 660 nm / cantidad de fotones 730 nm

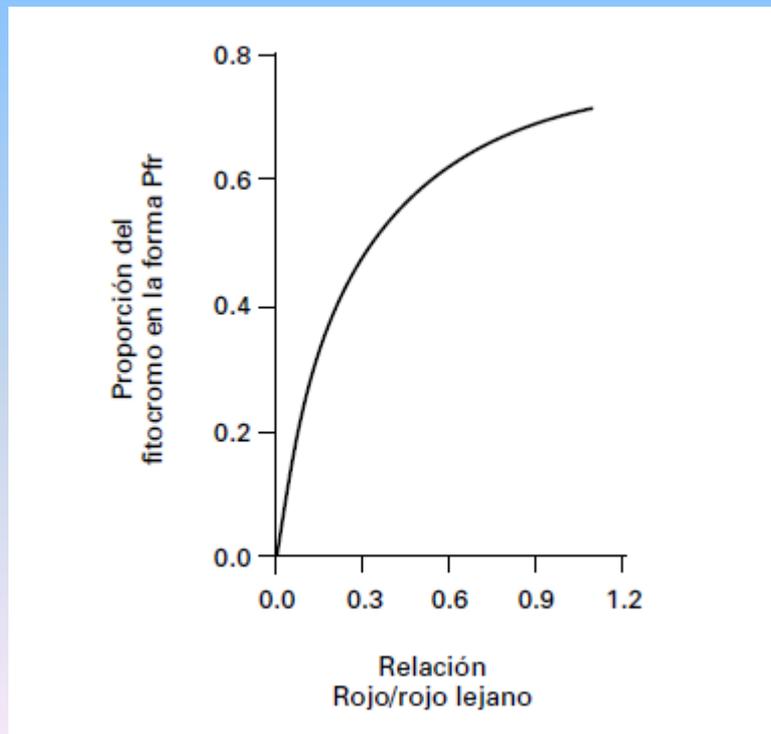
Fototequilibrio



Relación R : RL

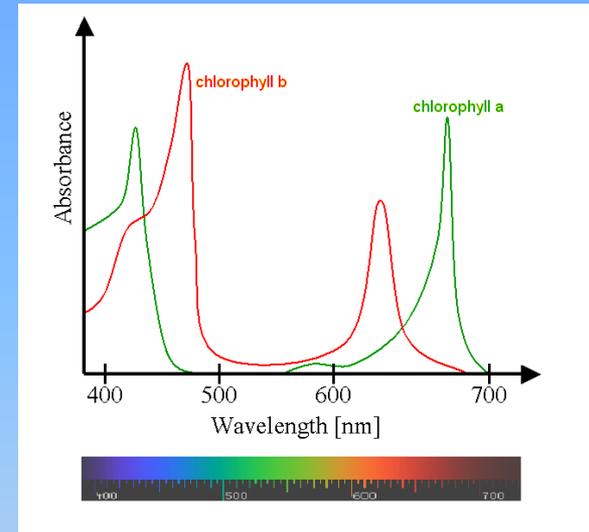
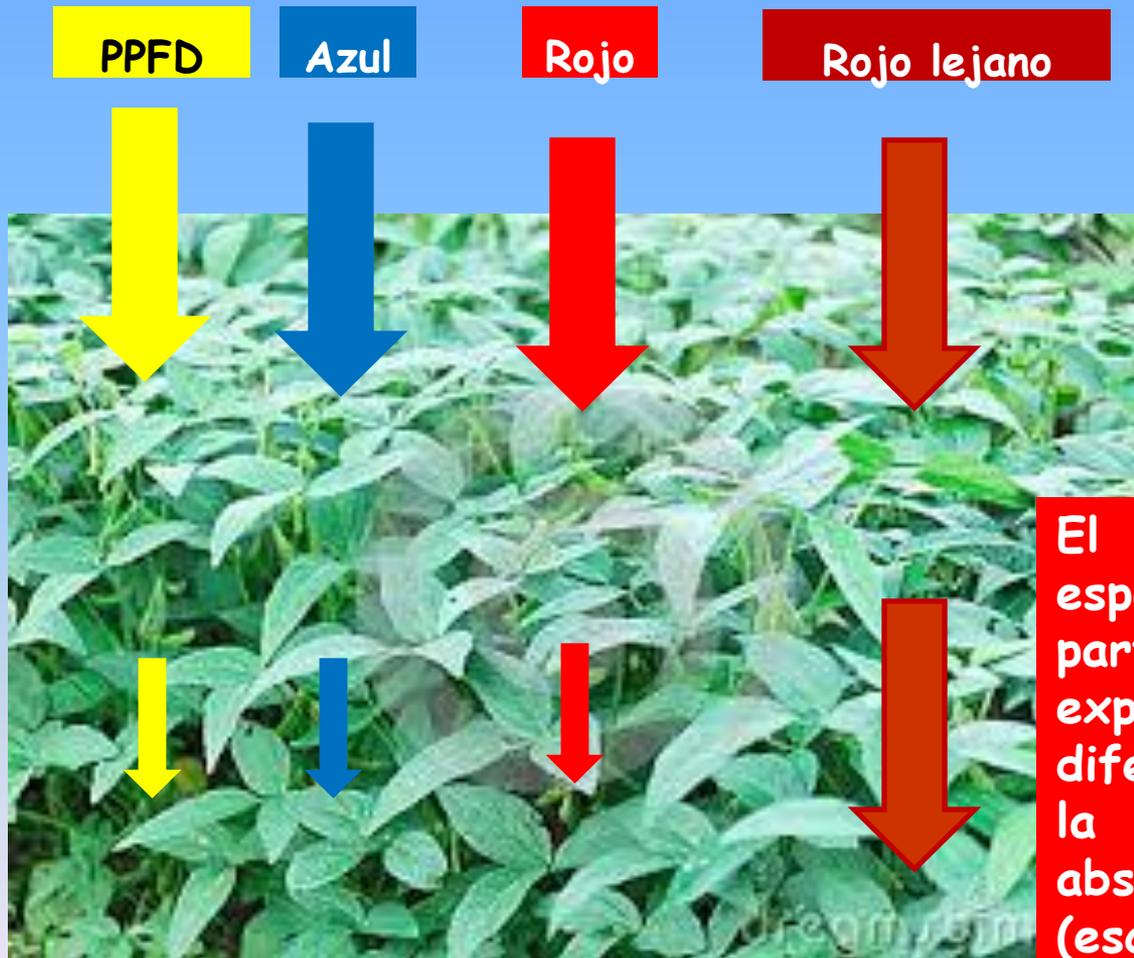
¿De qué variable depende el valor que tendrá el Fotoequilibrio ? = relación R: RL
(antiguamente conocida como ζ 'zeta')

R: RL = cantidad de fotones de 660 nm / cantidad de fotones 730 nm



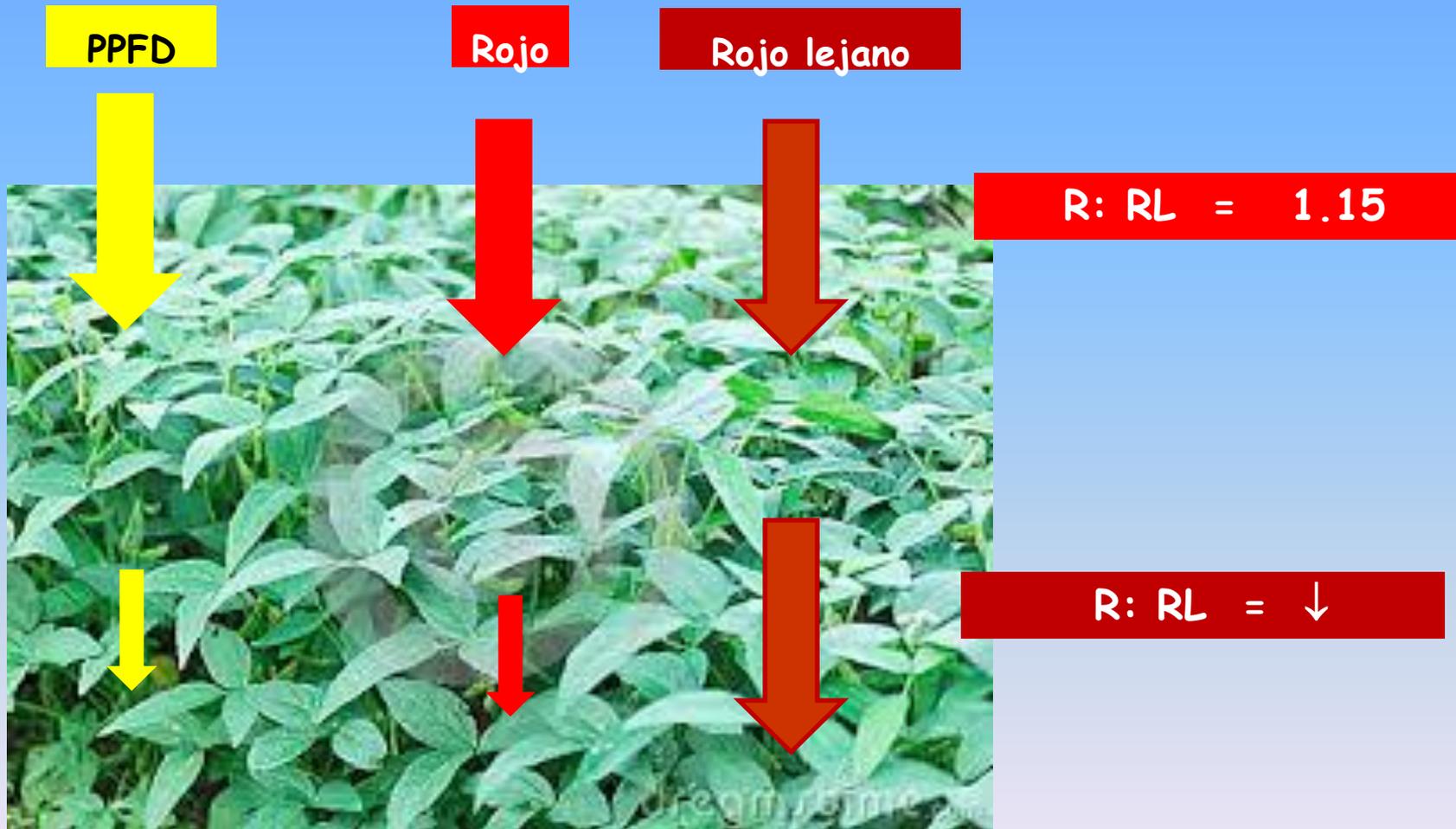
Este gráfico nos muestra que la relación entre el fotoequilibrio (o sea, la proporción de Pfr) depende en forma curvilínea de la relación R:RL. Aún con luz monocromático roja, no tendríamos todo el fitocromo como Pfr ¿Porqué ocurre esto?

¿Qué modifica la relación R:RL en la naturaleza y los cultivos?: la luz transmitida o reflejada por canopeos se empobrece en rojo (además de azul) y se enriquece en RL

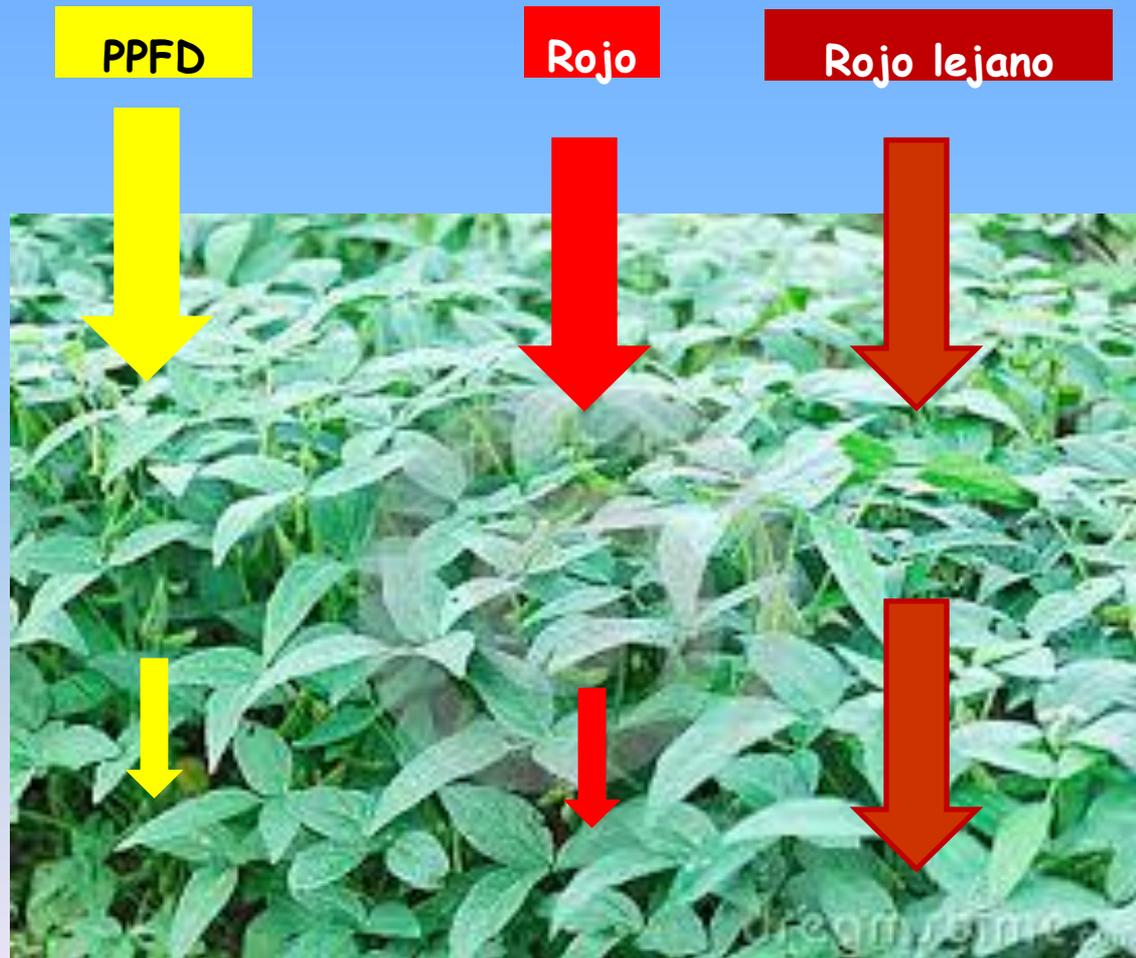


El cambio en la composición espectral de la luz (y en particular la relación R:RL) se explica por la absorción diferencial de la clorofila de la hojas en el rojo (alta absorción) *versus* el RL (escasa absorción)

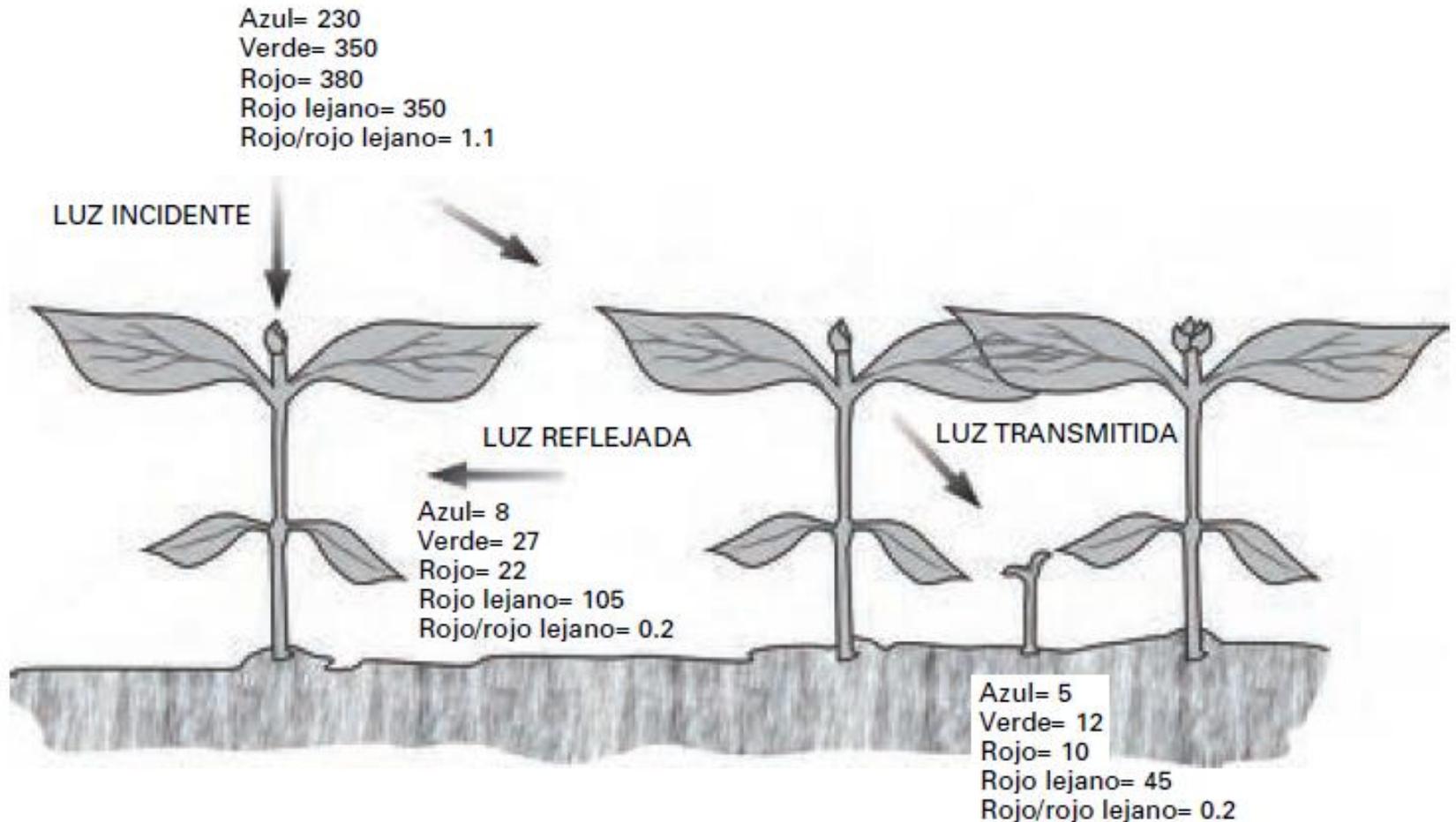
¿Por qué los cambios en la relación R : RL pueden ser 'informativos'?



¿Por qué los cambios en la relación $R : RL$ pueden ser 'informativos'?



¿Por qué los cambios en la relación $R : RL$ pueden ser 'informativos'?



Ejemplos de procesos controlados por el sistema del fitocromo

_ Fotoblastismo en semillas

- Elongación de entrenudos y pecíolos (escape al sombreado...)
- Floración
- Des - etiolación de plántulas (sint. de clorofila etc etc)
- Macollaje en cereales
- Senescencia de hojas

Ejemplos de procesos controlados por el sistema del fitocromo

_ Fotoblastismo en semillas

- Elongación de entrenudos y pecíolos (escape al sombreado...)

- Floración

- Des - etiolación de plántulas (sint. de clorofila etc etc)

- Macollaje en cereales

- Senescencia de hojas

TP Control de la elongación de tallo y pecíolos por la relación rojo-rojo lejano

Objetivo: analizar el efecto de cambios en la relación rojo-rojo lejano (en interacción con la irradiancia) de la luz incidente sobre la elongación de tallos y pecíolos en una especie que posee 'síndrome de escape al sombreado' (*Phaseolus vulgaris*)

Fundamento: se manipulará la relación R:RL (filtros líquidos) y la irradiancia (malla espectralmente neutra).

Se testearán dos relaciones R:RL (1,2 vs. 0,4) combinadas con dos irradiancias (100 vs. 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Por ende, son 4 tratamientos en total.

Materiales

16 Plantas de *Phaseolus vulgaris*
con las las dos hojas
unifolioladas expandidas



Estructura de hierro para
filtros (con 'peceras' de vidrio)

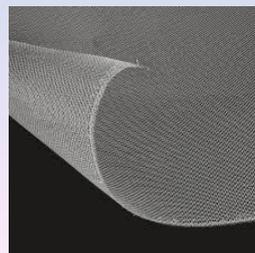
4 Lámparas de 'quarzo' de 500 W



Sulfato de cobre y tinta de
dibujo verde (modificación de la
R:RL)



Malla mosquitera (modificación
de la irradiancia)



Materiales

Sensor de 'PAR' (medición de la irradiancia o DFFF)



Espectrorradiómetro (medición de la relación R:RL)



Temporizador para regular el fotoperíodo (12 hs)



Materiales varios (regla, rotuladores, cinta de papel ,etc.)

¿Cómo obtendremos esas relaciones R:RL con los filtros líquidos?

Filtrando la luz de las lámparas con sulfato de cobre, elevaremos la relación R:RL hasta un valor ca. 1,2 (las lámparas usadas tienen una R:RL menor a la de la luz solar)



El CuSO_4 absorbe preferencialmente a la luz roja lejana, y muy poco a la luz roja

Por ende, ajustando la concentración de CuSO_4 podemos elevar la relación R:RL de la luz al valor deseado (1,2)

¿Cómo obtendremos esas relaciones R:RL con los filtros líquidos?

Filtrando la luz de las lámparas con una suspensión de tinta de dibujo verde, reduciremos la relación R:RL hasta un valor ca. 0,4 ('sombreo simulado')

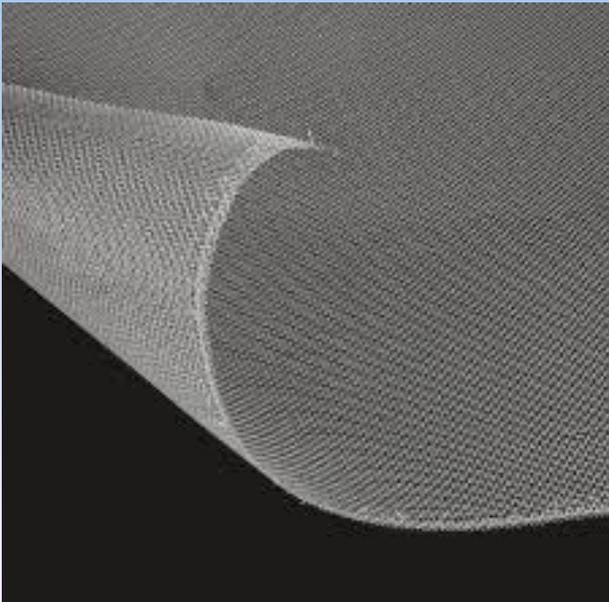


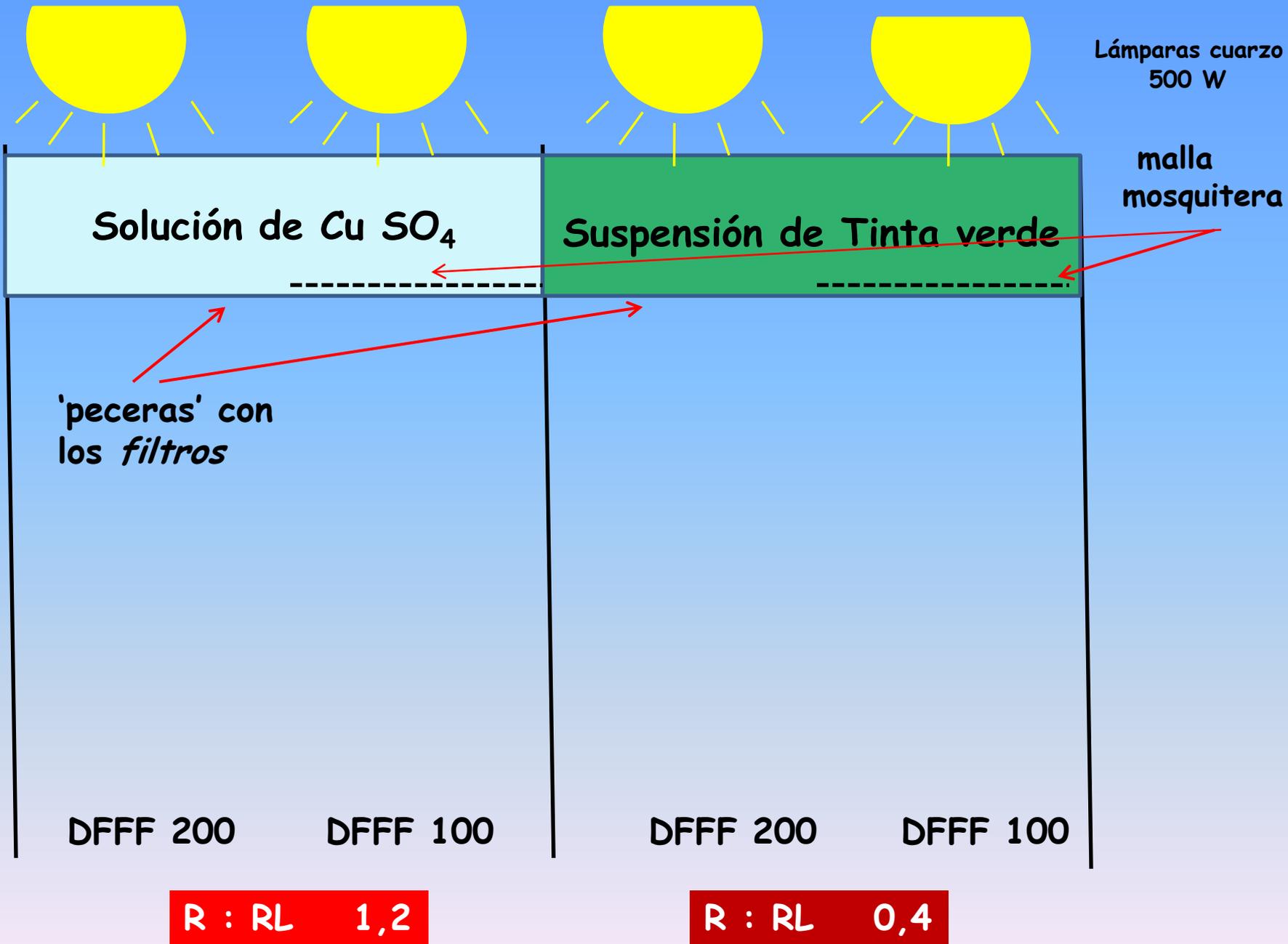
La tinta verde absorbe preferencialmente a la luz roja, y muy poco a la luz roja lejana

Por ende, ajustando la concentración de tinta podemos reducir la relación R:RL de la luz al valor deseado (0,4)

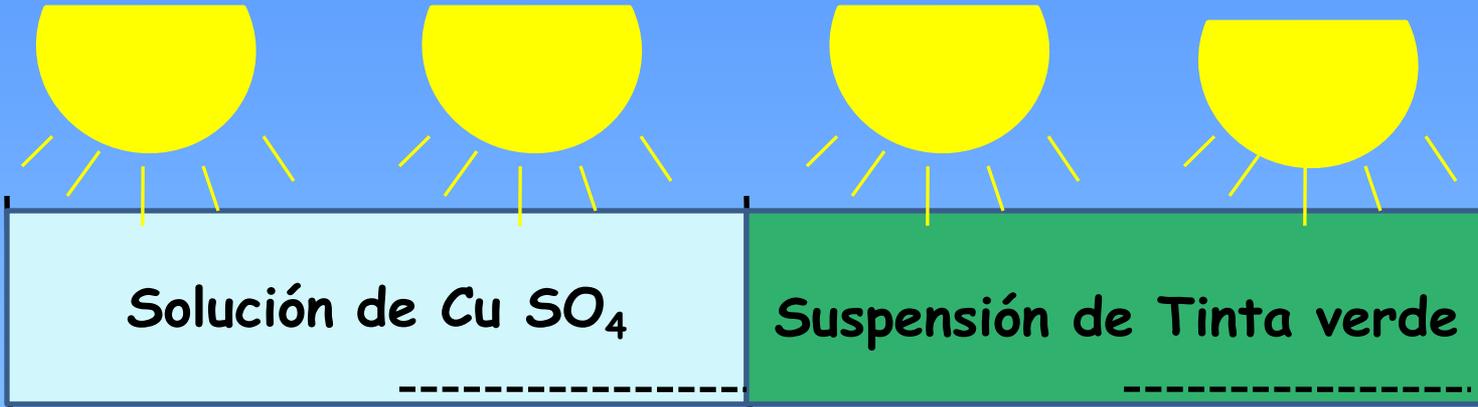
¿Cómo obtendremos cambios en la irradiancia? (= DFFF)

Filtrando la luz de las lámparas con una malla espectralmente neutra (i.e. que no posee absorción diferencial de las diferentes longitudes de onda), podemos reducir la irradiancia (la cual también puede manipularse modificando la distancia entre lámparas y plantas)





Lámparas cuarzo
500 W



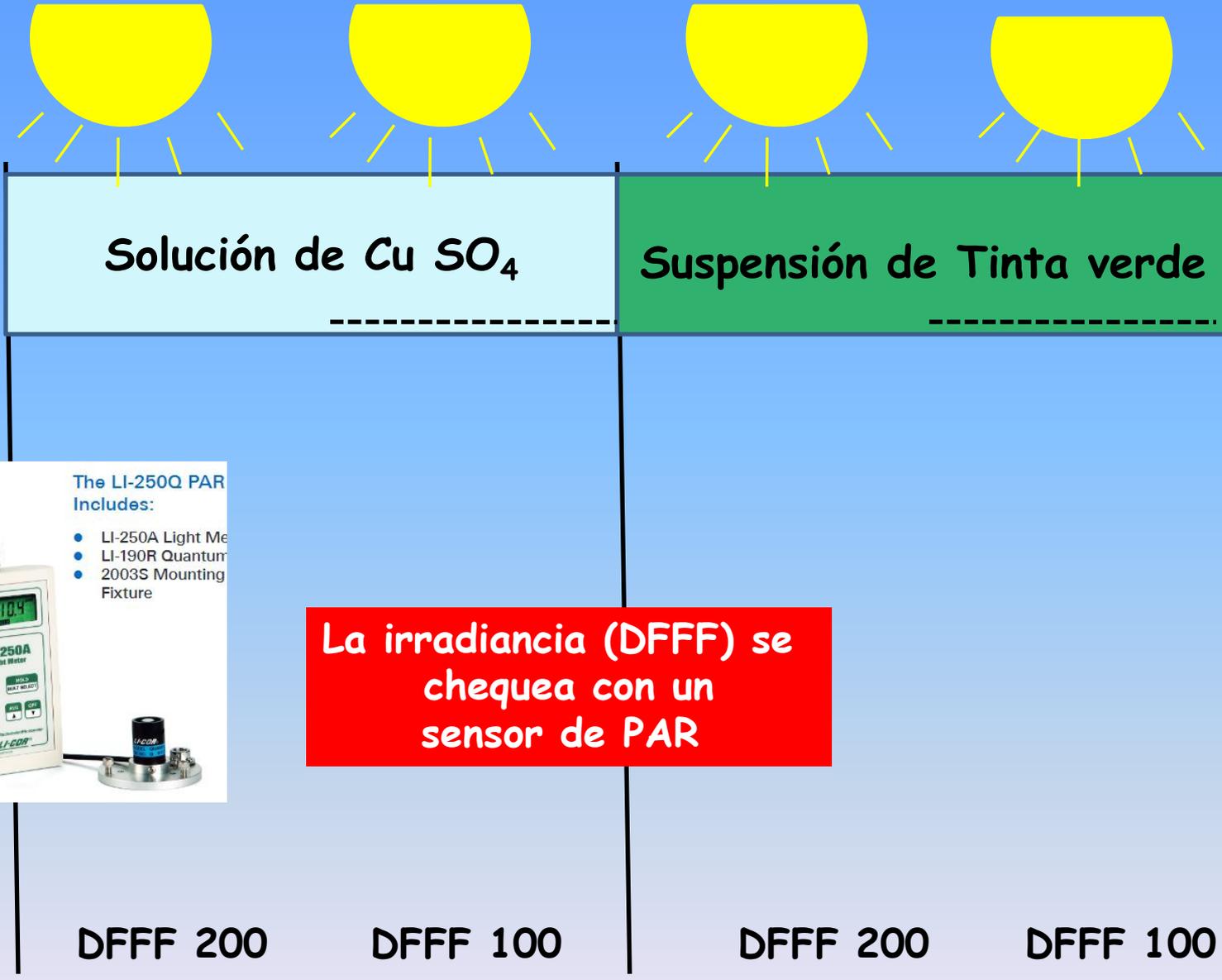
La relación $R : RL$ se mide con el espectrorradiómetro



$R : RL$ 1,2

$R : RL$ 0,4

Lámparas cuarzo
500 W



Solución de Cu SO₄

Suspensión de Tinta verde

The LI-250Q PAR
Includes:

- LI-250A Light Me
- LI-190R Quantum
- 2003S Mounting
Fixture

La irradiancia (DFFF) se
chequea con un
sensor de PAR

DFFF 200

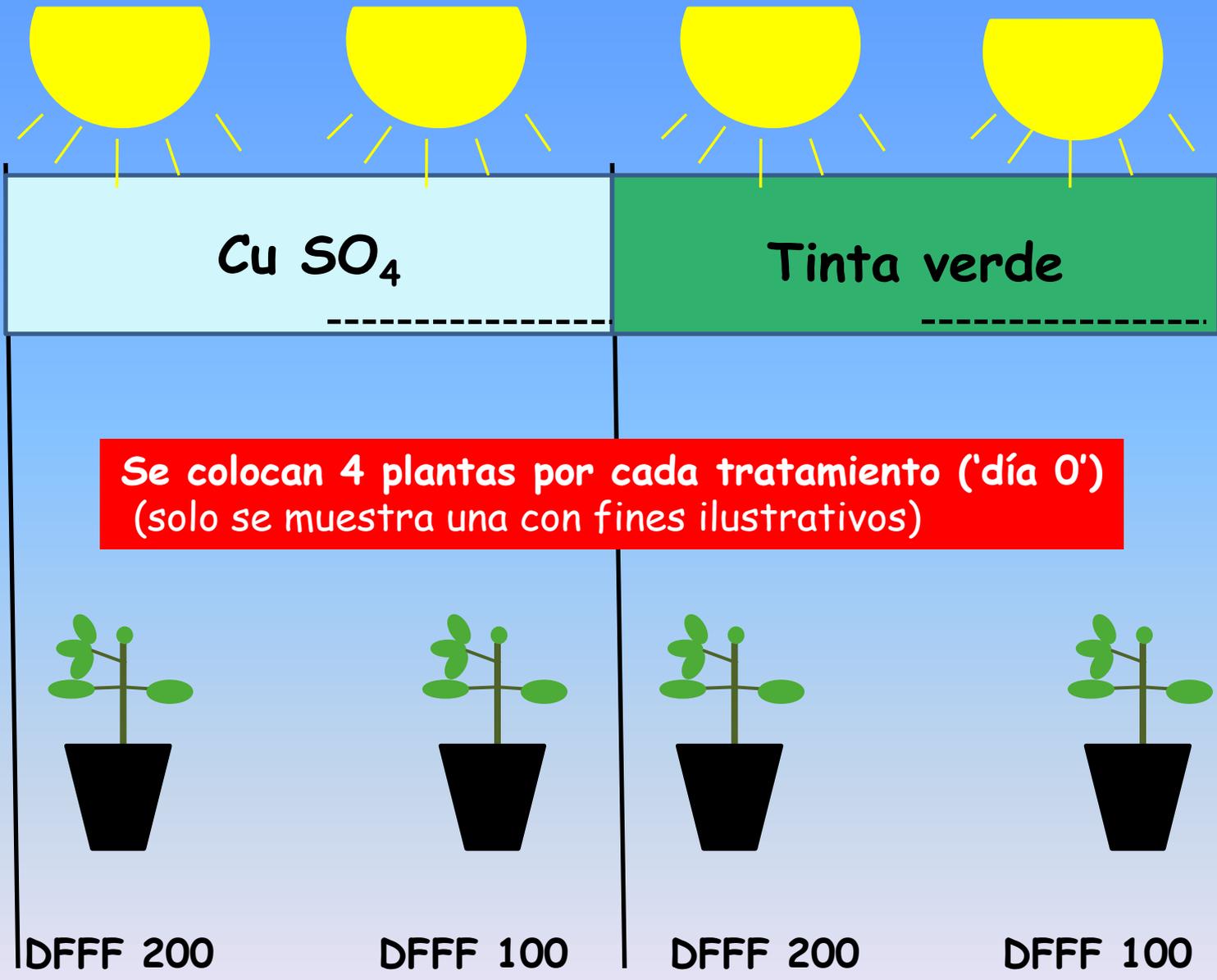
DFFF 100

DFFF 200

DFFF 100

R : RL 1,2

R : RL 0,4



R:RL 1,2

R:RL 0,4

Filtro de Cu SO_4

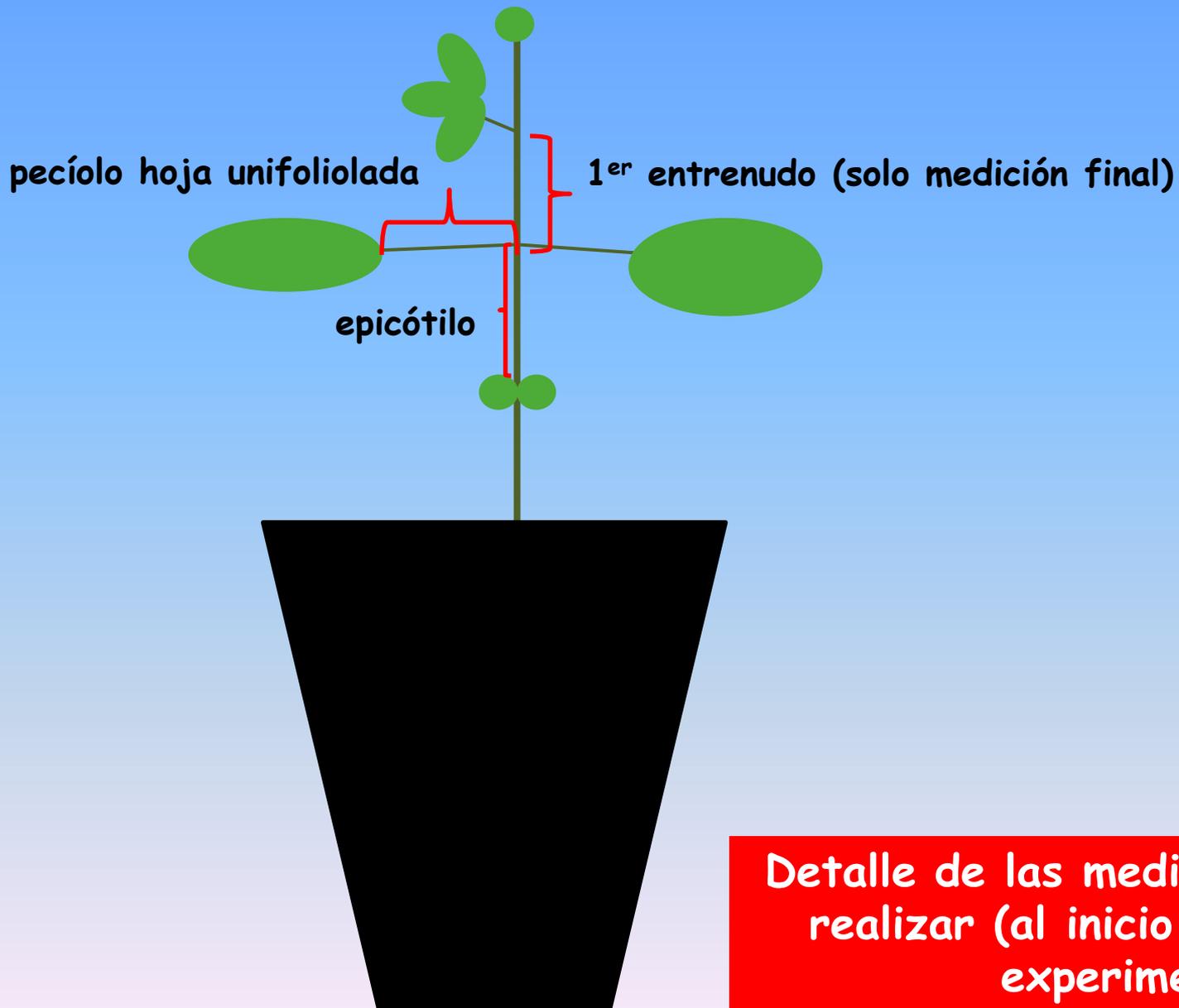


Filtro de tinta verde



malla
mosquitera

Vista del experimento (día 0)



Detalle de las medidas (longitud) a realizar (al inicio y al final del experimento)



Vista general del experimento (día 0)



Detalle del experimento (día 0, tratamientos R:RL 1,2)



Detalle del experimento (día 0, tratamientos R:RL 0,4)

RESULTADOS

Longitud de epicótilo (cm)

Tratamiento	día 0	día 7	% cambio
DFFF 200 - R:RL 1,2	3,6	4,9	
DFFF 100 - R:RL 1,2	4,2	5,5	
DFFF 200 - R:RL 0,4	3,9	8,1	
DFFF 100 - R:RL 0,4	3,5	7,2	

Los valores mostrados corresponden al promedio de $n = 4$ (obsérvese que las diferencias entre tratamientos en el día inicial ('día 0') se deben a cuestiones aleatorias, de variabilidad entre plantas y posible sesgo)

El porcentaje de cambio calcularlo en forma similar a lo realizado en anteriores TPs para otras variables

RESULTADOS

Longitud de pecíolo (cm)

Tratamiento	día 0	día 7	% cambio
DFFF 200 - R:RL 1,2	2,9	4,6	
DFFF 100 - R:RL 1,2	3,0	4,5	
DFFF 200 - R:RL 0,4	2,9	6,7	
DFFF 100 - R:RL 0,4	2,5	6,7	

Longitud del pecíolo de una de las hojas unifolioladas

Los valores mostrados corresponden al promedio de $n = 4$

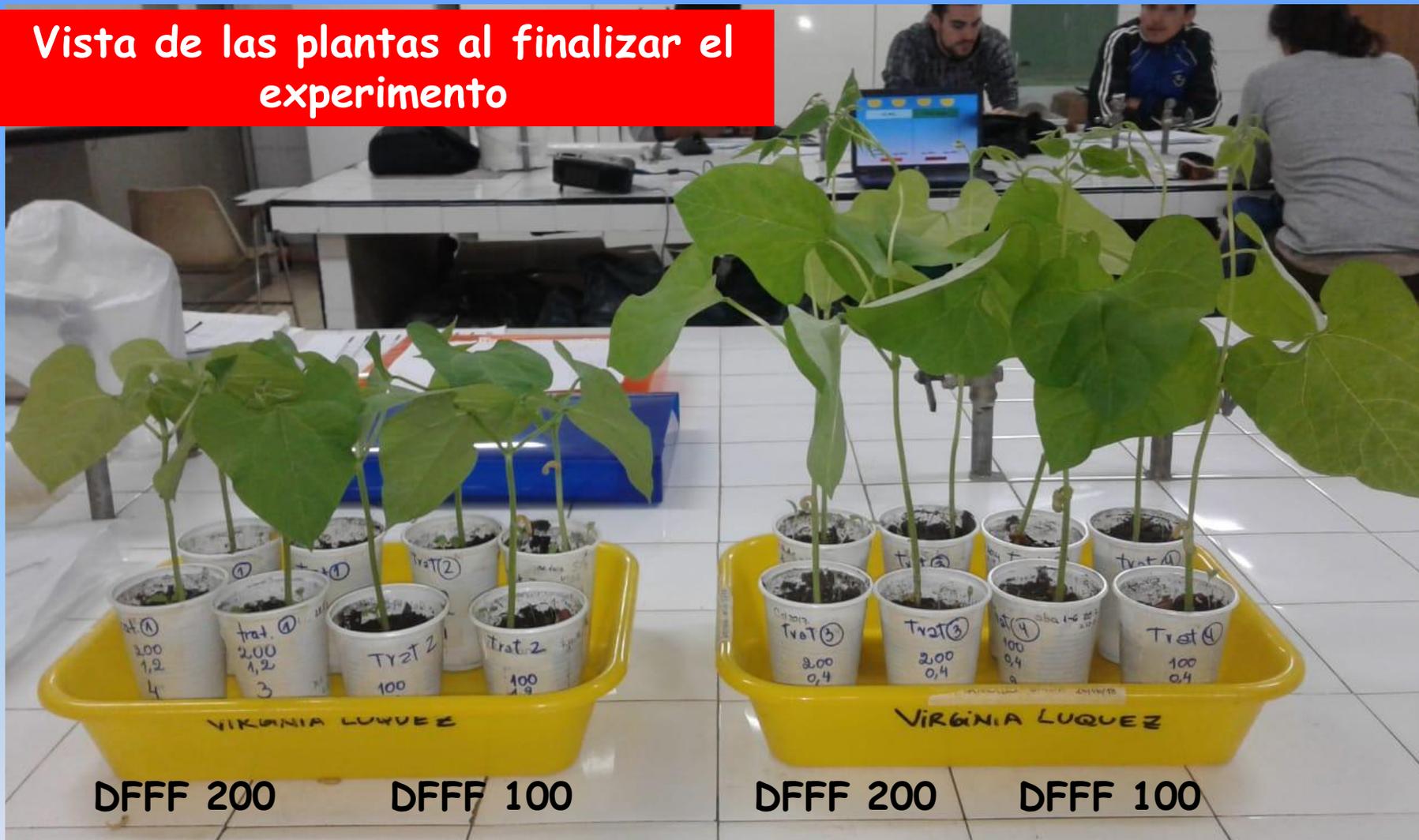
Longitud del 1er entrenudo (cm)

Tratamiento	día 0	día 7
DFFF 200 - R:RL 1,2	----	1,9
DFFF 100 - R:RL 1,2	----	2,3
DFFF 200 - R:RL 0,4	----	8,7
DFFF 100 - R:RL 0,4	----	11,2

En el día 0 (inicio del experimento) no se midió la longitud del 1er entrenudo

Los valores mostrados corresponden al promedio de $n = 4$

Vista de las plantas al finalizar el experimento



DFFF 200

DFFF 100

DFFF 200

DFFF 100

R:RL 1,2

R:RL 0,4

Algunas preguntas para analizar los resultados y otros aspectos

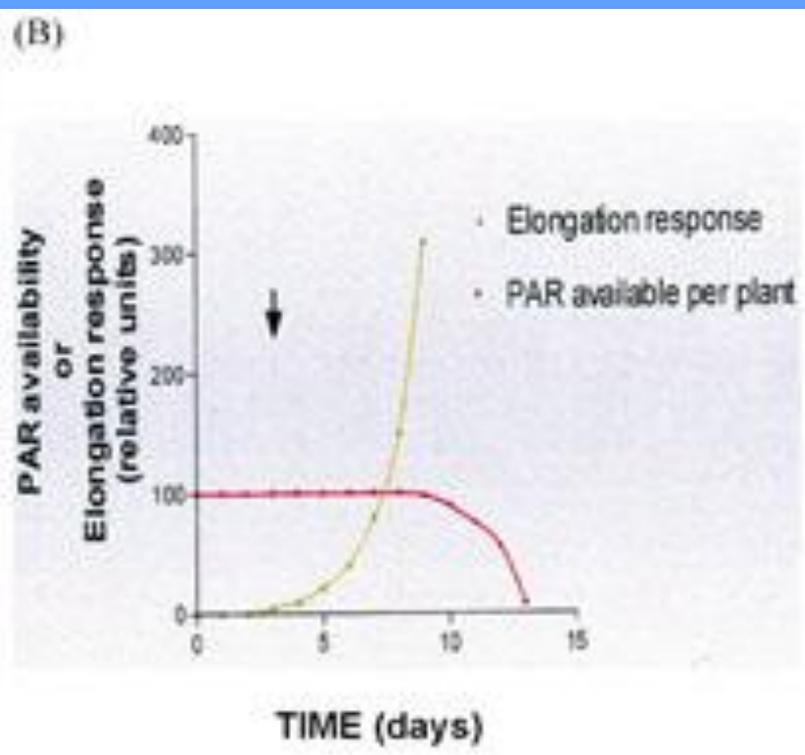
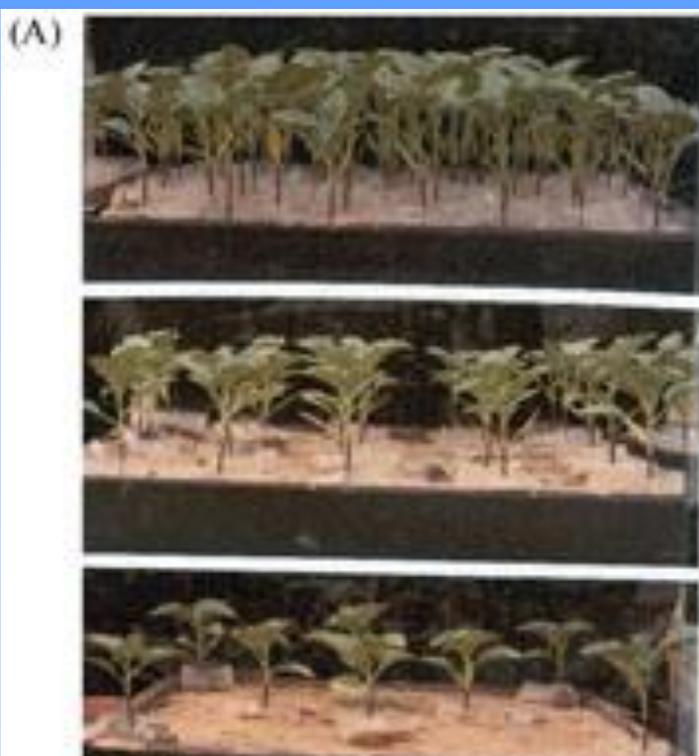
1. ¿Qué variable (R:RL o DFFF) impactó en mayor medida en la elongación de los órganos analizados?
2. ¿Cómo contextualizaría los resultados del presente experimento en términos ecológicos en la respuesta a 'plantas vecinas'?
3. En base a sus conocimientos del tema: ¿qué forma del fitocromo (Pr *versus* Pfr) predominará en cada una de las dos R:RL ensayadas? ¿Qué efecto tiene Pfr sobre la elongación de tallos y pecíolos según nuestros resultados?
4. Suponga que en lugar de utilizar poroto en este experimento, hubiera estudiado la respuesta de elongación de una planta que habita en sotobosques: ¿qué resultados cree que encontraría?
5. Está bien establecido que la forma fisiológicamente activa del fitocromo es Pfr. ¿Cómo compatibiliza esto, con lo observado en el experimento del TP?
6. Dibuje el espectro de acción de la elongación del tallo en una especie que presenta 'síndrome de escape al sombreado'.

Otra aproximación experimental para modificar la 'calidad' de luz :
estudios en 'chamico' *Datura ferox*



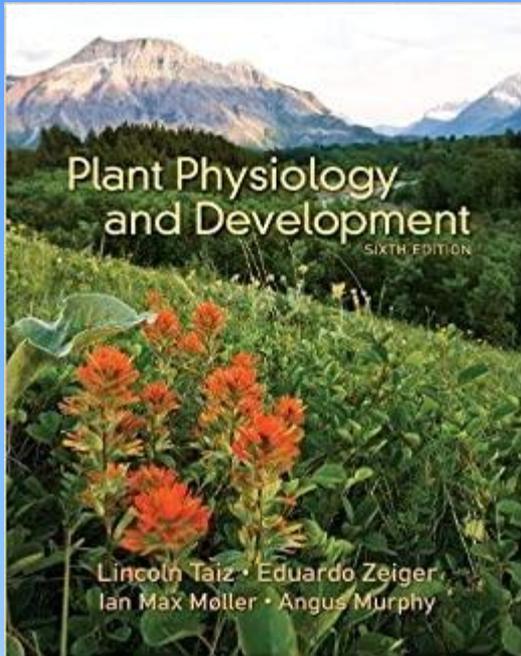
Plantas de *Datura ferox* tratadas con celofanes que reflejan luz roja (izquierda) o roja lejana (derecha)

Extraído de 'Neighbor through Phytochrome'
Ballaré, Scopel, Casal and Sánchez Plant Physiology Taiz-Zeiger

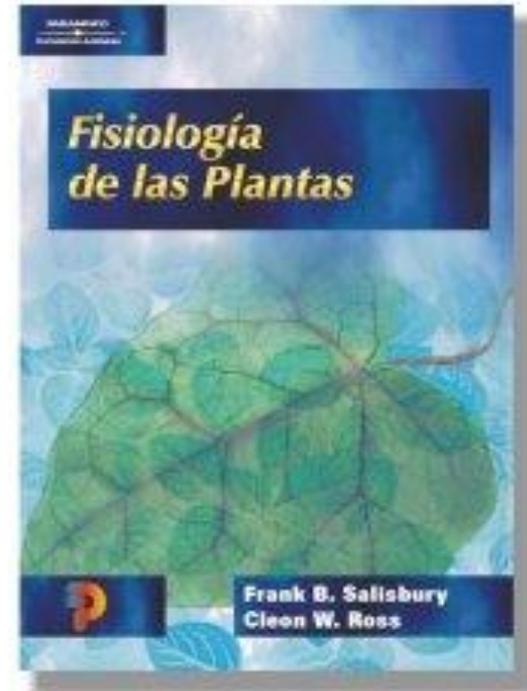


En las fotografías se muestran plantas de *Datura ferox* a 3 densidades (32, 100 y 240 plantas m^{-2} , de abajo hacia arriba en la fotografía respectivamente). Observar las diferencias en altura.

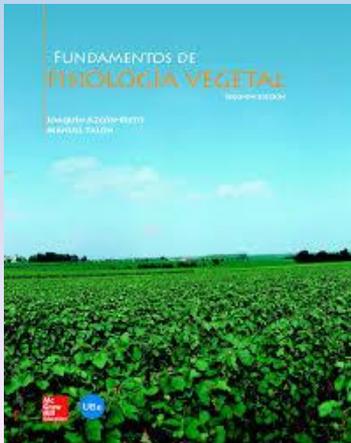
En el gráfico se muestra la variación de PAR disponible por planta a lo largo del tiempo de crecimiento (curva roja) y la tasa de elongación de las plantas (curva amarilla) La flecha señala el momento en que empieza a aumentar la tasa de elongación, y claramente se observa que ésta es independiente del PAR ('anticipación al sombreado')



El texto más actualizado de Fisiología Vegetal (existe versión en portugués) 6ta edición 2015



Para temas generales de la fotomorfogénesis (desactualizado en aspectos de vías de señalización, moleculares)



Texto en castellano, actualizado 2da edición 2013. El capítulo de fotomorfogénesis lo escribió Jorge Casal (investigador argentino, referencia en el tema a nivel internacional)

Confeccionen el informe del TP en base a la explicación descripta en esta presentación y a las clases en la plataforma virtual (incluir Objetivos, Fundamentos, Materiales y Métodos, los Resultados mostrados, y la interpretación de los mismos (incluyendo las respuestas a la preguntas formuladas en la diapo 49)

Enviar documento Word por e-mail al docente de la comisión correspondiente