Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Beneficio mutuo entre plantas emparentadas

Crepy, María Andrea

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Crepy, María Andrea. (2011). Beneficio mutuo entre plantas emparentadas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Crepy, María Andrea. "Beneficio mutuo entre plantas emparentadas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

BENEFICIO MUTUO ENTRE PLANTAS EMPARENTADAS.

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

Lic. María Andrea Crepy

Director de tesis: Dr. Jorge J. Casal

Consejero de estudios: Dr. Jorge Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura. FAUBA-CONICET

Buenos Aires, 2011

RESUMEN **1**

ABSTRACT **2**

AGRADECIMIENTOS **3**

1 INTRODUCCIÓN **7**

1.1 LAS PLANTAS Y EL AMBIENTE LUMÍNICO. **7**

1.1.1 Las señales lumínicas. 7

1.1.2 Respuestas de las plantas a las señales lumícas típicas de cultivos densos. 10

1.1.3 El rol de los fotorreceptores. 12

1.2 RESPUESTAS DEL SÍNDROME DE ESCAPE AL SOMBREADO (SES) Y SU PLASTICIDAD ADAPTATIVA **15**

1.2.1 Los costos de las respuestas de SES. 18

1.3 EL COMPORTAMIENTO DE LAS PLANTAS EN SITUACIONES DE COMPETENCIA. **18**

1.3.1 Competencia entre individuos emparentados y la evolución de la cooperación... 20

1.3.2 Mecanismos comportamentales que explican la evolución de un carácter cooperativo. 21

1.4 LAS BASES DEL RECONOCIMIENTO ENTRE PARIENTES **23**

1.4.1 Reconocimiento de parentesco en plantas: 25

1.4.2 Plantas creciendo con "hermanas": ¿cooperan o compiten? 26

2 HIPÓTESIS, ESTRATEGIA Y OBJETIVOS DE TRABAJO. **29**

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO. **29**

2.2 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. **29**

2.3 OBJETIVOS. **30**

3 MATERIALES Y MÉTODOS 32
3.1 MATERIAL VEGETAL. 32
3.2 CONDICIONES DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS CON FILTROS. 32
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL: 33
3.4 MEDICIONES DE LAS SEÑALES LUMÍNICAS. 34
3.5 MEDICIÓN DEL PATRÓN DE ORDENAMIENTO ESPACIAL DE LAS HOJAS EN EL TIEMPO. ... 36
3.6 MEDICIÓN DEL AUTO-SOMBREADO Y SOMBREADO MUTUO DE LAS PLANTAS EN LA HILERA 38
3.7 MEDICIÓN DEL PESO DE SEMILLAS EN PLANTAS ADULTAS. 39
3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE LA LUZ AZUL EN LA ORIENTACIÓN DE LAS HOJAS. 41
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 42

4 RESULTADOS - CAPÍTULO I 43
4.1 ANÁLISIS DEL ORIGEN EVOLUTIVO DE LA RESPUESTA DE DISPOSICIÓN DE LAS HOJAS A LA CALIDAD DE LUZ TÍPICA DE CULTIVOS. 43
4.2 LA CAPACIDAD DE DISPONER LAS HOJAS HACIA EL ENTRESURCO SE OBSERVA AL CULTIVAR PLANTAS DEL MISMO GENOTIPO: 45
4.3 LA CAPACIDAD DE DISPONER LAS HOJAS HACIA EL ENTRESURCO SE OBSERVA AL CULTIVAR PLANTAS DEL MISMO TAMAÑO: 45
4.4 SEÑAL QUE PERMITE EL RECONOCIMIENTO DE INDIVIDUOS DENTRO DE LA HILERA. 47
4.4.1 El rol de los fitocromos en el reconocimiento de parientes. 49
4.5 PATRONES DE CRECIMIENTO Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DE AUXINAS. 52
4.6 ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DEL RECONOCIMIENTO DE PARIENTES. 53

5 RESULTADOS - CAPÍTULO II 60
5.1 EL REORDENAMIENTO DE LAS HOJAS HACIA LOS LATERALES ES UNA RESPUESTA MUY TEMPRANA EN EL DESARROLLO DE UN CANOPEO CON ESTRUCTURA RECTANGULAR. 60

5.1.1 ¿El desarrollo de esta respuesta se debe a un cambio en la filotaxis o en el crecimiento de las hojas?..... 62

5.2 EL AMBIENTE LUMÍNICO DENTRO DE UNA HILERA DE SIEMBRA. 64

5.3 LA RESPUESTA DE REORDENAMIENTO DE LAS HOJAS EN EL PLANO HORIZONTAL ESTÁ REGULADA POR LA PERCEPCIÓN DIFERENCIAL DE LUZ AZUL.....66

5.3.1 El rol de los criptocromos y fototropinas en la orientación horizontal de las hojas de la roseta. 70

5.3.2 El auto-sombreado y su relación con la luz azul. 72

6 DISCUSIÓN. 74

6.1 LA RESPUESTA DE REORDENAMIENTO DE LAS HOJAS EN EL PLANO HORIZONTAL EN RESPUESTA AL AMBIENTE LUMINOSO DE CULTIVOS. 74

6.1.1 Arabidopsis rápidamente acomoda las hojas fuera de la hilera..... 74

6.1.2 El crecimiento del canopeo muy pronto produce un ambiente lumínico heterogéneo. 74

6.1.3 El rol de los fotorreceptores. 75

6.1.4 Comparación con otras respuestas de cambio en la posición de las hojas inducidas por la luz. 77

6.1.5 El rol de las auxinas:..... 79

6.2 CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS Y SIGNIFICADO EVOLUTIVO DE LA REORIENTACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS HOJAS EN EL PLANO HORIZONTAL. 81

6.2.1 Reorientación de hojas en una especie no cultivada. 81

6.2.2 El reordenamiento de las hojas y el ambiente de la planta individual..... 82

6.2.3 El reordenamiento de las hojas en el plano horizontal reduce el sombreado entre plantas dentro del canopeo. 83

6.2.4 El reacomodamiento de las hojas reduce el riesgo de caídas severas en los niveles de *fitness.* 84

6.2.5 El reordenamiento de las hojas en el plano horizontal requiere el reconocimiento de parientes..... 86

6.2.6 Plantas "hermanas" creciendo en hileras presentan beneficio mutuo. 87

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....95

BENEFICIO MUTUO ENTRE PLANTAS EMPARENTADAS.

Resumen

Las respuestas de las plantas al ambiente luminoso, históricamente interpretadas como reacciones de competencia, pueden dar origen a reacciones más cercanas al altruismo cuando existe reconocimiento de parentesco. Al cultivar plantas de *Arabidopsis thaliana* en macetas individuales dispuestas en un diseño rectangular (poca distancia entre plantas dentro de la hilera, mucha distancia entre hileras), hemos observado que las plantas aumentan la proporción de hojas dispuestas perpendicularmente a las hileras. Este patrón no se da si se combinan individuos genéticamente diferentes en la misma hilera o si se combinan individuos genéticamente iguales pero con edades distintas. El ordenamiento se debe a cambios en la dirección de crecimiento de las hojas y es una respuesta mediada por el fitocromo B, criptocromos y fototropinas (principales receptores de las señales lumínicas generadas por un diseño rectangular). Esta disposición de las hojas aumenta el auto-sombreado de las hojas más viejas (con menor capacidad fotosintética), mientras que reduce el sombreado mutuo permitiendo la exposición a la luz de las hojas más jóvenes. Decimos entonces, que el reconocimiento de parientes genera un beneficio mutuo, donde el costo (incremento de auto-sombreado) es rápidamente compensado por la reducción del sombreado mutuo. Esto se ve reflejado en el *fitness* reproductivo cuando se compara con individuos que no acomodan sus hojas hacia los laterales.

Palabras claves: reconocimiento de parientes, *fitness*, señales lumínicas, *Arabidopsis thaliana*, escape al sombreado.

MUTUAL BENEFIT AMONG KIN PLANTS.

Abstract

Plant responses to the light environment, historically interpreted as part of the competition reactions, can lead to altruistic behavior when there is kin recognition. When plants of *Arabidopsis thaliana* grown in individual pots were arranged in a rectangular design (i.e. a larger distance between rows than within the same row), we observed that plants showed increased proportion of their leaves placed perpendicular to the row. This pattern of leaf orientation does not occur when the rows involved seedlings of different genotype or seedlings of the same genotype but different age. This leaf arrangement is due to the redirection of leaf growth. This response mediated by phytochrome B, cryptochromes and phototropins (the main receptors of light signals generated by a rectangular design). This arrangement of the leaves increases self-shading of leaves, while reduces mutual shading. Therefore, kin recognition generates mutual benefit, where the cost (increased self-shading) is rapidly compensated by the reduced mutual shading. This is reflected on reproductive fitness when compared with individuals who failed to reorient leaf growth to out of the row.

Key words: kin recognition, fitness, light signals, *Arabidopsis thaliana*, shade avoidance.

Agradecimientos

A Jorge, por su optimismo frente a los resultados no esperados, su paciencia y estar siempre dispuesto a contestar preguntas y corregir trabajos incluso durante fines de semanas. Por todo lo que me enseñó: a escribir, a pensar, a mirar los resultados con cuidado, a insistir con las estrategias experimentales…..porque es admirable la pasión y ganas que le pone al trabajo. Pero quiero agradecerle sobre todo por la comprensión y el respeto a mis tiempos personales durante los últimos años que no fueron fáciles. La verdad que fue un gran placer haber trabajado con él todos estos años.

Al IFEVA, por haberme permitido hacer el Doctorado ahí, y a su gente que hace de ese lugar un excelente espacio, en cuanto a la calidad humana para trabajar.

A la FCEN UBA que me permitió realizar toda la carrera que de hecho hoy es gran parte de mi vida.

A Marcelo, por preguntar: ¿y tus cosas?, y sus pocos, pero grandes consejos.

A Javier Moreno, Pablo Cerdán y Hernán Boccalandro por las semillas que me prestaron.

A Tornese, porque siempre pude contar con él cuando una cámara, un aire, etc. se rompía, y más de una vez ha salvado mis experimentos !!!!!!!!!!

A Carlos y Walter, por preparar cientos y miles de "tubitos", pero sobre todo por su buena onda.

A Laura Ventura, por lavar también cientos y miles de "tubitos", entre varias cosa más que me ayudaba mientras trabajó con nosotros, como Ale Herrera; gracias a ambas.

A las chicas "Ballaré", sobre todo Mer y Pato por compartir horas de "after" en el labo, esperando que la otra termine para no irnos solas de ahí.

A todos y cada uno de los chicos del labo que hicieron de mis mañanas, tardes y noches en el IFEVA muy divertidas y llevaderas, los voy a extrañar mucho……!.

Lu, que te puedo decir…… gracias por cuidarme tantas veces las plantas del módulo, prestarme la tijerita, por rescatarme del IFEVA esa noche que no tenía las llaves del portón!, pero sobretodo por las cervecitas compartidas y las noches de tertulia, los consejos y por escucharme siempre. Estos últimos meses fuiste lo más! Gracias nena!

Sabri, gracias por la contención que junto con Mati me brindaron en aquellos momentos tan difíciles, jamás lo voy a olvidar. A los dos le estoy muy agradecida por todo el apoyo en estos 5 años desde lo laboral hasta lo personal y emocional, no voy a hacer una lista porque sería interminable……. Gracias gurises!

Romi, desde el principio siempre me diste una mano…….cuando te quedabas a hacerme compañía aquellos viernes de trasnoche y así surgieron los viernes de picadas y cerveza que hicieron el trabajo mas llevadero, momentos que voy a extrañar mucho. Gracias por todas las veces que me la cuidaron a Sofi junto con Paula, y ser siempre tan atentas y cariñosas con ella. A las dos mil gracias!, gurisas!

A Pipa, por tus clases prácticas y rápidas de agronomía y estadística, por bancarme de compañera de mesada y compartirme la tuya cuando desbordo de despelote!, por llevarme a buscar a Sofi los días de lluvia o de mucho calor, pero por sobre todo por ser un gran tipo.

A Trupkin, porque me hiciste reír mucho aún en momentos difíciles, porque me das la confianza de depositar en vos consultas de fitocromos y fotomorfogénesis, y por todos estos años compartidos, seguro no voy a encontrar un clon tuyo……hecho que voy a extrañar!

Gaby y Mariana, porque con ustedes hice una amistad y las quiero!

A Steve por escucharme y compartir momentos difíciles para mí.

Tecito, gracias por tu buena onda y bancar mi malhumor por las mosquitas de la cámara!!!!!!!!!!!, entre otros malhumores!. No serás el "mejor compañero", pero te ganaste un lugar en el labo……jajaja!

Carlos, siempre atento y buena onda, gracias por escucharme y alentarme, sobre todo eso alentarme estos últimos tiempos.

Silvia y Leo por tantos puchos y charlas compartidas!

Vero Rodríguez, por la buena onda y tu forma de ser. Admiro tu energía!.

Andre, por estar siempre con un mate listo para arrancar el día y siempre dispuesta a brindar una oreja para escuchar……

A los que ya no están pero recuerdo con mucho cariño como "la Blonda" (una amiga y para qué decir más……), Vero A. (estuviste en los principios y hasta el último momento me diste una mano…). Las quiero chicas!, Kari (hace mucho que no estás pero fue por vos que estoy acá, te recuerdo con muchísimo cariño), Consti, gracias por dejarme todos esos tubos y

bandejitas de telgopor listas para arrancar (un buen tema resultó…….!!!!!!!!!!!!), Paulita, porque aunque hace mucho que ya no está, siempre está cerca brindando una mano, Ely, Ana y especialmente a Georgina por todo lo que me ayudó mientras trabajó conmigo.

A los más nuevos, Marcos, Vicky, Yami y especialmente Rocío.

A mis amigas del alma que conocí cuando comencé la carrera y aún están conmigo. Flor, porque fuiste parte de esa familia que me construí cuando me radiqué en Bs. As. y por ende sos parte de lo que más voy a extrañar……Gracias por compartir tu hogar que me hicieron más fáciles estos últimos meses!!!!!!!!!!!!!!. Y Noe, por ser mi amiga del alma de mi última década y estar siempre presente alentándome tanto en lo laboral, pero sobre todo en lo personal!!!!!!!!!!!!!!.....te quiero nena.

A mi papá y hermanos, especialmente a Marce que estuvo más involucrada en todo esto. Gracias hermanis por enseñarme a sacar fotos, por ayudarme a cosechar y por anotar datos de cotiledones e hipocotilos mientras te dictaba, por cuidarla a Sofi cuando trabajaba, pero sobre todo gracias por tu contención en mi vida!!!!!!!!!!!!!!!!!

A tíos, abuelos y amigos de la vida que me dieron una mano en estos últimos años tan trascendentes para mí.

A Seba, gracias por estar aunque no entiendas mi pasión….y ser un cable a tierra con otras cosas de la vida.

Esta tesis quiero dedicarla a mi mamá y a mi hija,

A mi mamá, porque sin voluntad y perseverancia nunca lo hubiese logrado, y fue ella quien me enseñó estos conceptos entre muchas cosas más.....Es por ella que soy quien soy. Siempre me acompañó en las buenas y en las malas hasta el último momento, siempre dispuesta a ayudarme, incluso me ayudó anotándome cosas de los gráficos que figuran a continuación, además de acompañarme a cuidar mis plantitas para cuidarla a Sofi más de un fin de semana que nos venía a visitar. Estaría muy orgullosa si pudiese estar en este momento, lamento tanto que no estés mami (no sólo porque me doctore)……..te extraño!!!!!!!!!!!

A mi hija porque es el motor de mi vida y la luz de mi alma, desde su inocencia me acompañó cada día en todo esto. Jugando en el laboratorio mientras trabajaba, yendo de paseo los fines de semana al invernáculo a regar y ……siempre algo más, ***en vez de ir a la plaza****, bancándose la frase "espera un minuto que ya termino"…….*

Gracias a ambas, tendría que escribir otra tesis para ustedes, ya que todo lo que diga es chico para dos grandes……

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas y el ambiente lumínico.

Las plantas, como organismos fotoautotróficos sésiles, deben ajustar continuamente su crecimiento y desarrollo así como la eficiencia en el uso del agua (Boccalandro *et al.*, 2009) a las condiciones fluctuantes del medio ambiente para optimizar la actividad fotosintética. El desarrollo de la plasticidad se logra a través de la percepción, transducción e integración de múltiples señales ambientales. Las plantas poseen sistemas de señalización que les permiten percibir e integrar la información del ambiente circundante. La complejidad de dichos sistemas varía según el organismo y los factores ambientales que se estén percibiendo.

La luz cumple un rol fundamental a lo largo del ciclo biológico de las plantas ya que es uno de los estímulos ambientales que mayor efecto tiene sobre su crecimiento y desarrollo. Representa la fuente de energía en la fotosíntesis que posibilita la formación y desarrollo de hojas, tallos, raíces y flores; controla la germinación en la semilla, la des-etiolación en la plántula, el desarrollo del vástago y el momento de floración en la planta adulta, además de permitirle sensar la proximidad de plantas vecinas, es decir que le provee de información espacial y temporal del ambiente que las rodea (Franklin, 2008).

1.1.1 Las señales lumínicas.

Los fenómenos por medio de los cuales las plantas censan y responden a la información provista por el ambiente lumínico se los denomina **fotomorfogénesis.** El estudio del proceso fotomorfogénico puede dividirse en distintas etapas: 1) las señales provistas por el ambiente lumínico, 2) los fotorreceptores que perciben dichas señales, 3) los mecanismos involucrados en la transformación de las señales lumínicas en señales bioquímicas mediante cadenas de transducción, y 4) las respuestas fisiológicas, de las

cuales se desprenden consecuencias ecológicas y agronómicas (Fig.1.1). Se conocen varios intermediarios de la señalización (Casal *et al.*, 2003), sin embargo la red de señalización lumínica es muy compleja y quedan aún muchas interacciones y genes integrantes de la misma sin conocer. En este trabajo se estudió principalmente las etapas 1, 2 y 4 en el modelo que se describe más adelante, para realizar algunas aproximaciones de la etapa 5.

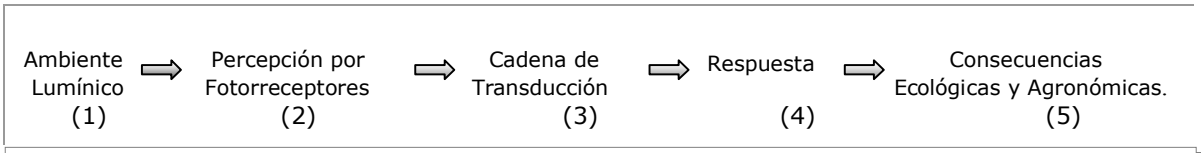


Fig. 1.1: Aspectos estudiados por la fotomorfogénesis.

Es posible identificar al menos cuatro características del ambiente lumínico que constituyen señales informativas para las plantas: la irradiancia (cantidad de luz por unidad de tiempo y superficie), la composición espectral (relación entre la cantidad de luz en determinadas zonas del espectro), el fotoperíodo (duración diaria del período lumínico) y la dirección de incidencia. Los cambios en estas variables constituyen señales que permiten a las plantas detectar situaciones ecológicas tan variadas como la proximidad a la superficie del suelo durante el proceso de emergencia, la presencia de plantas vecinas que representan un riesgo de sombreado futuro y la llegada de la estación climática favorable para su crecimiento, entre otros (Casal *et al.*, 2003). En este trabajo se pondrá particular atención a dos de estas señales: la irradiancia y la composición espectral.

La alteración más importante desde el punto de vista informativo para las plantas en cuanto a la composición espectral de la luz, ocurre cuando varía la relación entre la luz roja (R) (660 a 670 nm) y la luz roja lejana (RL) (725 a 735 nm) (Holmes and Smith, 1977; Smith, 1982). Esto se debe a que los pigmentos; como carotenoides y clorofila, absorven de manera preferencial longitudes de onda de luz azul y de luz roja, resultando

en un enriquecimiento selectivo de ciertas longitudes de onda del espectro. Las hojas transmiten o reflejan la luz roja lejana y verde, (revisado en: Franklin and Whitelam, 2005), esto conduce a una caída en la relación R/RL de la luz, lo cual le provee a la planta información acerca de la proximidad de vegetación vecina, de esta manera pueden desarrollar respuestas de tolerancia o de escape al sombreado antes de que las plantas sean sombreadas por la vegetación circundante. Recientemente, se ha demostrado que la relación de la luz azul/verde decae bruscamente con el incremento del canopeo, disminuyendo a la mitad de los valores observados en lugares abiertos (Sellaro *et al.*, 2010). Sellaro *et al*. (2010) observaron que el largo del hipocotilo de plántulas de *Arabidopsis thaliana* decrece linealmente con el aumento de la relación azul/verde de la luz, de sus estudios surge que cambios en esta relación dentro del rango de valores naturales tienen efecto sobre el desarrollo de las plantas.

Las plantas experimentan una dramática alteración en la cantidad y calidad de luz cuando se desarrollan bajo un canopeo, como se muestra en la figura 1.2 (adaptada de Franklin 2008). La capacidad de las plantas individuales para tolerar o escapar del sombreado de sus vecinos mejora la competitividad, y en última instancia, la probabilidad de éxito reproductivo cuando hay un rápido crecimiento poblacional (Franklin, 2008).

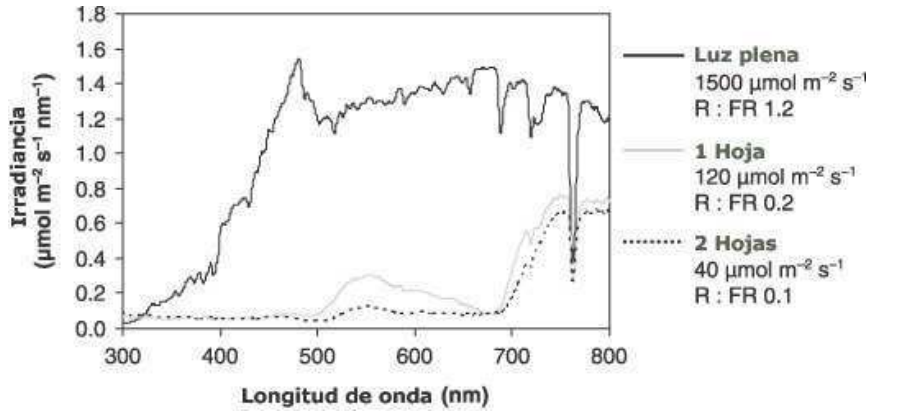


Fig. 1.2: Distribución espectral de la luz. Luz plena (línea negra continua) y luz filtrada a través de hojas de Arabidopsis (línea gris y línea punteada). Se puede observar como varía la irradiancia total y la relación R/RL de la luz cuando pasa a traves de un canopeo. (Adaptado de Franklin 2008)

1.1.2 Respuestas de las plantas a las señales lumícas típicas de cultivos densos.

Las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para ajustar su crecimiento y desarrollo al hábitat en el que les toca vivir mediante la percepción de las señales que ese ambiente le brinda. Por ejemplo, en cultivos densos las plantas responden a una reducción de la relación R/RL como consecuencia de la luz reflejada por las plantas vecinas, iniciando una serie de respuestas fisiológicas y morfológicas antes de ser sombreadas. En la literatura, este conjunto de respuestas es conocido como "síndrome de escape al sombreado" (Smith and Whitelam, 1997) (SES) y la consecuencia de estas respuestas es una planta con mayor capacidad competitiva.

El éxito en el establecimiento de una plántula como organismo autotrófico puede depender, entre otras cosas, de las futuras relaciones de competencia entre individuos de la misma especie y entre otras especies (Ballaré, 2000). Se producen considerables variaciones dentro de una misma especie y entre especies en respuesta al sombreado por plantas vecinas y esto confiere ventajas adaptativas en diferentes ambientes ecológicos (Morgan and Smith, 1979; Corré, 1983; Dudley and Schmitt, 1995). En especies tolerantes, las hojas ajustan sus estructuras fotosintéticas aumentando de ese modo la eficiencia a bajas irradiancias de luz. Esto incluye hojas delgadas, alto contenido de clorofila y células de la epidermis en forma de lente para focalizar la luz en el mesófilo (Boardman, 1977; Middleton, 2001). En especies intolerantes al sombreado la percepción de una caída en la relación R/RL resulta en un cambio en las respuestas de desarrollo, colectivamente referidas como SES (Smith and Whitelam, 1997). El fenotipo más común en plantas dicotiledóneas expuestas a una baja relación R/RL es la marcada elongación de tallos y hojas (Morgan and Smith, 1976; Morgan and Smith, 1978b; Morgan and Smith, 1981), además de la reorientación de las hojas hacia arriba (hiponastía) (Whitelam and Johnson, 1982). Esta adaptación les permite elevar las hojas dentro del canopeo, una respuesta que probablemente aumenta la capacidad de interceptar luz en cultivos densos y le permite a la planta disponer sus hojas por encima de sus competidores; siendo esta una respuesta de supervivencia en poblaciones que crecen rápidamente. La luz que se

propaga horizontalmente en los estratos más bajos de un canopeo se encuentra enriquecida con luz RL, se ha demostrado que esta es la principal señal regulatoria que controla la elongación del tallo en especies intolerantes al sombreado (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990). Estas respuestas de escape al sombreado también incluyen un incremento de la dominancia apical y menor contenido de clorofila en hojas (Smith and Whitelam, 1997). Si la señal baja de R/RL persiste se acelera la floración, de esta manera se promueve la formación de la semilla y se aumenta la probabilidad de un suceso reproductivo (Halliday *et al.*, 1994; Dudley and Schmitt, 1995; Donohue *et al.*, 2001). Estos cambios son a menudo acompañados por reducciones en el área foliar, contenido de biomasa y tamaño del fruto, como consecuencia de la reasignación de los recursos hacia las estructuras reproductivas (Keiller and Smith, 1989; Robson *et al.*, 1993; Devlin *et al.*, 1996; Devlin *et al.*, 1999). En plantas monocotiledóneas, lo que ocurre principalmente es un aumento de la dominancia apical y una reducción en el llenado de granos, lo que se traduce en un menor rendimiento, ésto hace que estas respuestas sean la principal determinante en la densidad de plantas de los cultivos (Kebrom and Brutnell, 2007).

La visión actual, es que las respuestas fotomorfogénicas inducidas por bajas relaciones de R/RL en un cultivo denso son perjudiciales para el rendimiento (Heindl and Brun, 1983; Libenson *et al.*, 2002). Sin embargo, un cultivo de maíz que reorienta el crecimiento de sus hojas alejándose de la señal baja de R/RL (provocada por las plantas vecinas cuando son cultivadas en densidades comerciales), presentan alrededor de un 10% de incremento en la intercepción de luz (Maddonni *et al.*, 2001) y de llenado de grano (Toler *et al.*, 1999) que un cultivo similar con hojas orientadas al azar. Entonces, la capacidad de respuesta de reordenamiento de las hojas podría llegar a tener un fuerte impacto en el rendimiento de los cultivos agrícolas. Esta respuesta es la que estudiamos durante el transcurso de mi tesis doctoral en plantas de *Arabidoposis thaliana*, más adelante se especificará por qué se eligió a esta especie como sistema de estudio.

1.1.3 El rol de los fotorreceptores.

En las plantas han evolucionado una serie de fotorreceptores que perciben señales lumínicas e integran esta información mediante complejos sistemas de señalización. Éstos son capaces de detectar distintas longitudes de onda. Los fotorreceptores en plantas básicamente son de tres tipos: los fitocromos que perciben la luz principalmente en la región del espectro del R y RL (Quail, 2002), los criptocromos que absorben luz azul y UV-A (Cashmore *et al.*, 1999) y las fototropinas, que también absorben la luz azul y UV-A (Briggs and Christie, 2002).

Los fitocromos son una familia de fotorreceptores codificados por genes divergentes (Clack *et al.*, 1994). En *Arabidopsis* hay cinco miembros llamados phyA - phyE, siendo los más abundantes el phyA y el phyB, y en consecuencia los más estudiados y caracterizados. Esto se debe en parte a que median la mayoría de las respuestas fotomorfogénicas de las plantas, y el fenotipo obvio de los mutantes ha permitido que sean los primeros fitocromos para los cuales se estableció la función en *Arabidopsis.* Experimentos realizados con plantas mutantes que carecen de un determinado fotorreceptor o plantas transgénicas con niveles reducidos o incrementados ha permitido asignar funciones específicas a los fitocromos (Dehesh *et al.*, 1993; Nagatani *et al.*, 1993; Parks and Quail, 1993; Reed *et al.*, 1993; Whitelam *et al.*, 1993; Aukerman *et al.*, 1997; Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999; Franklin, 2003; Monte *et al.*, 2003).

Las respuestas a bajas relaciones de luz R/RL son mediadas principalmente por el phyB, el cual actúa moderando las respuestas de escape al sombreado en altas condiciones de R/RL. Mutantes deficientes en el phyB crecen como plantas salvajes en bajas relaciones de R/RL y exhiben un fenotipo constitutivo de escape al sombreado (Nagatani *et al.*, 1991; Somers *et al.*, 1991). El hecho de que algunas de las respuestas de escape al sombreado sean exhibidas de manera normal en mutantes nulos de *phyB* en varias especies, sugirió que otros fitocromos podrían estar involucrados en este tipo de respuestas (Whitelam and Smith, 1991; Robson *et al.*, 1993). Se hicieron y analizaron múltiples combinaciones de mutantes de fitocromos para determinar el rol funcional del

phyD. El doble mutante, deficiente en phyB y phyD, exhibe hipocotilos y pecíolos más largos, además de florecer más temprano que cada uno de sus parentales mutantes monogénicos, sugiriendo que el phyD actúa de manera redundante con el phyB para mediar la supresión de las respuestas de escape al sombreado (Aukerman *et al.*, 1997; Devlin *et al.*, 1999). La función del phyE se asignó luego de que en un *"screening"* realizado en fondo genético del doble mutante *phyA phyB,* se encontrase una planta que florecía muy temprano y que tenía una marcada elongación de los entrenudos en las hojas de la roseta cuando las mismas eran expuestas a tratamientos de RL al final del día, resultó que esa planta tenía mutado el phyE (Devlin *et al.*, 1998). De manera similar al mutante de *phyD*, el mutante monogénico *phyE*, exhibe un fenotipo no tan obvio, lo que sugiere que el phyE actúa de manera redundante con phyB y phyD en la supresión de las respuestas de escape al sombreado (Devlin *et al.*, 1998). Los phyB, phyD y phyE representan los miembros más evolucionados de la familia de fitocromos y forman un subgrupo diferente (Mathews and Sharrock, 1997), este hecho ha permitido suponer que la competencia por la luz pudo haber proporcionado la presión de selección para su evolución (Devlin *et al.*, 1998).

Las plantas sufren una significativa reducción de la cantidad de luz cuando están bajo un canopeo denso, en particular luz R y luz azul. En varias especies se ha observado una pronunciada elongación del tallo cuando las plantas son expuestas a tratamientos donde se remueven las longitudes de onda correspondientes al azul mediante filtros (Ballaré *et al.*, 1991b). Un incremento en la hiponastia de las hojas también ha sido observada en plantas de tabaco en donde se redujo la irradiancia de fotones de luz azul (Pierik, 2004). Reducciones en la cantidad de luz azul pueden por lo tanto producir algunas de estas respuestas fisiológicas y morfológicas características de cultivos densos.

La luz azul induce varias respuestas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo movimientos fototrópicos, apertura de cotiledones, floración, aplanamiento de las hojas, des-etiolación, apertura estomática, movimiento de cloroplastos, acumulación de antocianas, expresión génica e inhibición de la elongación de los hipocotilos (Cashmore *et al.*, 1999; Briggs and Christie, 2002; Lin, 2002; Wang and Deng, 2002). En plantas superiores, la sensibilidad a longitudes de onda de la luz azul es conferida principalmente

a los criptocromos y fototropinas (Cashmore *et al.*, 1999; Briggs and Christie, 2002). En Arabidopsis, la inhibición del crecimiento del hipocotilo mediada por la luz azul es regulada por dos criptocromos (cry1 y cry2), los cuales difieren en cuanto a su labilidad y especificidad de flujo (Ahmad *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998). Recientemente Sellaro *et al*. (2010) demostraron que los criptocromos también sensan la relación azul/verde de la luz.

En Arabidopsis dos fototropinas (phot1 y phot2) han sido identificadas (Christie *et al.*, 1998; Jarillo *et al.*, 1998), las mismas exhiben roles regulatorios solapados en el desarrollo de la planta; que incluye el control del crecimiento direccional en respuesta a la dirección de la luz (fototropismo), movimientos direccionales de cloroplastos en respuesta a la cantidad de luz y expansión de las hojas (Jarillo *et al.*, 2001; Sakai, 2001; Sakamoto and Briggs, 2002; Takemiya *et al.*, 2005). Las fototropinas tienen un rol primordial en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas en bajos flujos de luz. Inoue *et al.* (2008) demostraron que la luz azul induce a la superfice de la hoja a orientarse perpendicularamente a la fuente de luz lo que incrementa la intercepción de la misma, y sugieren que las plantas utilizan la luz azul para determinar la orientación de sus hojas, estas respuestas están mediada por fototropinas.

En la naturaleza las respuestas controladas por fototropismo son muy diversas. Por un lado, el movimiento de cloroplastos y apertura de estomas son procesos rápidos y reversibles. Por el otro lado, las respuestas fototrópicas y el aplanamiento de las hojas son procesos de crecimiento más lentos, coordinados por división y expansión celular. Tal coordinación del crecimiento está bajo una fina regulación hormonal, y la hormona auxina es el regulador central del fototropismo (Holland *et al.*, 2009), aplanamiento (Keller and Van Volkenburgh, 1997; Li *et al.*, 2007a; Bainbridge *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2008) y posicionamiento de hojas (Tao *et al.*, 2008; Millenaar *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo ilustrado en los párrafos anteriores, en este trabajo se utilizaran mutantes de los siguientes fotorreceptores: phyB, cry1, cry2, cry1cry2, phot1, phot2 y phot1phot2; para estudiar la respuesta de reordenamiento de las hojas en plantas de Arabidopsis cultivadas en hileras.

1.2 Respuestas del síndrome de escape al sombreado (SES) y su plasticidad adaptativa.

El fenotipo de escape al sombreado inducido por una baja relación de R/RL es considerado ventajoso en altas densidades vegetales ya que podría producir un alto *fitness* relativo, mientras que en bajas densidades vegetales podría sufrir un *fitness* desventajoso (Casal and Smith, 1989.; Schmitt and Wulff, 1993). Por ejemplo, cuando las plantas crecen en densidades altas, las respuestas fotomorfogenéticas tales como la elongación del tallo puede conferirles una ventaja importante en cuanto a la competencia asimétrica por la luz (Schmitt and Wulff, 1993; Ballaré, 1994). Sin embargo, en ausencia de competencia la asignación de recursos hacia arriba, a expensas de las hojas, raíces o ramas puede reducir el crecimiento y la reproducción, y los tallos elongados pueden experimentar un gran riesgo de daño mecánico (Casal and Smith, 1989; Schmitt and Wulff, 1993).

La observación de ecotipos fotomorfogénicos en diferentes ambientes selectivos sugiere que las respuestas de escape al sombreado han experimentado una evolución adaptativa (Schmitt, 1997). La capacidad para responder de un genotipo a la variación ambiental permite la evolución de la plasticidad fenotípica (Schmitt, 1997). Para que la plasticidad sea adaptativa, el fenotipo inducido por un determinado ambiente debe conferir un mayor *fitness* en ese ambiente si se lo compara con el *fitness* del fenotipo alternativo, y esa plasticidad adaptativa evoluciona, si la selección natural sobre un carácter difiere entre los ambientes, y los genotipos dentro de la población varían en la expresión fenotípica del carácter a través de aquellos ambientes (es decir, en la norma de reacción) (Schmitt *et al.*, 2003). Schmitt (1997) concluye que la teoría predice que la evolución de la plasticidad puede estar limitada por fuertes correlaciones genéticas entre caracteres a través o dentro de los ambientes, o por los costos de la plasticidad.

Las plantas pueden percibir la relación de R/RL reflejado por la vegetación vecina como un indicador de la proximidad de vecinos y así responder morfológicamente incluso antes de que ellos sean directamente sombreados (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1990). Estos hechos han permitido hipotetizar que la sensibilidad a la relación R/RL

mediada por los fitocromos es adaptativa, dado que gracias a dicha sensibilidad las plantas pueden anticiparse y evitar la competencia por la luz en altas densidades de cultivo (Ballaré *et al.*, 1987; Casal and Smith, 1989.; Ballaré *et al.*, 1990; Schmitt and Wulff, 1993).

La capacidad de un genotipo de desarrollar diferentes fenotipos en respuesta a señales ambientales puede ser una importante característica para el rendimiento. Si dicha plasticidad fenotípica resulta en una correspondencia exacta del fenotipo hacia el ambiente, esto puede derivar en un alto *fitness* relativo en todo el rango de condiciones ecológicas que un organismo experimenta. Manipulaciones experimentales de fenotipos demuestran que las respuestas de escape al sombreado pueden ser adaptativas, si los fenotipos tienen un alto *fitness* relativo en aquellos ambientes que indujeron a estos fenotipos. El valor adaptativo del escape al sombreado depende del ambiente competitivo, la disponibilidad de recursos, y la fiabilidad de la señal R/RL que predice ese ambiente selectivo experimentado por el fenotipo inducido (Schmitt *et al.*, 2003)

Las respuestas de escape al sombreado mediadas por los fitocromos fueron interpretadas como respuestas adaptativas (Morgan and Smith, 1979; Smith, 1982; Casal and Smith, 1989). Plantas mutantes o transgénicas proveen una valiosa herramienta para investigar el significado adaptativo de estas respuestas fotomorfogénicas. Un ejemplo de esto fue un estudio hecho en plantas de tabaco transgénicas, en las mismas sobreexpresaron el phyA para bloquear la plasticidad de elongación en respuesta a vecinos. Cuando estas plantas crecieron en competencia del fenotipo salvaje que tenía una elongación normal sufrieron una reducción en el *fitness* (Schmitt *et al.*, 1995). De este estudio surge que la elongación del tallo mediada por los fitocromos es ventajosa para plantas que crecen en altas densidades, como es predicho por la hipótesis de plasticidad adaptativa (Schmitt, 1997). Otro ejemplo es un estudio hecho con mutantes deficientes de phyB en *Brassica rapa* (Schmitt *et al.*, 1995) y *Arabidopsis thaliana* (Pigliucci and Schmitt, 1999), los mismos expresan un fenotipo de escape al sombreado constitutivo. Estos trabajos también apoyan la hipótesis de plasticidad adaptativa ya que los mutantes tienen un *fitness* relativo más bajo que el fenotipo plástico salvaje cuando crecen en bajas densidades, lo que indicaría que el fenotipo de escape al sombreado es

desventajoso en bajas densidades de cultivo. Sumado a esto, otro estudio hecho en mutantes deficientes de phyB en *Cucumis sativus* mostró que cuando las plantas crecieron aisladas en el campo los mutantes de hipocotilo largo sufrieron mayor daño mecánico por el impacto del viento respecto del genotipo salvaje (Casal *et al.*, 1994). En otro estudio mostraron que plantas de poroto tratadas con ácido giberélico para inducir la elongación del tallo, sufrieron una reducción en la biomasa y la reproducción comparadas con plantas control crecidas en el mismo ambiente (Cipollini and Schultz, 1999). Estos resultados sugieren que la expresión de fenotipos elongados requiere de un cierto costo cuando las plantas crecen en bajas densidades. Estos ensayos permitieron testear la hipótesis de plasticidad adaptativa que predice que fenotipos de escape al sombreado tendrán un mejor *fitness* en altas densidades y un *fitness* desventajoso en bajas densidades (Schmitt, 1997).

Existen evidencias que las respuestas de SES pueden ser adaptativas en especies salvajes bajo condiciones naturales. Dudley and Schmitt (1996) mediante manipulación fenotípica testearon el valor adaptativo de las respuestas de elongación del tallo dependiente de la densidad en poblaciones naturales de *Impatiens capensis.* Plantas con tallos elongados y no elongados, logrado por exposiciones a bajas y altas relaciones de R/RL, fueron luego expuestas a altas y a bajas densidades de cultivo. Observaron que las plantas que elongaban el tallo tenían un mayor *fitness* relativo que las plantas no elongadas en altas densidades, pero un menor *fitness* relativo en bajas densidades, como lo supuesto por la hipótesis de plasticidad adaptativa (Dudley and Schmitt, 1996).

El fenotipo de escape al sombreado puede resultar más vulnerable al estrés por sequía, si las respuestas de elongación inducidad por los vecinos reasignan proporcionalmente menos biomasa hacia las raíces con respecto al área foliar y ramas, entonces la ventaja relativa de caracteres de expresión del SES disminuye con el incremento al estres por agua, sugiriendo que el valor adaptativo de las respuestas de escape al sombreado puede ser menor en ambientes secos (revisado en Schmitt *et al.*, 2003).

1.2.1 Los costos de las respuestas de SES.

Si se asume que la señal inductiva predice fehacientemente el ambiente selectivo, Schmitt et al. (2003) concluyen que "es esperable que la norma de reacción evolucione hacia la expresión del fenotipo óptimo en la mayoría de los ambientes en ausencia de costos fisiológicos de plasticidad o limitaciones genéticas. Sin embargo, si el mantenimiento de la capacidad para la plasticidad es costosa, la respuesta plástica óptima será un compromiso entre la norma de reacción expresando un fenotipo óptimo en cada ambiente y la norma de reacción con el menor costo".

La selección actúa sobre fenotipos multivariados, no independientemente sobre un carácter individual, con lo cual la selección directa sobre un carácter puede también resultar en la selección indirecta sobre un carácter correlacionado. Entonces Schmitt (1997) concluye que, las respuestas evolutivas de selección para una norma de reacción óptima de un determinado carácter pueden ser limitadas por correlaciones genéticas fuertes a través y dentro de los ambientes. Por lo tanto, la selección directa sobre un carácter simple en un ambiente lumínico puede resultar en respuestas evolutivas de caracteres correlacionados que no son necesariamente adaptativos.

1.3 El comportamiento de las plantas en situaciones de competencia.

La competencia por los recursos es uno de los factores más importantes que determinan el destino de los individuos y la distribución de las especies. Desde hace años los científicos se han focalizado en entender el rol de la competencia en la formación de las poblaciones y comunidades, así como la evolución de las respuestas competitivas y caracteres (Novoplansky, 2009). La competencia en plantas ha sido estudiada desde diferentes disciplinas; mientras los ecólogos en general se focalizan en la capacidad diferencial de las especies para prevalecer a pesar de la competencia por recursos limitados y el impacto que esto tiene a nivel de poblaciones y comunidades, los fisiólogos

de plantas estudian tradicionalmente varios de los caracteres que subyacen a estas adaptaciones (Novoplansky, 2009).

Muchos estudios se han centrado en la capacidad de las plantas de adaptarse a un gran número de cambios basados sobre las señales que perciben desde su ambiente. Las mismas son capaces de percibir potenciales competidores a través del cambio en el flujo y composición espectral de la luz (Smith, 2000; Weinig, 2002), componentes volátiles (Ninkovic, 2003; Pierik, 2004) y exudados de raíces (Mahall and Callaway, 1991; Schenk, 1999). Además, tienen la capacidad de discriminar entre sus vecinos y desarrollarse diferencialmente de acuerdo a la identidad de las especies, el ecotipo, la integridad fisiológica e incluso las relaciones genéticas (Biedrzycki *et al.,* 2010), pero los mecanismos precisos responsables para discriminar al posible competidor aún no se conocen.

Existen evidencias que sugieren la participación de reconocimiento de individuos idénticos o no en interacciones competitivas entre raíces. El primer reporte de tal observación fue hecha por Mahall y Callaway (1991), ellos encontraron que el arbusto del desierto *Ambrosia dumosa* evita diferencialmente la elongación de raíces en presencia de otras raíces de Ambrosia individuales. Otros estudios compararon el rendimiento de las plantas que crecieron con grupos de individuos relacionados cercanamente (grupos de hermanos) y grupos de individuos no relacionados. Por ejemplo, mientras que *Triplasis purpurea* tiene un mayor *fitness* en grupos mezclados que en grupos homogéneos, sugiriendo una repartición de los recursos (Cheplick and Kane, 2004), *Cakile edentula* tiene un mayor *fitness* (Donohue, 2003) y menor asignación de los recursos a la raíz en grupos emparentados que en grupos no emparentados. Con lo cual, algunas especies de plantas pueden discriminar entre competidores emparentados de competidores extraños.

A partir de numerosos estudios realizados en distintas especies sobre interacciones de competencia en raíces, Novoplansky (2009) ha elaborado la siguiente idea: las plantas en general evitan la competencia entre raíces de la misma planta, o de plantas similares, dado que las raíces crecen menos y más cortas, pero incrementan la asignación de recursos hacia las raíces a expensas de la reproducción cuando en la vecindad hay

plantas foráneas. Por otro lado, ciertas plantas responden diferencialmente al sombreado de diferentes especies vecinas. Para que la señal lumínica sea informativa de la identidad del competidor, deben transmitir la probabilidad de ser generadas por un vecino idéntico o no. Por ejemplo, la posición relativa de las hojas y ramas dentro del canopeo de la planta afecta fuertemente la probabilidad de auto-sombreado; otra posible fuente de información en cuanto a la identidad del sombreado es la dirección relativa de la sombra, otra es el momento del día de intercepción de la sombra, debido a que la sombra que llega a la planta durante períodos más temprano o tardíos del día tiene una mayor probabilidad de estar generada por vecinos que no son identicos.

1.3.1 Competencia entre individuos emparentados y la evolución de la cooperación.

"Los caracteres cooperativos imponen un costo sobre los individuos que exhiben ese carácter para beneficiar a otros individuos; de este modo, la selección natural no favorece a los individuos cooperativos dentro de un grupo, favoreciendo incluso a aquellos organismos que evitan los costos de cooperación mientras reciben los beneficios que les otorgan los individuos cooperativos", concluye Platt y Bever (2009). A pesar de esto el cooperativismo es muy común en la naturaleza, encontrándose en una gran variedad de sistemas biológicos desde primates hasta bacterias, lo que nos permite pensar que los costos de cooperación pueden ser superados (Platt and Bever, 2009).

Hamilton fue el primero en plantear una explicación acerca de cómo la cooperación puede evolucionar a pesar de sus costos directos, lo cual es conocido como la regla de Hamilton (Hamilton, 1964). Él demostró que los caracteres cooperativos pueden evolucionar siempre que los beneficios que los receptores acumulen debido a la relación genética, sean mayores que los costos de los actores (Hamilton, 1964); es decir, que la relación de parentesco (R) sea mayor que la proporción entre el costo y el beneficio (c/b). En base a esto, un carácter cooperativo puede evolucionar si hay relaciones de parentesco. En general un individuo tiende a interaccionar dentro de un grupo familiar o

con otros individuos geneticamente similares, por lo tanto los grupos con una alta proporción de individuos cooperativos pueden tener una mayor productividad, y este incremento en la productividad puede ser suficiente para superar los costos de la cooperación (Platt and Bever, 2009).

Cuando las poblaciones se caracterizan por una dispersión limitada, la competencia de individuos relacionados puede antagonizar la evolución de la cooperación. Así, la densidad y elasticidad poblacional como los patrones de dispersión son factores ecológicos que determinan el grado en el cual la competencia entre parientes limita los beneficios cooperativos (Platt and Bever, 2009).

1.3.2 Mecanismos comportamentales que explican la evolución de un carácter cooperativo.

La teoría de la selección natural (Darwin, 1859) explica como los caracteres heredables asociados con sucesos reproductivos serían seleccionados y así acumulados en las poblaciones naturales. Esto permite una adaptación de caracteres diseñados para maximizar los sucesos reproductivos (*fitness*); pero, cómo puede evolucionar entonces un carácter altruista que es costoso para el "actor" y beneficios para el "receptor". Por ejemplo: las castas de obreros estériles en colonias de insectos sociales, quienes ayudan a criar la progenie de su reina. El problema es que el altruismo reduce el suceso reproductivo del individuo que manifiesta este tipo de comportamiento (West and Gardner, 2010).

En la década de los 60, se logró resolver el paradigma sobre los caracteres altruistas, ya que se demostró que los genes pueden propagarse no sólo a través del impacto directo de su propia transmisión, sino también del impacto indirecto en la transmisión de copias presentes en otros individuos (West and Gardner, 2010). En consecuencia, un comportamiento altruista puede ser favorecido si los beneficios son dirigidos hacias otros individuos que poseen en común genes para el altruismo. Esto es

resumido por la regla de Hamilton que mencionamos en párrafos anteriores. La selección natural conduce a los organismos a maximizar su *fitness* inclusivo, que es la suma de la aptitud adquirida en la producción de crías (*fitness* directo) y a traves de su efecto sobre la aptitud de individuos relacionados (*fitness* indirecto) (West *et al.*, 2007). El camino mediante el cual el *fitness* indirecto puede ser obtenido es a través de interacciones con parientes cercanos, en tal caso, los genes son idénticos por descendencia de un ancestro común; esto se conoce como selección de parentesco (West and Gardner, 2010). Sin embargo, el beneficio del *fitness* indirecto requiere relaciones genéticas en sí mismas y no necesariamente de parentesco, por ejemplo un gen (o conjunto de genes estrechamente ligados) puede dar origen a un fenotipo conspicuo (por ej. El fenotipo "barba verde"), este fenotipo permite discriminar entre los individuos que llevan o no ese gen, pero los individuos portadores de ese gen no necesariamente tienen que ser parientes. Veamos un ejemplo hipotético donde un gen que da origen a un fenotipo llamativo "barba verde" y además incita a los individuos "barbas verdes" a tener un comportamiento cooperativo hacia otros individuos "barbas verdes", pero estos últimos pueden ser "falsos barbas verdes", que manifiesten el fenotipo pero que no realicen el comportamiento cooperativo (revisado en: West *et al*., 2007). El mecanismo mediante el cual puede evolucionar un comportamiento altruista es a través del reconocimiento de estos individuos portadores de un fenotipo diferente, sin que necesariamente haya relaciones de parentesco entre los mismos, este mecanismo es conocido como *"**greenbeards**"* (West and Gardner, 2010).

Existen varios mecanismos para que evolucione un comportamiento cooperativo, mientras el **altruismo** puede ser favorecido si éste es dirigido preferencialmente hacia individuos relacionados genéticamente, el cual puede ser explicado únicamente por el beneficio del *fitness* indirecto, ya que es costoso para el "actor" y beneficioso para el "receptor". La **reciprocidad** (o benficio mutuo) es favorecida cuando el actor tiene más probabilidades de recibir ayuda a futuro. Incrementa la probabilidad de beneficiarse de la cooperación en interacciones futuras, y por lo tanto no es altruista; ya que beneficia tanto al "actor" como al "receptor"; en este caso resulta en un aumento del *fitness* inclusivo. Otro mecanismo es el *"**spite**"*, el cual es favorecido si el daño es preferencialmente

dirigido hacia individuos no relacionados, cuya pérdida mejora la aptitud de los individuos relacionados genéticamente con el actor (West and Gardner, 2010).

1.4 Las bases del reconocimiento entre parientes

La idea de reconocimiento de parientes y la percepción de señales químicas específicas en individuos genéticamente relacionados ha sido ampliamente estudiada en modelos animales. Estudios recientes han mostrado que las plantas también tienen la capacidad de reconocer otras plantas basadas en relaciones de parentesco e identidad, sin embargo es un punto de intenso debate ya que existen resultados contradictorios con respecto al reconocimiento de parentesco en plantas.

Biedrzycki y Bais (2010) detallaron los posibles tipos de interacciones en plantas, tanto con factores abióticos como bióticos: en las plantas existen mecanismos bioquímicos que les permiten sensar y responder a factores abióticos del ambiente en el que les toca vivir, tales como cambios en la intensidad y calidad de luz, temperatura, humedad y pH del suelo. También responden a estrés biótico, como el ataque de herbívoros y patógenos. Sumado a esto, las interacciones insecto-planta, microorganismos-planta y planta-planta. Las interacciones planta-planta pueden ser interacciones negativas, conocidas como alelopatías, o interacciones positivas por ejemplo la liberación de compuestos volátiles puede advertir a otras plantas de los alrededores de un ataque patógeno. Además pueden ser interacciones interespecíficas o intraespecíficas. Un ejemplo de interacción interespecífica es el de especies de plantas que secretan compuestos químicos para inhibir el crecimiento de otras plantas, hecho común que se da en especies invasoras de hábitat naturales. De acuerdo con datos bibliográficos Biedrzycki & Bais, (2010) concluyen que plantas invasoras secretan aleloquímicos que inhiben el crecimiento de plantas nativas. Un ejemplo de interacción intraespecífica es un estudio reciente hecho con la especie *Cakile edentula*, Dudley and File (2007) reportaron que estas plantas son capaces de discriminar entre plantas parientes (aquellas provenientes de semillas recolectadas de la misma planta madre) y extrañas (se refiere a plantas de la misma especie, pero que crecieron de semillas recolectadas de plantas madres

diferentes). *C. edentula* produce más raíces cuando crece en macetas con extraños que con parientes (Dudley and File, 2007). Sin embargo, no se estableció aún, si la disminución en el crecimiento de las raíces entre plantas que crecen con parientes respecto a las que crecen con extraños es debido un comportamiento altruista entre parientes o a un incremento de la competencia por la explotación del mismo recurso (Callaway and Mahall, 2007; Dudley and File, 2007). Éste fue el primer estudio en destacar interacciones específicas en plantas, por lo que estuvo sujeto a fuertes críticas y discusiones (Dudley and File, 2008; Klemens, 2008).

En la naturaleza, la capacidad de que individuos emparentados genéticamente se reconozcan puede generar ventajas en cuanto a su reproducción y supervivencia. El reconocimiento de parientes puede ser descripto como la habilidad para diferenciar miembros de una especie muy relacionados de miembros no relacionados, independientemente del mecanismo o función evolutiva (Biedrzycki and Bais, 2010). Uno de los mecanismos más comunes de reconocimiento familiar es el de *fenotipo de emparejamiento* (*phenotype matching*), que ocurre cuando un individuo compara las señales fenotípicas de otros individuos de la población con las suyas para determinar afinidad (Biedrzycki and Bais, 2010), es decir que depende de una correlación entre el fenotipo y el genotipo. Existe otro mecanismo que es el de *reconocimiento alélico* (conocido también como *Green beard gene*), ocurre cuando un individuo reconoce en otros individuos de la población un gen porque es el responsable de un fenotipo conspicuo y dicho individuo tiene un comportamiento altruista con los demás portadores del fenotipo "*barba verde"* (West *et al.*, 2007; Biedrzycki and Bais, 2010; West and Gardner, 2010). Antes habiamos definido este concepto para explicar como podía evolucionar un comportamiento cooperativo, y habíamos marcado que dos individuos portadores del gen "*barba verde"*, podían estar o no emparentados; aquí decimos que es un mecanismo de reconocimiento familiar porque las probabilidades de que dos individuos "*barba verde"* fuesen parientes son altas.

Para que los mecanismos de reconocimiento de parentesco ocurran, varios eventos entre los individuos de una especie deben suceder. Primero, algún tipo de señal de parentesco, debe ser expresada o producida por el organismo "emisor". Estas señales son

altamente variables dentro de las diferentes especies, por ejemplo, se ha encontrado en hormigas que reconocen a sus crías a través de sustancias químicas secretadas, mientras que muchas especies de aves como los pingüinos y golondrinas reconocen a sus crías a través del canto (Waldman, 1988). Segundo, un "receptor" de la población debe percibir o detectar la señal de parentesco. Por último, el receptor decide si tendrá un comportamiento diferencial hacia los parientes más cercanos, lo cual se conoce como discriminación de parentesco (West *et al.*, 2007; Biedrzycki and Bais, 2010)

Estas interacciones de reconocimiento son frecuentemente motivadas por comportamientos altruistas o cooperativos. El comportamiento altruista beneficia la población en su conjunto, aunque exista un cierto costo individual de los organismos que manifiestan el comportamiento altruista (Platt and Bever, 2009). Para que un comportamiento altruista evolucione, los beneficios de supervivencia generados por discriminación de parentesco, deben tener un mayor efecto sobre la población frente al costo que dicho comportamiento genere en los individuos cooperativos. Por ejemplo, el hecho de reconocer un pariente, podría evitar en muchas especies interacciones competitivas entre individuos cercanamente relacionados.

1.4.1 Reconocimiento de parentesco en plantas:

A continuación se detallan brevemente una serie de trabajos en los que se demuestra que las plantas son capaces de distinguir entre si mismas y otras plantas, además de reconocer plantas "hermanas" de extrañas:

Los estudios pioneros sobre el reconocimiento de las plantas a sí mismas versus plantas diferentes fueron realizados en *Ambrosia dumosa*. En dicho trabajo evaluaron la respuesta de las raíces de estos arbustos del desierto en raíces de la misma planta, raíces de plantas diferentes de la misma población, y raíces de un clon. Observaron que el crecimiento de las raíces de los arbustos era inhibido si se encontraban las raíces de diferentes individuos o de un mismo clon, pero no cuando se encontraban las raíces de la misma planta (Mahall and Callaway, 1991; Mahall and Callaway, 1992; Mahall and

Callaway, 1996). Entonces, las plantas además de reconocer parientes (plantas que provienen de la misma planta madre) de no parientes (plantas de distintas plantas madres) (Dudley and File, 2007; Murphy and Dudley, 2009) pueden reconecerse ellas mismas de otras plantas genéticamente iguales.

Un estudio reciente hecho en *Arabidopsis thaliana* demostró que en dicha especie también hay reconocimiento de raíces. En este trabajo hicieron crecer las plantas en un medio conteniendo exudados de plantas "hermanas", plantas extrañas (no hermanas) y sus propios exudados. Aquellas plantas expuestas a secreciones de extraños produjeron más raíces laterales que aquellas expuestas a secreciones de individuos emparentados (Biedrzycki *et al.*, 2010). Estos resultados de Biedrzycki et.al. (2010) apoyan lo encontrado por Dudley y File (2007).

En otro trabajo, Murphy y Dudley (2009) estudiaron el reconocimiento de vecinos emparentados en *Impatiens pallida.* En contraste a los estudios realizados hasta el momento, donde se estudiaba como respondían las plantas a vecinos emparentados o vecinos extraños, evaluando caracteres morfológicos subterráneos de la planta, en sus experimentos ellos demuestran que esta interacción de las raíces puede también influenciar caracteres aéreos de las plantas. *I.pallida* incrementa la asignación de recursos en hojas y tallos más que en raíces cuando las plantas crecen en presencia de extraños si se lo compara cuando crecen con vecinos emparentados (Murphy and Dudley, 2009).

Para resumir, podemos decir que estos cambios en la respuesta de crecimiento hacia vecinos relacionados genéticamente apoya la teoría de que, al menos algunas plantas, son capaces de identificar otras plantas de la misma especie basándose en sus relaciones parentales.

1.4.2 Plantas creciendo con "hermanas": ¿cooperan o compiten?

Hace más de 20 años la tendencia era que la competencia planta-planta era la única interacción posible en las comunidades de plantas. Sin embargo, trabajos recientes mostraron que los procesos que involucran la competencia planta-planta son más complejos que los descriptos previamente, concluye Milla *et al.* (2009). Bajo este contexto, Dudley y File (2007) en su trabajo muestran que las plantas anuales *Cakile edentula* son capaces de identificar parientes en diseños de competencia y, más relevante aún, reaccionan menos agresivamente a la competencia contra individuos relacionados cercanamente. De sus experimentos se desprende que el reconocimiento de parientes y la subsecuente reducción en el crecimiento de las raíces facilita el desarrollo de individuos relacionados viviendo en la misma área (Milla *et al.*, 2009). En otras palabras, la selección de parentesco tiene lugar a expensas de no maximizar el potencial radicular de cada individuo (Dudley and File, 2007).

Los mecanismos de reconocimiento individual en plantas no son tan intuitivos como en animales; de hecho el estudio pionero en la especie anual *C. edentula* generó un fuerte debate (Dudley and File, 2008; Klemens, 2008).

Las evidencias en cuanto al reconocimiento de parentesco son muy discutidas en la literatura, Milla *et al.* (2009) menciona algunos ejemplos: uno de los primeros trabajos evidencian un efecto de selección de grupo sobre un carácter (área foliar) en *A. thaliana*, pero las implicancias en el rendimiento no fueron ensayadas (Goodnight, 1985). Otro experimento con *A. thaliana* dio resultados confusos con respecto al rendimiento de los grupos de individuos relacionados versus los grupos de extraños (Andalo *et al.*, 2001). Otros estudios han mostrado selección de parentesco en plantas (por ejemplo: Tonsor, 1989; Donohue, 2003), o han encontrado grupos de extraños funcionando mejor (por ejemplo: Schmitt and Ehrhardt, 1987; Kelley, 1989; Cheplick and Kane, 2004). Por lo cual Milla *et al.* (2009) concluye que el consenso general no está aún bien establecido.

Estudios realizados en *L. angustifolius,* muestran que plantas creciendo con individuos altamente emparentados (igual genotipo), no superan a plantas que crecen rodeadas de vecinos extraños de la misma población (diferentes genotipo) ni a aquellas rodeadas de vecinos extraños de diferentes poblaciones (diferente genotipo). Las plantas

rodeadas por individuos "hermanos" y por genotipos de la misma población, presentan un *fitness* individual menor, además produjeron menos flores y menos biomasa vegetativa al observar al conjunto de individuos (Milla *et al.*, 2009). Con lo cual, a partir de estos datos se puede concluir que las relaciones genéticas estrechas implican una caída en el *fitness* grupal o individual en *L.angustifolius.* Estos datos, conjuntamente con trabajos anteriores, contradicen la generalización de que el reconocimiento de parientes puede actuar como el principal mecanismo microevolutivo común en plantas.

2 Hipótesis, estrategia y objetivos de trabajo.

2.1 Hipótesis de trabajo.

De lo mencionado en la sección anterior, podemos decir que las respuestas de las plantas al ambiente luminoso, históricamente interpretadas como reacciones de competencia, en algunos casos pueden dar origen a reacciones más cercanas al altruismo cuando existe reconocimiento de parentesco. La respuesta de posicionamiento de las hojas en las plantas de maíz en el trabajo realizado por Maddoni et al. (2002) se asemeja más a una característica de cooperación que podría ser particularmente beneficiosa para la agricultura (ver sección 1.1.2). Mediciones realizadas a campo y simulaciones por computadoras utilizando modelos de plantas virtuales (Andrieu *et al.*, 1995) indican que en sistemas de cultivo de alta rectangularidad, plantaciones de maíz con hojas perpendiculares a las líneas de siembra presentan mayor eficiencia de la intercepción de luz que cultivos similares donde las plantas orientan sus hojas de manera aleatoria (Toler *et al.*, 1999; Maddonni *et al.*, 2001). En virtud de lo mencionado, una de las hipótesis planteadas en este trabajo es si esta capacidad de respuesta de reordenamiento de las hojas es en realidad consecuencia de la presión de selección por rendimiento de líneas de plantas de interés agrícola por parte del hombre. Hasta el momento, no es posible dilucidar si esta respuesta fotomorfogénica fue en realidad seleccionada bajo la presión de cultivos agrícolas o siempre estuvo presente en los ancestros salvajes (Maddonni *et al.*, 2002). Dado que la respuesta observada de ordenamiento de las hojas se manifestó en una variedad de maíz cuyas plantas individuales en las hileras de siembra son del mismo genotipo, una hipótesis alternativa es que dicha respuesta sólo ocurre cuando las plantas están relacionadas genéticamente, a través de un mecanismo de reconocimiento de parentesco.

2.2 Estrategia experimental.

Las plantas de maíz han venido seleccionándose por generaciones en sistemas rectangulares de siembra (arreglo espacial particular de cultivos comerciales en donde la

distancia entre hileras es mayor que la distancia entre plantas dentro de la hilera). Para poner a prueba la primera hipótesis planteada en el párrafo anterior, se utilizó como organismo modelo *Arabidopsis thaliana,* dado que nunca fue cultivada de esta manera y por lo tanto nunca fue expuesta a la presión de selección en sistemas rectangulares. En la próxima sección se describe el diseño experimental para cultivar estas plantas en sistemas de alta rectangularidad. Luego, para poner a prueba la segunda hipótesis planteada se estudiará qué ocurre con esta respuesta entre individuos genéticamente iguales o no, para ello se utilizaran distintas accesiones de Arabidopsis las cuales se detallan en la siguiente sección.

2.3 Objetivos.

Las plantas manifiestan un conjunto de cambios fisiológicos y morfológicos en respuesta a las señales del ambiente luminoso de cultivos densos que les permiten ajustarse a las condiciones de competencia que estos cultivos les imponen. El impacto del SES en cultivos es variado, pues mientras algunas respuestas que componen el SES causan la inversión de recursos de la planta en órganos que favorecen la competitividad individual de las plantas pero no el rendimiento total del cultivo, otras respuestas permiten un mejor acomodamiento del follaje, minimizando la competencia y favoreciendo al cultivo en su conjunto. El objetivo general de este trabajo es estudiar las respuestas de la planta a las señales de luz de cultivos vegetales densos (bajas relaciones de luz R/RL y bajos niveles de luz azul) por varias vías:

- ✓ Una vía tiene como objetivo específico analizar el origen evolutivo de estas respuestas componentes del SES que minimizan la competencia entre plantas.

- ✓ La otra vía tiene como objetivo específico estudiar que ocurre con el reconocimiento entre parientes en plantas que no involucran reducciones inmediatas en el crecimiento como las observaciones pioneras en este tema (Dudley and File, 2007), las cuales acarrearon posturas muy controvertidas, por un lado porque el crecimiento reducido en las raíces podrían ser el resultado de una exhacerbada competencia entre

hermanos por explotación del mismo recurso o el resultado de señales químicas que permitan interacciones altruistas.

- ✓ Se intentará evaluar si esta característica genera algún costo en las plantas que la realizan y si esto tiene alguna repercusión en el rendimiento de las mismas; para poder enmarcarla dentro de algunos de los mecanismos descriptos en la sección 1.3.2.

- ✓ Y por último, otro objetivo específico es evaluar el rol de los fotorreceptores en el reordenamiento horizontal de las hojas de la roseta en plantas expuestas a señales lumínicas típicas de un cultivo.

Alcanzar los objetivos no sólo nos permitirá responder estas preguntas específicas, sino conocer más sobre el sistema biológico utilizado, profundizar en el entendimiento de las interacciones entre plantas y sus consecuencias ecológicas; y en última instancia brindar una potencial aplicación del conocimiento básico acumulado en el mejoramiento de los cultivos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal.

Se utilizaron semillas de genotipo salvaje (WT) de *Arabidopsis thaliana*, accesiones: Landsberg *erecta* (L*er*), Columbia (Col-2), Nossen, RLD, SHA, BAY y Cvi. También se utilizaron mutantes de criptocromo (*cry1, cry2, cry1 cry2*) (Ahmad *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1998; Cashmore *et al.*, 1999), de fototropinas (*phot1, phot2, phot1 phot2*) (Christie *et al.*, 1998), (Jarillo *et al.*,1998) (Sakai *et al.*, 2001) y de fitocromos (*phyB, phyB phyD phyE*) (Reed *et al.*, 1993; Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999), además de mutantes de la síntesis de auxinas (*sav-3*) (Tao *et al.*, 2008) y los mutantes de floración tardía (*ft, ft phyB, ft phyB phyD phyE*) (Strasser *et al.*, 2010), todos ellos en fondo genético Columbia.

3.2 Condiciones de cultivo y tratamientos con filtros.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en cajas plásticas transparentes (40 x 33mm^2, 15mm altura) conteniendo 4 ml de agar-agua al 0,8% (p/v), e incubadas por 5 días a 4º C en oscuridad para disminuir la dormición. Para inducir la germinación las semillas fueron expuestas a luz roja por 2 h, y luego incubadas en oscuridad por 24 h a 22º C. La semillas germinadas fueron transplantadas utilizando pipeta y agar-agua al 0.1% (p/v) en macetas cilíndricas (10mm de diámetro, 74mm de alto) conteniendo una mezcla de vermiculita, turba y perlita (partes iguales de verniculita y perlita, y la mitad de turba). Las plantas fueron cultivadas en un invernáculo bajo radiación natural en la mayoría de los experimentos. En algunos casos fueron cultivadas bajo filtros de acetato verde (Lee filters nº 089) o amarillo (Lee filters nº 101); esto se realizó con el propósito de distorcionar la señal normal de la relación R/RL y de la luz azul respectivamente. La relación R/RL fue de 0.24 debajo del filtro verde y la irradiancia de

luz azul fue de 4.7 $\mu m.m^{-2}.s^{-1}$ debajo del filtro amarillo comparado con 1.09 de R/RL y 62 $\mu m.m^{-2}.s^{-1}$ de luz azul bajo radiación natural de un día soledado medido al mediodía.

3.3 Diseño experimental:

En cada maceta se cultivó una única planta. Las mismas fueron colocadas en hileras formadas por 7 plantas, una a continuación de la otra, de manera tal que no quedase espacio entre una y otra maceta, definiendo un sistema de siembra rectangular (donde el espacio entre las plantas dentro de una misma hilera es mucho menor que el espacio entre plantas de distintas hileras) (figura 3.1.B). Para que las macetas quedasen seguras fueron colocadas sobre un soporte de poliestireno expandido (telgopor). Las plantas eran colocadas en las hileras cuando tenían el segundo par de hojas de manera tal que quedasen 2 hojas sobre la hilera de siembra (cuadrantes 1 y 3) y 2 hojas hacia el entresurco (cuadrantes 2 y 4) como se muestra en la figura 3.1.C. La variable utilizada para evaluar la disposición de las hojas en el plano horizontal se calculó de la siguiente manera: al número de las hojas que se ubicaban en el cuadrante 2 y 4 (figura 3.1.C) se lo dividió por el número de las hojas que se disponían en el cuadrante 1 y 3 (figura 3.1.C). Esta variable se halló para cada una de las 7 plantas de la hilera y el promedio de las mismas era lo que se graficaba. Cada hilera de siembra fue considerada una réplica. Si el resultado es 1 o cercano a 1 significa que las hojas se disponen al azar en el plano horizontal, mientras que si es mayor que 1 implica que las hojas se disponen mayormente hacia los laterales donde no tienen plantas vecinas.

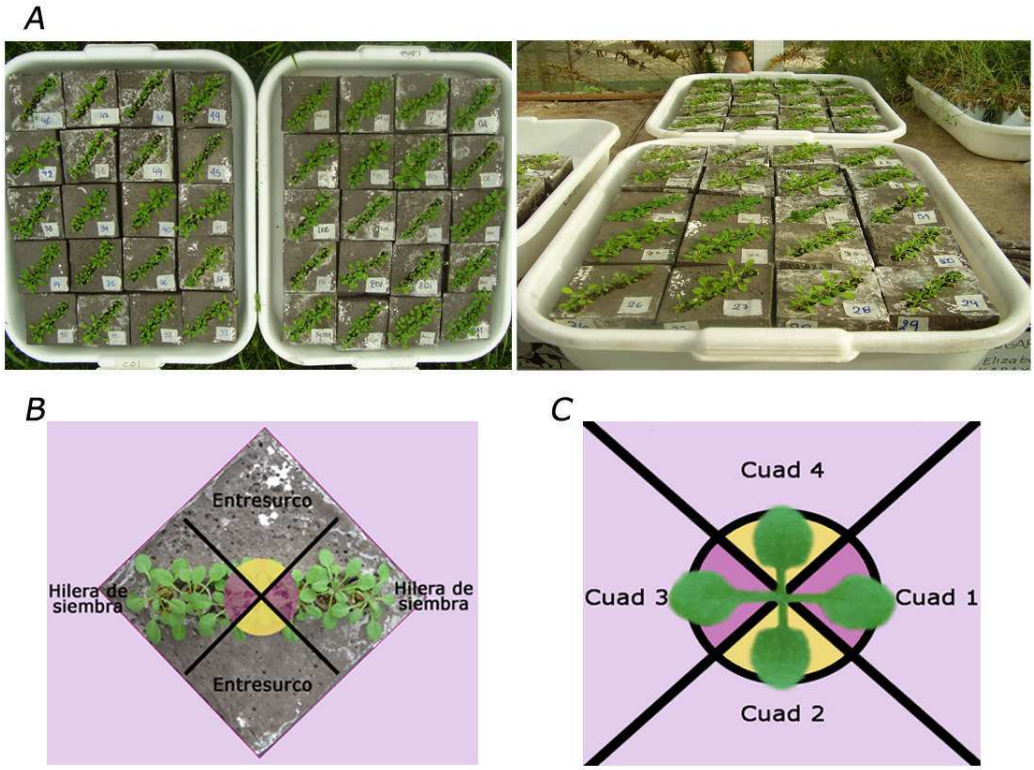


Fig. 3.1: (A) Fotos del diseño experimental. (B) Hilera de siembra. (C) Esquema de la distribución de las hojas en el plano horizontal.

3.4 Mediciones de las señales lumínicas.

La radiación fotosintéticamente activa (RAF), la relación entre las longitudes de onda de la luz roja y la luz roja lejana (R/RL), y la irradiancia de luz azul fueron medidas con el sensor SpectroSense2 meter, Skye Instruments LTD. El mismo cuenta con 4 canales (4 mm de diámetro) individuales que permiten sensar: la RAF, la luz R, la luz RL y la luz azul de manera independiente (ver figura 3.2.B). El patrón horizontal de la señal

lumínica generado por las plantas dentro de la hilera de siembra fue medida de la siguiente manera: Se colocó el sensor a 15 mm de la planta como se muestra en la figura 3.2.B en dirección a los 4 puntos cardinales (en la figura 3.2.A se muestra un esquema con la distribución de los puntos cardinales respecto de la hilera de siembra). Se midió con los cuatro canales en cada uno de los puntos cardinales, en dos condiciones: con planta y sin planta; luego se hallaron los valores relativos de irradiancia a la condición sin planta para el FAR, la relación R/RL y la intensidad de luz azul. Cada condición lumínica fue medida al mediodía al menos en 3 plantas cultivadas en hileras de siembra independientes.

Para describir el perfil vertical de la relación R/RL, azul y RAF generado por plantas de diferentes accesiones, en este caso L*er* y Col. Se procedió de la misma manera que se describe en el párrafo anterior, pero en este caso sólo se colocó el sensor al oeste de la planta a analizar como se muestra en la figura 3.2. El sensor fue fijado a diferentes posiciones verticales definidas desde la altura del suelo (las posiciones fueron marcadas cada 4 mm desde el suelo). Se analizaron 6 plantas de cada accesión provenientes de hileras independientes. Las mediciones fueron realizadas al mediodía.

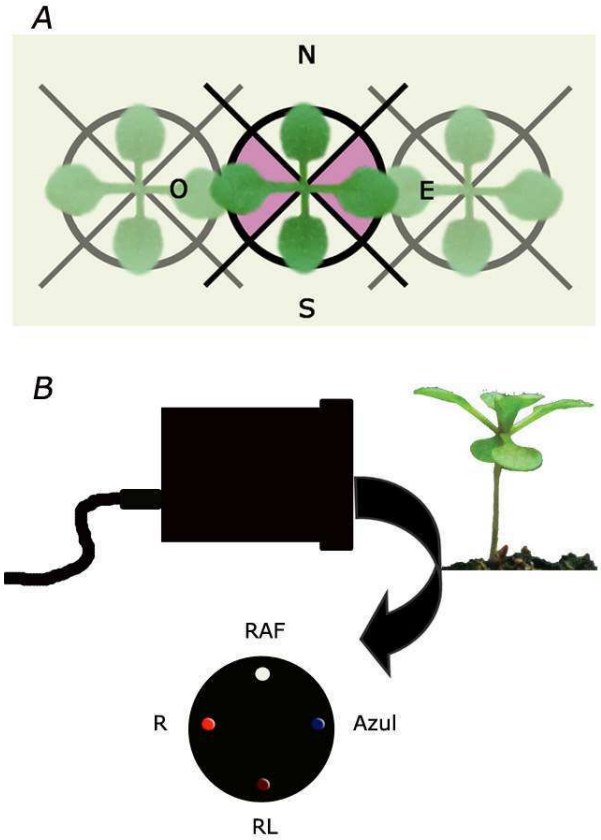


Fig. 3.2: (A) Esquema de la distribución de la hilera con respecto a los puntos cardinales. Nótese que al norte (N) y sur (S) las plantas no tienen plantas vecinas, pero al oeste y al este sí. (B) Esquema que muestra como el dispositivo se coloca horizontalmente frente a la planta que se analiza. Abajo se muestra un esquema de la distribución en el dispositivo de cada canal para las correspondientes longitudes de onda estudiadas.

3.5 Medición del patrón de ordenamiento espacial de las hojas en el tiempo.

Para evaluar si la respuesta de reordenamiento de las hojas de la roseta se debía a un cambio en la filotaxis de la planta o a un cambio en el crecimiento de las hojas se procedió de la siguiente manera: se colocaron plantas de la accesión Col en el diseño

experimental descripto en la sección 3.3, en ese momento (día 0), las plántulas tenían dos pares de hojas verdaderas, y a cada una de ellas se las ubicó en la hilera con dos hojas hacia la hilera y dos hojas hacia el entresurco como se muestra en el esquema de la figura 3.3.A. Partimos de que 2 hojas ubicadas en entresurco corresponde al 100% de hojas hacia el entresurco, y lo mismo para las hojas ubicadas hacia la hilera (ver figura 3.3). Se tomó un fotografía de cada hilera evaluada (8 hileras en 2 experimentos independientes) con una cámara digital CANON A590 IS (8MP, 4X), la foto fue tomada desde arriba con un ángulo de 90º. Al día siguiente se volvió a tomar una fotografía y se comparó la ubicación de las hojas con respecto al día anterior (ver el ejemplo del esquema de la figura 3.3.B), luego se re-calculó el porcentaje de hojas ubicadas en el entresurco y sobre la hilera de siembra de esas 4 hojas iniciales. Durante los 7 días siguientes se observó el crecimiento y redistribución de estas 4 hojas. Además, también se evaluó hacia dónde nacían las hojas nuevas, y este dato fue graficado como porcentaje del total de hojas de la roseta en función de los días. Esto mismo fue evaluado en 30 plantas aisladas usadas como control.

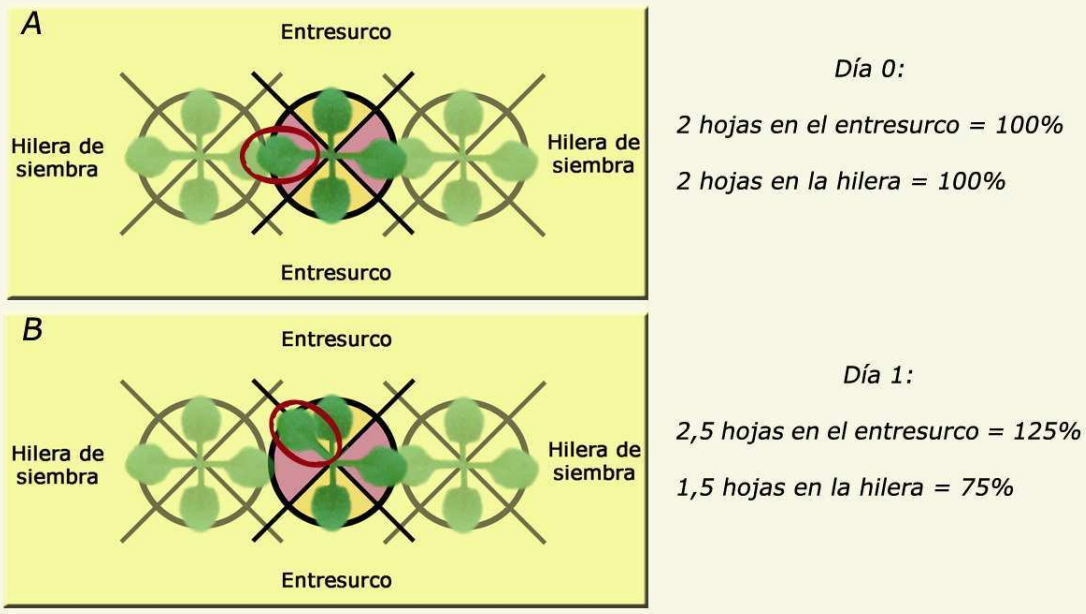


Fig. 3.3: Medición del patrón de ordenamiento espacial de las hojas en el tiempo.

3.6 Medición del auto-sombreado y sombreado mutuo de las plantas en la hilera.

Para comparar el índice de auto-sombreado en hileras de Col que acomodan las hojas hacia el entresurco e hileras de *sav-3* que acomodan sus hojas de manera aleatoria se fotografió desde arriba con un ángulo de 90º cada planta de la hilera por separado, con una cámara digital CANON A590 IS (8MP, 4X); en este momento las plantas llevaban 10 días de haber sido colocadas en la hilera de siembra (ej.: figura 3.4.C). Luego, se cortó cada hoja de la roseta de cada una de las plantas fotografiadas y se las pegó en una hoja blanca (figura 3.4.A) para luego ser escaneadas con un escáner Hewlett Packard SCANJET G2410. A continuación con el programa PhotoShop se borraron los pecíolos para concentrar el análisis en la lámina foliar (figura 3.4.B). En la fotografía de la planta individual se identificaron las hojas sombreadas (ver ej.: hojas 1, 2 y 3 en figura 3.4.C), en las hojas escaneadas se midió sólo el área sombreada de esas láminas foliares, también con el programa Photoshop. En el esquema de la figura 3.4.C se muestra como se borra la porción de la hoja que no está sombreada y sólo se usa para realizar el cálculo a la porción sombreada. El área sombreada dividida el área total de las láminas foliares (sin pecíolo) de la planta nos permitió estimar el índice de auto-sombreado por planta.

De manera similar se procedió para medir el índice de sombreado mutuo en hileras puras (plantas de la misma accesión). Se fotografió la hilera completa (a los 16 días de haberla armado) desde arriba formando un ángulo de 90º, con la misma cámara mencionada en el párrafo anterior. También se tomó una fotografía de las plantas por separado, además de escanear cada una de las hojas de la roseta. En la fotografía de la hilera se identificaron las láminas foliares sombreadas por la planta vecina (figura 3.4.D), luego con la ayuda de la foto individual se logró identificar en las hojas escaneadas las superficies foliares sombreadas por plantas vecinas. De la misma manera que se mencionó antes, con el programa Photoshop se calculó el área sombreada por las plantas vecinas. Ese dato fue dividido por el área total de las láminas foliares sin pecíolos (figura 3.4.B) de la planta, de esta manera se logró estimar el índice de sombreado mutuo por planta. En el esquema de la figura 3.4.D se muestra como se le borra con el programa

PhotoShop la porción de las hojas que no están sombreadas y sólo nos quedamos con la superficie sombreada por la planta vecina.

Para calcular el índice de área expuesta en hileras no puras, es decir con plantas mezcladas de diferentes genotipos (en este caso se intercalaron plantas de Col y *sav-3*), se tomó una fotografía de la hilera desde arriba como se describió en los párrafos anteriores. Luego, se calculó el área total expuesta. Por medio del programa PhotoShop se pudo discriminar entre el área expuesta de los diferentes genotipos, por ejemplo: en la hilera se borraron todas las plantas de Col y nos quedamos con el área expuesta de las plantas de *sav-3*. Luego al restar al área total expuesta, el área de *sav-3*, se obtuvo el área de Col expuesta. A esa área se la dividió por la cantidad de plantas del genotipo correspondiente y lo que se grafica es el área expuesta por planta.

También se estimó el índice de auto-sombreado de una manera más rápida y sencilla utilizando otra aproximación, se contó la cantidad de hojas superpuestas (o sea, las sombreadas) en una planta y a ese valor se lo dividió por el total de hojas de la roseta de esa misma planta. Se calculó esto en hileras puras de plantas Col cultivadas bajo radiación natural y se lo comparó con hileras de plantas Col cultivadas bajo un filtro amarillo, con hileras de mutantes de criptocromos y fototropinas y con plantas cultivadas aisladas de sus vecinas utilizadas como control.

3.7 Medición del peso de semillas en plantas adultas.

Las plantas fueron cultivadas de la misma manera que se describió en las secciones 3.2 y 3.3. Las semillas fueron recolectadas cada 3 o 4 días para evitar que se pierdan por dispersión. Luego de cosechar todas las semillas de la planta, se dejaron almacenadas durante 15 días en un envase con sílica a temperatura ambiente. Se pesaron en una balanza analítica con una precisión de 0.1 mg (OHAUS Explorer *Pro* EP114C). Se cuantificaron 35 plantas para cada genotipo procedentes de la hilera de siembra (en dos experimentos independientes), y 20 plantas para cada genotipo cultivadas aisladas de vecinas.

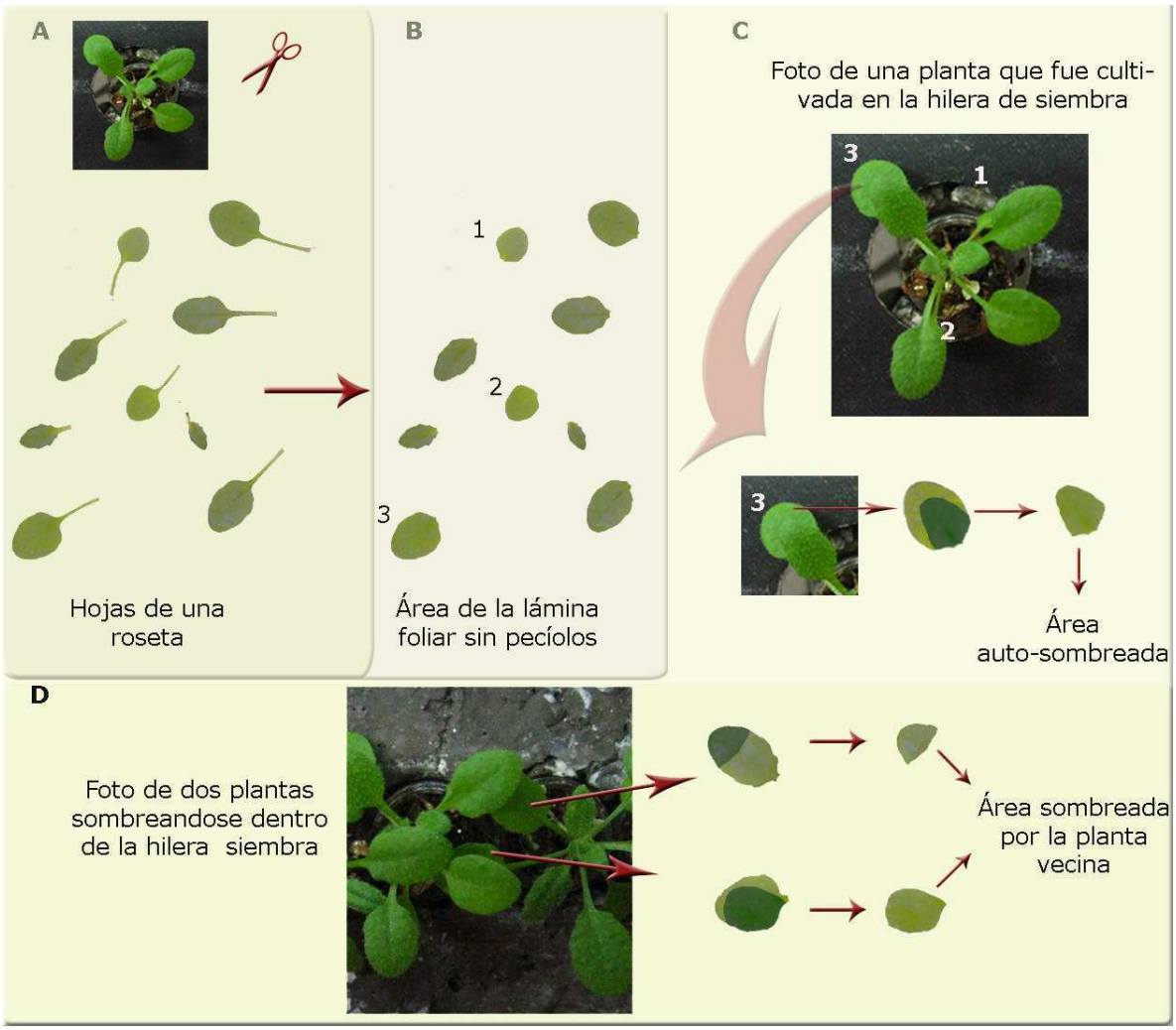


Fig. 3.4: Estrategia utilizada para evaluar el índice de auto-sombreado y de sombreado mutuo.

3.8 Diseño experimental para estudiar el efecto de la disminución de la luz azul en la orientación de las hojas.

Para evaluar si las hojas se disponían fuera de la hilera de siembra debido a que había mayor disponibilidad de luz azul se cultivaron plantas de la accesión Col en macetas (110 cm^3) conteniendo una mezcla de vermiculita, turba y perlita (partes iguales de verniculita y perlita, y la mitad de turba) en un invernáculo bajo radiación natural. Cuando las plantas tenían 2 pares de hojas se las colocaba a un grupo bajo un filtro de acetato amarillo (Lee filters nº 101) para disminuir la irradiancia de luz azul que llega a las hojas, y al otro grupo bajo un filtro de acetato transparente usado como control. Estos filtros sólo cubrian la mitad de la planta, la otra mitad recibía la radiación natural (figura 3.5). Antes de que las plantas pasen de su estadio vegetativo al estadio reproducctivo se contaba el número de hojas localizadas en cada cuadrante (figura 3.5.B). Al número de hojas ubicadas en el cuadrante 4, se lo dividía por el número de hojas localizadas en los cuadrantes 1, 2 y 3. Éste es el valor que se comparaba en cada tratamiento, cuando menor era nos indicaba que más hojas se alejaban de la señal más baja de luz azul.

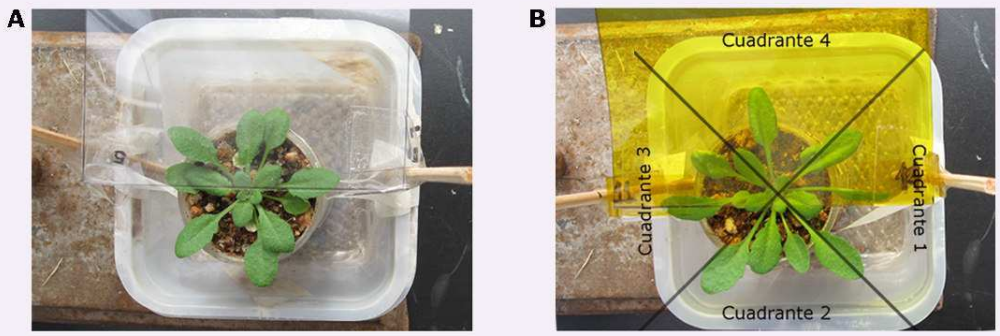


Fig. 3.5: Diseño experimental para estudiar la orientación de las hojas. (A) Plantas que se usaron como control con un filtro transparente. (B) Plantas con un filtro amarillo que disminuye la señal de luz azul. Aquí se esquematizaron los cuatro cuadrantes. Ambas plantas son del ecotipo Col.

3.9 Análisis estadístico.

Para los experimentos en que se estudió la disposición de las hojas en el plano horizontal se promediaron los valores obtenidos para cada planta dentro de la hilera de siembra. Cada hilera de siembra fue considerada una réplica. En cada experimento se midieron al menos 3 réplicas y el mismo fue repetido en dos ocasiones (o sea que se midieron 42 plantas como mínimo). En los casos que se utilizaron plantas aisladas como control, cada planta fue considerada una réplica, y se midieron al menos 5 por experimento.

En los experimentos en que se estudió el patrón de desarrollo de las hojas a través del tiempo lo que se promedió fue el valor de cada planta. Se realizaron 2 experimentos independientes, donde se evaluaron 15 plantas cultivadas aisladas y 28 plantas cultivadas en hileras en cada uno de los experimentos. Cuando se evaluó la superposición de hojas en una misma planta también se tomó como réplica a cada planta. Los datos corresponden a 4 experimentos independientes donde se midieron 135 plantas cultivadas en sistemas de siembra rectangular y 34 plantas aisladas en el genotipo salvaje. También se tomó como réplica a cada planta cuando se midió el índice de auto-sombreado, sombreado mutuo y el peso de semillas.

Para evaluar el nivel de significancia de las diferencias encontradas entre plántulas mutantes y WT se utilizó una prueba de ANVA de un factor, seguido del test de comparación múltiple de Dunett's, donde se comparó el genotipo WT con cada uno de los mutantes cultivados en sistemas de siembra, la misma prueba se utilizó para comparar las plántulas de la accesión Col cultivadas en sistemas de siembra bajo radiación natural con aquellas cultivadas de manera aislada o en sistemas de siembra bajo los distintos filtros. En el resto de los casos se realizó una prueba *t* de Student. Para realizar estas pruebas como para los análisis de distribución de frecuencias se utilizó el programa GraphPad/Prism. La prueba de Fisher's se realizó con el programa Quick Calcs GraphPad.

4 RESULTADOS - CAPÍTULO I

4.1 Análisis del origen evolutivo de la respuesta de disposición de las hojas a la calidad de luz típica de cultivos.

Para poner a prueba la primer hipótesis en la que decíamos que la capacidad de respuesta de reordenamiento de las hojas en plantas cultivadas en sistemas de siembra rectangulares, es en realidad consecuencia de la presión de selección por rendimiento en líneas de plantas de interés agrícola por parte del hombre, se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* dado que esta especie no fue seleccionada por rendimiento en sistemas de siembra rectangulares. El maíz, en cambio, es una especie de uso comercial que ha sido cultivada durante muchas generaciones en sistemas rectangulares de siembra. Se evaluó la respuesta de disposición de las hojas en dos accesiones: Columbia y Landsberg *erecta*. Las plántulas fueron cultivadas en un invernáculo bajo radiación natural en un sistema de siembra rectángular como el que se describe en materiales y métodos (3.3). Antes de que las plantas pasasen del estado vegetativo al reproductivo se evaluó como se disponían las hojas de la roseta en el plano horizontal de la siguiente manera: Al número de hojas que se localizaban en el cuadrante 2 y 4 (figura 4.1.A) se lo dividió por el número de hojas que se ubicaban en el cuadrante 1 y 3 (figura 4.1.A) y este dato es el que se grafica en el eje de ordenadas de la figura 4.1.B. En ambas accesiones se pueden observar valores mayores a 1, con un intervalo de confianza (IC) entre 1.22 y 1.59 para L*er* y un IC entre 1.35 y 1.61 para Col. A partir de estos resultados podemos decir que las hojas se acomodan preferencialmente hacia los laterales (entresurco) donde no tienen plantas vecinas (ver esquema de la figura 4.1.A y sección 3.3). En la figura 4.1.C se puede observar la disposición de las hojas de una planta cultivada aislada de vecinas y compararla con la de una planta que fue cultivada en la hilera de siembra. Cuando las plantas Col fueron cultivadas individualmente sus hojas se disponían aleatoriamente en el plano horizontal (figura 4.1.C izquierda), dando valores cercanos a 1 (figura 4.1.C derecha).

Dado que en ambas accesiones de Arabidopsis se observó esta respuesta de reordenamiento de las hojas hacia el entresurco, rechazamos la hipótesis de que esta capacidad de disposición de las hojas tiene un único origen: la selección por rendimiento en sistemas rectangulares por parte del hombre.

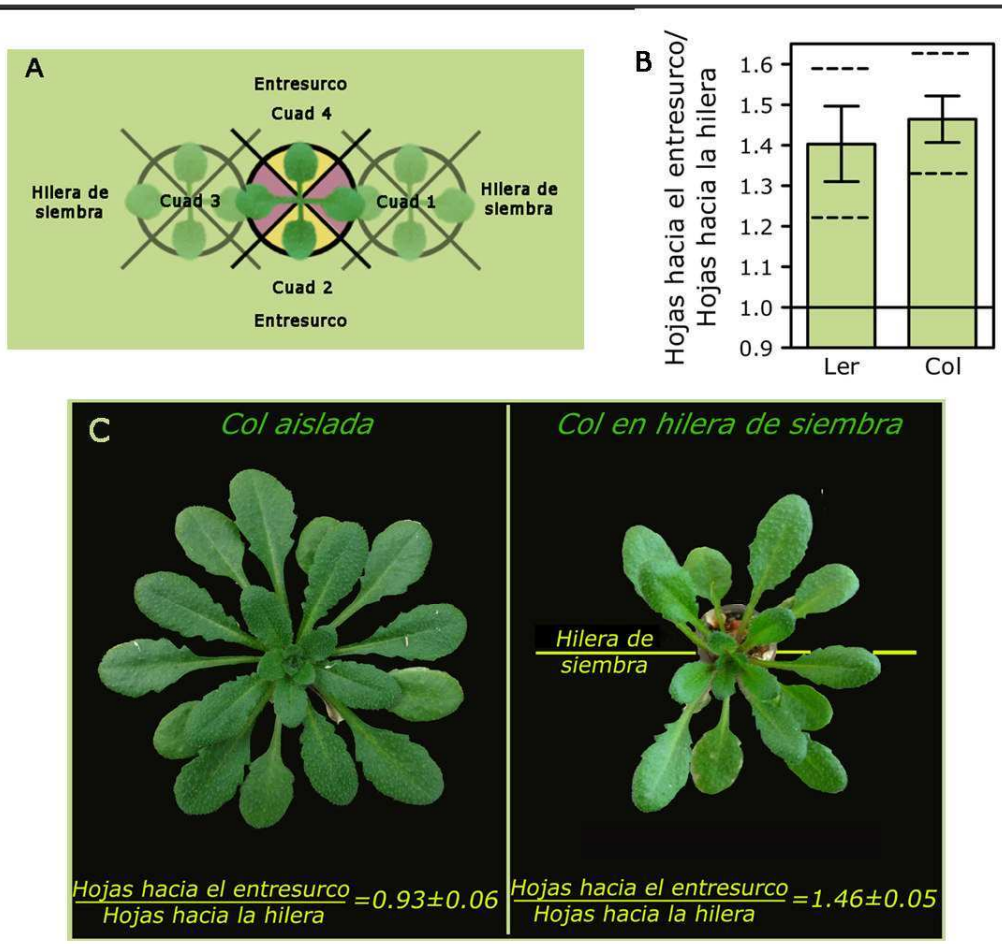


Fig. 4.1: (A) Esquema de la distribución de las hojas en el plano horizontal. (B) Disposición relativa de las hojas de la roseta en los ecotipos Ler y Col. En el eje de ordenadas se grafica el promedio de las hojas que se encuentran en el cuadrante 2 y 4 (panel A) dividido el promedio de las hojas que se encuentran en el cuadrante 1 y 3 (panel A). Los datos son el promedio y error estándar de al menos 6 réplicas. (C) Fotos de una planta del ecotipo Col aislada y de una planta en la hilera de siembra. Los datos son el promedio y el error estándar de al menos 17 plantas.

Estos resultados demuestran que las plantas poseen la capacidad intrínseca de responder de esta manera cuando son expuestas a determinadas condiciones de cultivo, pero no descartan la posibilidad que en maíz la selección en sistemas rectangulares haya favorecido los patrones de distribución de hojas observados por Maddonni *et al* (2002).

Una hipótesis alternativa es que el cultivo de plantas homogéneas en sistemas de alta rectangularidad espontáneamente favorece la disposición de las hojas hacia el entresurco. Para evaluar esta hipótesis se utilizaron dos aproximaciones experimentales como origen de la heterogeneidad: el genotipo y el tamaño de la planta.

4.2 La capacidad de disponer las hojas hacia el entresurco se observa al cultivar plantas del mismo genotipo:

Se sembraron distintas accesiones (L*er*, Col, Cvi, RLD, SHA, BAY, Nossen) en el diseño experimental descripto y se comparó cómo se disponían las hojas de la roseta en el plano horizontal entre líneas de siembra que contenían plantas del mismo genotipo (accesiones puras) y líneas de siembra donde los genotipos se colocaron al azar (accesiones al azar). Cuando las plantas cultivadas en una hilera correspondían a accesiones puras, éstas orientaron sus hojas hacia los laterales donde no había plantas vecinas (figura 4.2.A). En cambio, cuando se cultivaron en combinaciones al azar plantas de distintas accesiones, éstas distribuyen sus hojas de manera aleatoria en el plano horizontal, obteniendo valores cercanos a 1 (figura 4.2.A). Para que se observe el reordenamiento de hojas en dirección del entresurco deben existir relaciones de parentesco muy estrechas, ya que en las accesiones al azar se trata de todos individuos de una misma especie y la respuesta no se manifiesta.

4.3 La capacidad de disponer las hojas hacia el entresurco se observa al cultivar plantas del mismo tamaño:

Se sembraron con una semana de diferencia dos grupos de semillas de la accesión *Ler* en las mismas condiciones experimentales antes mencionadas. Las plantas fueron cultivadas en una cámara de luz blanca enriquecida con luz RL con un fotoperíodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se comparó cómo se disponían las hojas de la roseta en el plano horizontal entre bandejas que contenían plantas coetáneas sembradas el mismo día y bandejas donde se alternaron las plántulas según la fecha de siembra para conseguir distintos tamaños como se muestra en la figura 4.2.C. Los resultados (figura 4.2.B) muestran que los grupos de plantas de igual tamaño disponen las hojas fuera de la hilera de siembra (valores en el eje de ordenada mayores a 1), mientras que los grupos donde se alternan los tamaños tienden a distribuir sus hojas al azar (valores cercanos a 1). Un análisis detallado de la disposición de las hojas en las plantas no coetáneas cultivadas en la misma hilera de siembra demuestra que tanto las plantas de menor tamaño como las de mayor tamaño reordenan sus hojas de manera aleatoria en el plano horizontal; dando valores cercanos a 1 en ambos casos.

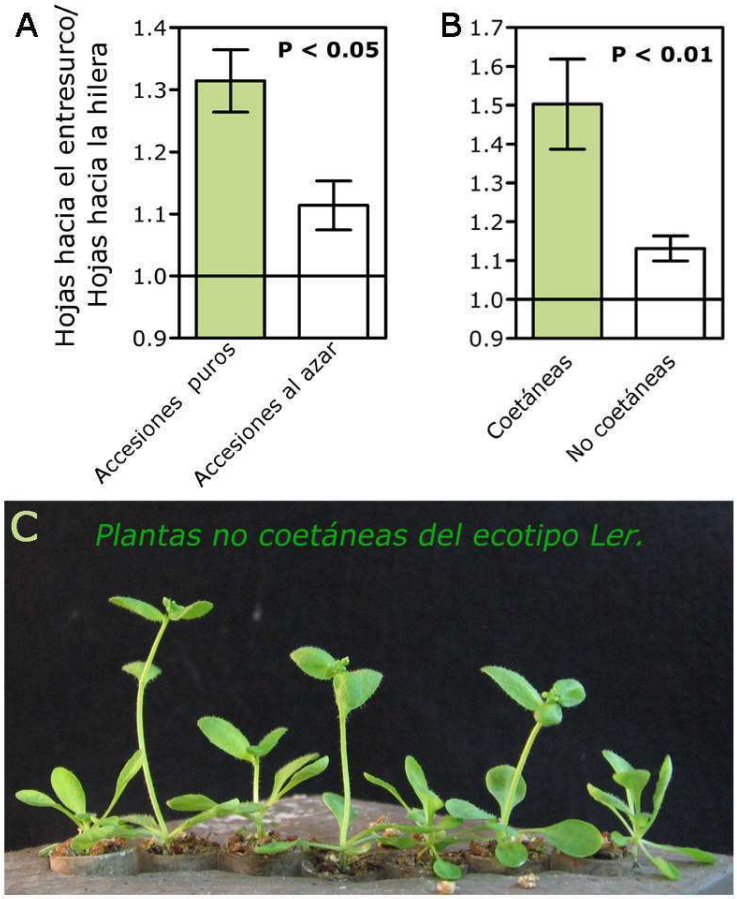


Fig. 4.2: (A) Disposición de las hojas en el plano horizontal de las siguientes accesiones: Ler, Col, Cvi, RLD, SHA, BAY, Nossen. (B) Disposición de las hojas en plantas coetáneas vs. plantas no coetáneas del ecotipo Ler. En ambos, se grafica el promedio de las hojas que se encuentran en el cuadrante 2 y 4 dividido el promedio de las hojas que se encuentran en el cuadrante 1 y 3 (fig. 4.1.A). Los datos son el promedio de al menos 5 réplicas. (C) Foto de una hilera de siembra de plantas no coetáneas del ecotipo Ler.

Esto último demuestra que la homogeneidad en el cuerpo de la planta es un factor clave para el desarrollo de este patrón de disposición de las hojas hacia el entresurco.

4.4 Señal que permite el reconocimiento de individuos dentro de la hilera.

Se ha demostrado que para que las hojas se dispongan hacia el entresurco cuando se cultivan plantas en sistemas de siembra rectangular, éstas deben ser genéticamente iguales (ver en la sección 4.2), pero además debe existir homogeneidad en el cuerpo de las mismas (ver en la sección 4.3). A partir de estos resultados podemos decir que existe un reconocimiento de individuos de la misma camada y que la estructura área es un factor clave para dicha respuesta, dado que las plantas eran cultivadas en macetas

individuales que impedían el reconocimiento subterráneo. Los trabajos de Murphy y Dudley (2009) y Dudley y File (2007) mencionan que es necesario que exista interacción entre raíces para el reconocimiento entre parientes, sin embargo, en nuestro diseño experimental las raíces no interaccionan. Dado que por los resultados obtenidos hasta el momento, todo indicaría la existencia de un reconocimiento de individuos emparentados, y con la misma estructura corporal, nos preguntamos cuál sería la señal que permite este reconocimiento. Como la estructura aérea es un factor clave, decidimos estudiar que ocurre con el perfil vertical de la relación R/RL al comparar plantas de distintas accesiones: Col y L*er.* Al observar el perfil vertical de la relación R/RL encontramos una notable diferencia entre Col y L*er* (figura 4.3), que depende de la estructura morfológica de la planta. Se observan valores mínimos de la relación R/RL en las posiciones de follaje más densos y el perfil cambió notablemente entre individuos con diferente estructura corporal. Estos resultados nos hacen pensar que los individuos reconocen a sus vecinos emparentados por medio del perfil lumínico que ellos generan.

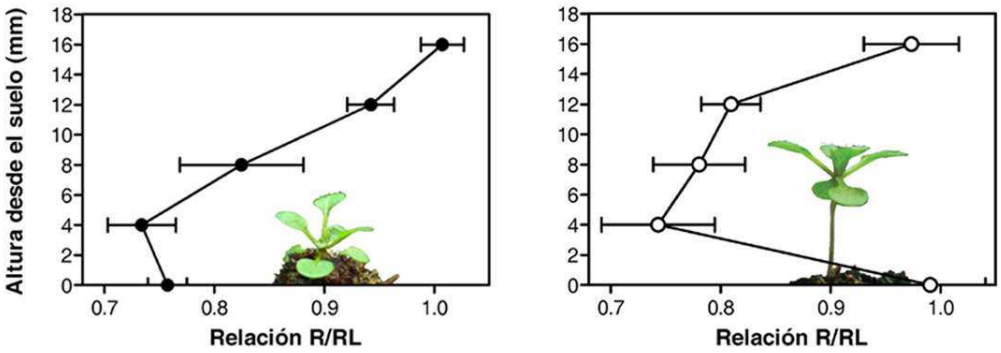


Fig. 4.3: Perfil vertical de la relación R/RL.

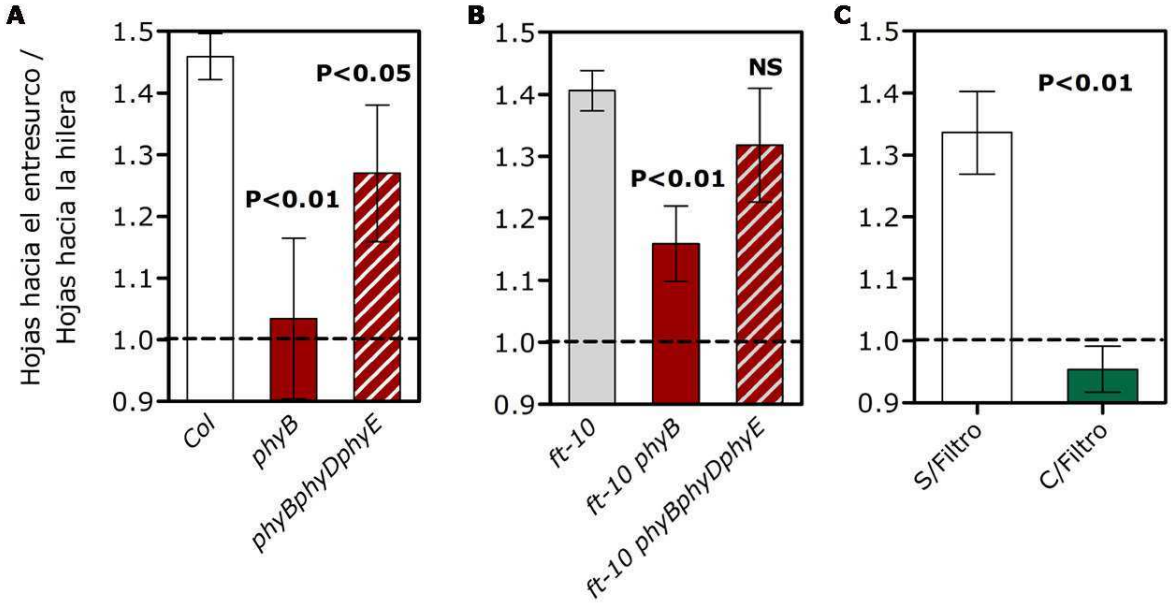
4.4.1 El rol de los fitocromos en el reconocimiento de parientes.

Dado que las plantas cultivadas en una hilera de siembra generan patrones de la relación R/RL que al igual que la respuesta de reordenamiento dependen de la morfología de la planta, es posible pensar en una relación causal entre ambos. Las reducciones en la relación R/RL son percibidas por los fitocromos B, D y E (Yanovsky *et al.*, 1995; Devlin *et al.*, 1998; Devlin *et al.*, 1999). Entonces, usamos mutantes de *phyB* y el triple mutante *phyB phyD phyE* para evaluar el rol de esta señal en el reconocimiento de parientes. En el mismo diseño experimental descripto antes se cultivaron plantas de *phyB, phyB phyD phyE* y Col usada como control para estudiar como disponían las hojas en el plano horizontal. En la figura 4.4.A podemos observar que los mutantes *phyB* fallan en acomodar sus hojas en respuesta a sus vecinos parientes, obteniendo valores cercanos a 1; estos resultados son significativamente diferentes al control pero no podemos dejar de mencionar la gran dispersión encontrada. En el triple mutante *phyB phyD phyE* se observó una respuesta intermedia con un alto grado de dispersión, pero significativa al compararla con el genotipo salvaje.

Dado que las mutantes *phyB* y *phyB phyD phyE* florecen temprano produciendo pocas hojas, evaluamos las respuestas de reordenamiento de hojas en el doble mutante *phyB ft-10* y en el cuádruple mutante *phyB phyD phyE ft-10*. *FT* es un gen involucrado en la vía de floración, las plantas que tienen mutado este gen florecen más tarde, esto nos permitió evaluar el rol de los fitocromos B, D y E en plantas cuyas rosetas eran semejantes al control, y así reducir el ruido que puede estar generando en los datos la estructura propia de la roseta de los mutantes estudiados. Los resultados de la figura 4.4.B muestran que el doble mutante *phyB ft10* difiere significativamente del control *ft*, no así el cuádruple mutante *phyB phyD phyE ft10*. Los resultados son en líneas generales similares a los observados en ausencia de la mutación *ft*, de modo que no parece haber una distorsión causada por la floración temprana. El phyB es entonces necesario para la respuesta de reordenamiento de las hojas. El cuádruple mutante *phyB phyD phyE ft10* fue capaz de reordenar sus hojas a pesar de carecer no sólo de phyB, sino también de phyD y phyE. Una posible interpretación es que al tener pecíolos muy alargados (ver figura 4.4.G) este mutante reordene sus hojas no por percepción de señales de luz, sino

como consecuencia del contacto físico de las mismas y su consecuente exclusión fuera de la hilera.

A continuación se decidió evaluar por otra metodología si esta respuesta de reordenamiento de las hojas era una consecuencia de la percepción diferencial de la relación R/RL. Para ello se cultivaron plantas de la accesión Col en un invernáculo bajo radiación natural, un grupo de plantas creció bajo un filtro de acetato verde que genera un ambiente empobrecido en R; por lo tanto, con bajas relaciones R/RL y otro grupo se usó como control sin filtro. Cuando las plantas de Col fueron cultivadas con bajas relaciones R/RL (bajo el filtro verde), éstas no acomodaban sus hojas hacia los laterales como ocurría con las plantas de Col cultivadas bajo radiación natural sin filtro (figura 4.4.C). Esto indica que al distorsionar mediante filtros los gradientes de relación R/RL, las plantas no pueden percibir correctamente a sus vecinas. De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que esta respuesta estaría iniciada por la percepción diferencial de la relación R/RL. Las respuestas a la relación R/RL son reguladas exclusivamente por los fitocromos B, D y E, todos actuando juntos de manera redundante y en la misma dirección (Franklin *et al.*, 2003).



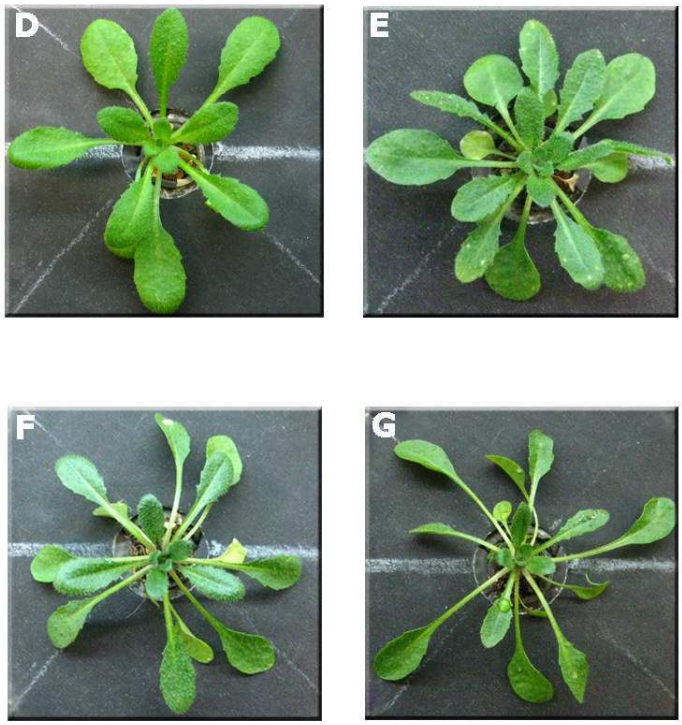


Fig. 4.4: Disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas cultivadas en un sistema de siembra rectangular. (A-B) Evaluación de esta respuesta en distintos genotipos. Los datos graficados en el eje de ordenadas corresponden al promedio de al menos 4 réplicas. (C) Evaluación de la disposición de las hojas en plantas del ecotipo Col cultivadas en hileras sin filtro (barra blanca) y en hileras bajo el filtro verde (barra verde). Los datos que se grafican en el eje de ordenadas corresponden al promedio de al menos 5 réplicas. En todos los gráficos el valor numérico que se grafica en el eje de ordenadas se obtuvo como fue descripto en la sección 3.3 de materiales y métodos. (D-G) Fotos donde se muestra la distribución de las hojas en el plano horizontal de los distintos genotipos utilizados. Col (D), *ft-10* (E), *ft-10 phyB* (F) y *ft-10 phyB phyD phyE* (G). Todos los genotipos mutantes estan en fondo genético Columbia.

4.5 Patrones de crecimiento y su relación con la síntesis de auxinas.

Las plantas que son cultivadas en hilera presentan patrones de crecimiento bien definidos y muy diferenciados respecto a las plantas que son cultivadas de manera aislada, como por ejemplo: hojas que presentan una curvatura muy marcada en el pecíolo, que le permite a la planta cambiar la dirección de sus láminas foliares evitando el sombreado por plantas vecinas e interceptar mayor irradiancia de luz; como también hojas que disponen su lámina foliar de manera perpendicular al plano horizontal evitando interferir con sus vecinas (figura 4.5).

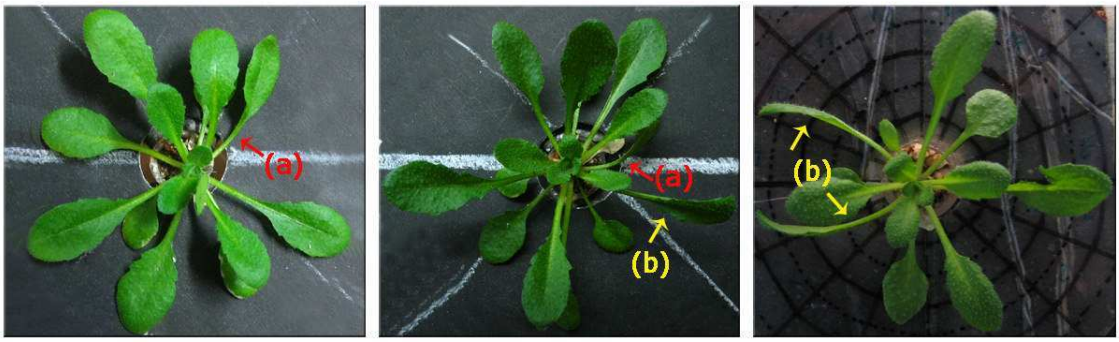


Fig. 4.5: Patrones de crecimiento de las hojas en plantas del ecotipo Col cultivadas en hileras. Las flechas rojas (a) muestran como las hojas curvan el pecíolo, las flechas amarillas (b) muestran como las láminas foliares se disponen perpendiculares al plano horizontal.

De acuerdo con estas observaciones en el patrón de crecimiento de las hojas y dado que las auxinas son hormonas que regulan múltiples aspectos en el desarrollo y crecimiento de las plantas y son requeridas para las respuestas a las señales de R/RL generada por las plantas vecinas, decidimos evaluar si la vía de señalización de auxinas estaría involucrada en esta respuesta de orientación de las hojas hacia el entresurco. Para ello, se evaluó esta respuesta en el mutante de síntesis de auxinas *sav-3* (Tao *et al.*, 2008) en las mismas condiciones descriptas anteriormente en materiales y métodos, sección 3.3. Los resultados de la figura 4.6.A muestran que los mutantes de síntesis de auxinas presentan valores cercanos a 1 en el eje de ordenadas. A partir de estos

resultados podemos concluir que la señalización a través auxinas también estaría mediando esta respuesta.

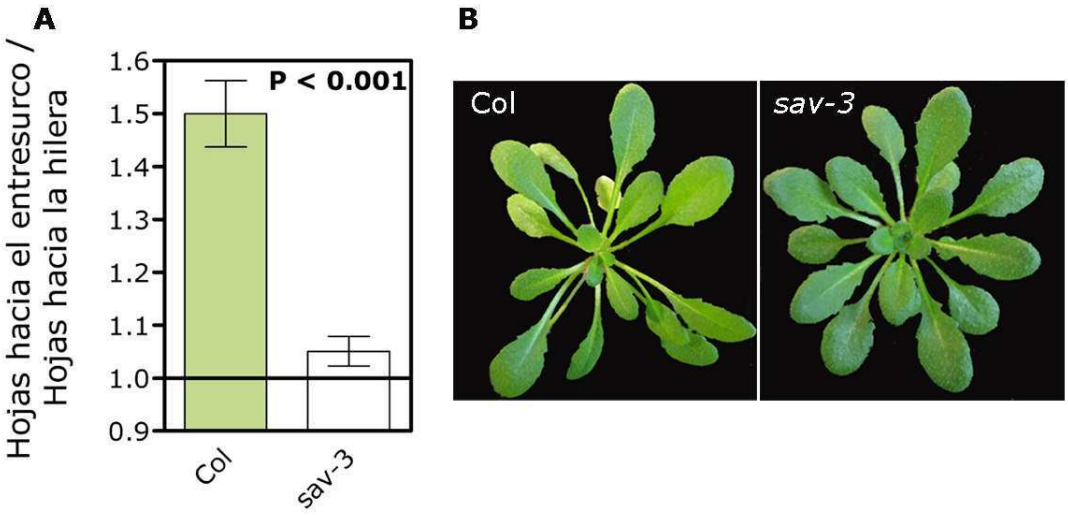


Fig. 4.6: (A) Disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas cultivadas en un sistema de siembra rectangular. Los valores graficados en el eje de ordenadas corresponden al promedio de al menos 7 réplicas, y fueron obtenidos como se describe en la sección 3.3 de materiales y métodos. En el eje de abcisas se grafican los genotipos utilizados. (B) Fotos ilustrativas de la disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas que fueron cultivadas en hileras de siembra.

4.6 Estudio de las consecuencias del reconocimiento de parientes.

Otro de los patrones observados en las plantas cultivadas en hileras era que sus hojas a menudo se superponían, como se muestra en las fotos de la figura 4.7. Nótese que las hojas más antiguas escapan de la hilera de siembra mediante la curvatura de sus pecíolos (figura 4.7 B), y luego son sombreadas por hojas más jóvenes de la misma planta (figura 4.7.A); quedando espacio en la hilera de siembra donde se acomoda una hoja de una planta vecina.

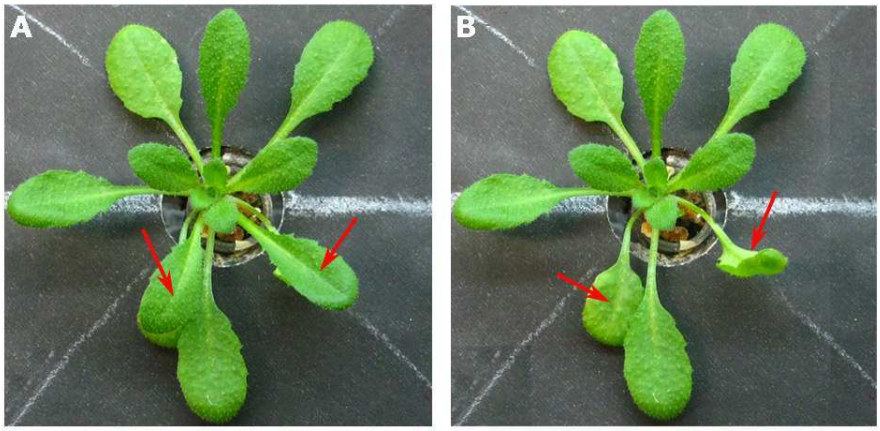


Fig. 4.7: Fotos de una planta del ecotipo Col cultivada en hileras de siembra donde se muestra como se superponen las hojas. (A) Las flechas rojas indican como las hojas más jóvenes cubren a las más antiguas. (B) Se muestra la posición de las hojas más antiguas luego de cortar las hojas más jóvenes. Nótese la curvatura de los pecíolos, si las hojas no se hubiesen doblado se ubicarían sobre la hilera de siembra (línea blanca gruesa)

A partir de estas observaciones surgió la siguiente pregunta: ¿Tiene algún costo para la planta reacomodar sus hojas hacia el entresurco donde hay mayor disponibilidad de luz? Para intentar responder esta pregunta se estudió el índice de auto-sombreado y de sombreado mutuo en plantas cultivadas en hileras del genotipo salvaje Col y se lo comparó con el mutante *sav-3.* Dado que el mutante *sav-3* es prácticamente indistinguible morfológicamente del genotipo salvaje bajo nuestras condiciones experimentales, este mutante provee una excelente herramienta para investigar cuáles son las consecuencias del reconocimiento entre individuos emparentados. Para realizar este estudio se procedió como se describe en la sección 3.6 de materiales y métodos. En la figura 4.8 podemos observar que las hileras de vecinos del genotipo salvaje mostraron un incremento en el índice de auto-sombreado (panel A) y una disminución en el sombreado mutuo (panel B) al compararlas con las hileras de *sav-3*, que no acomodan sus hojas hacia los laterales. Entonces, el hecho de acomodar las hojas hacia los laterales podría estar favoreciendo a aquellos individuos que desarrollan esta respuesta. Ya que en este caso, Col a través del auto-sombreado reduce (en 4.1% comparado con *sav-3*) la

exposición a la luz de las hojas basales (aquellas más antiguas que han reducido su capacidad fotosintética), mientras que el sombreado mutuo, mayor en *sav3*, reduce la exposición de las hojas más jóvenes con mayor capacidad fotosintética. Aquellas plantas como *sav-3* que no desarrollan la respuesta de acomodar las hojas hacia los laterales reducen la exposición de sus hojas más jóvenes a través del sombreado mutuo en un 7.8% si se lo compara con Col. A partir de estos resultados podemos decir que el costo que se genera por el auto-sombreado es rápidamente compensado por el reducido sombreado mutuo para las plantas de Col.

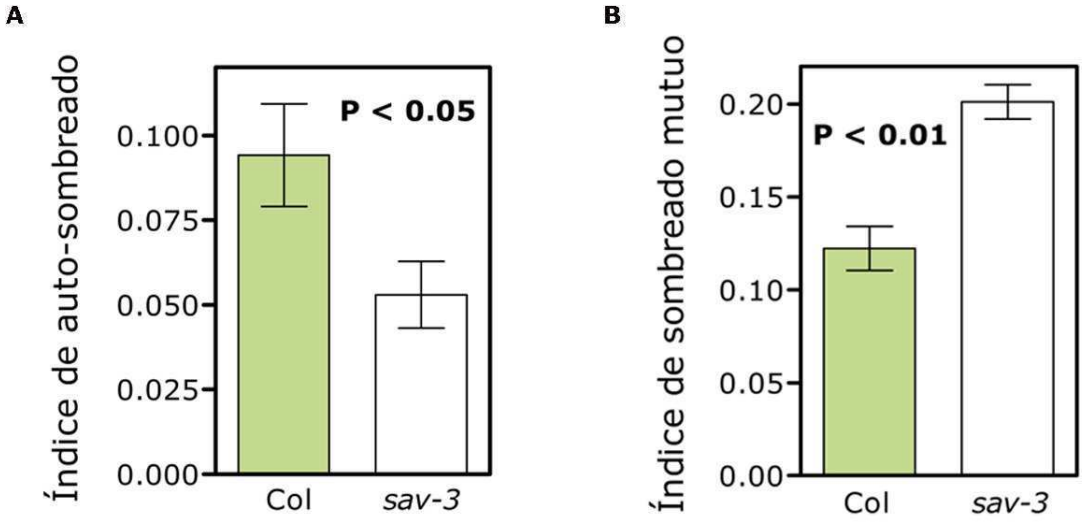


Fig. 4.8: (A) Índice de auto-sombreado. El valor graficado en el eje de ordenadas corresponde al promedio de 15 plantas analizadas para cada genotipo. (B) Índice de sombreado mutuo. El valor graficado en el eje de ordenadas corresponde al promedio de 20 plantas analizadas para cada genotipo. La obtención de estos valores está descripto en la sección 3.6.

A continuación nos preguntamos si este comportamiento en las plantas que reconocen a sus vecinos emparentados y acomodan sus hojas evitando sombrearse entre ellas tendría un efecto en el *fitness* de las mismas. Para responder a esta pregunta se cosecharon semillas de plantas cultivadas en hileras puras del genotipo salvaje y del mutante *sav-3*, como se indica en la sección 3.7 de materiales y métodos. Como control se cultivaron plantas de ambos genotipos de manera aislada. En la figura 4.9 podemos observar que no hay diferencias en el peso de las semillas por planta entre Col y *sav-3* cultivadas en hileras, las plantas control se comportan de la misma manera, pero sí se observan diferencias significativas en ambos genotipos entre las plantas dentro de una hilera de siembra y las plantas aisladas, lo cual es esperable; ya que las plantas aisladas no compiten con sus vecinas por el recurso lumínico. Estos resultados no evidencian consecuencias del reacomodamiento de las hojas sobre el *fitness* de las plantas de una hilera.

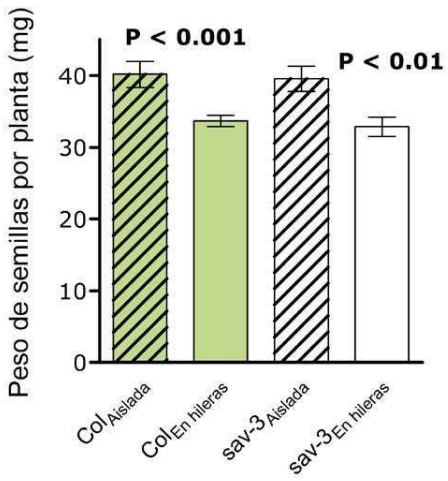


Fig. 4.9: Índice de rendimiento. En el eje de ordenadas se grafica el promedio del peso de las semillas por planta. Se promediaron al menos 34 plantas cultivadas en las hileras de siembra y 15 plantas cultivadas de manera aislada. El valor P que se muestra en la figura surge de realizar la prueba t de Student entre plantas dentro de la hilera y aquellas que fueron cultivadas de manera aislada para cada genotipo.

Sin embargo, un análisis más detallado considerando el sombreado mutuo y la producción de semillas planta por planta en lugar de tomar las plantas dentro de la hilera

en su conjunto, resultó esclarecedor. En efecto, la figura 4.10.A muestra la distribución de frecuencias de distintos grados de sombreado mutuo.

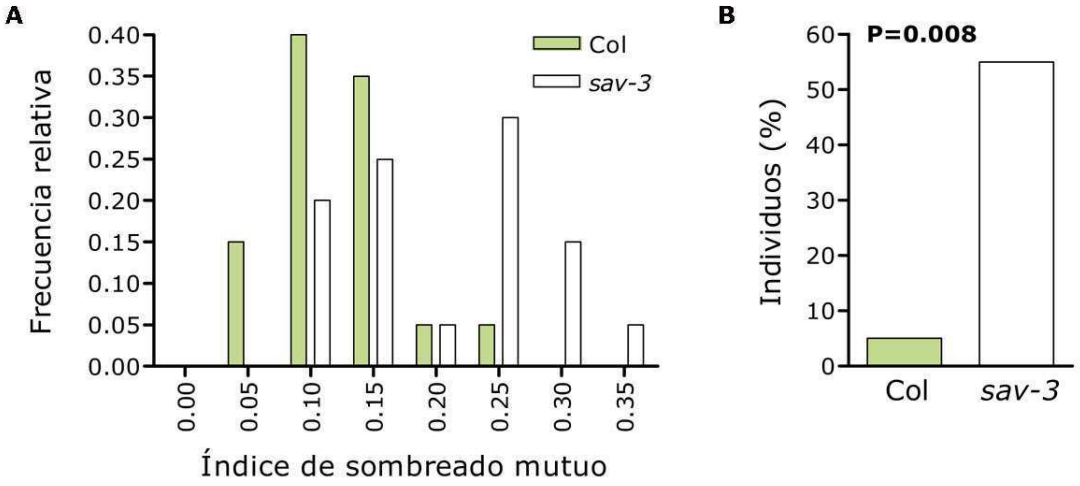


Fig. 4.10: (A) Distribución de frecuencias de los individuos dentro de una hilera de siembra en función del índice de sombreado mutuo. Para realizar este análisis se utilizó el programa GraphPad Prism4. (B) Proporción de plantas que se encuentran sombreadas más de un 20% de su área foliar. Se utilizó el test de Fisher´s para analizar el grado de significancia.

El 55% de los individuos *sav-3* presentan más de un 20% de su área foliar sombreada por sus vecinos, mientras que sólo el 5% de plantas de Col se encuentran más de un 20% sombreadas (figura 4.10.B). A partir de estos resultados decidimos analizar si este comportamiento a nivel individual tenía repercusiones en el *fitness* individual de las plantas dentro de una hilera. Para ello se realizó un análisis de la distribución de frecuencias de los individuos dentro de la hilera y de las plantas cultivadas de manera aislada en función del peso de la semilla. (Figura 4.11). De un análisis de proporciones surge que casi un 15% de las mutantes *sav-3* tienen un peso de semilla por planta por debajo de los 25mg, sin embargo no hay plantas de Col por debajo de esos valores (figura 4.9.B). En la figura 4.9.C se muestra la distribución de frecuencias en

función del peso de las semillas para las plantas cultivadas de manera aislada, en este caso no se observan valores menores a 25mg para ninguno de los genotipos.

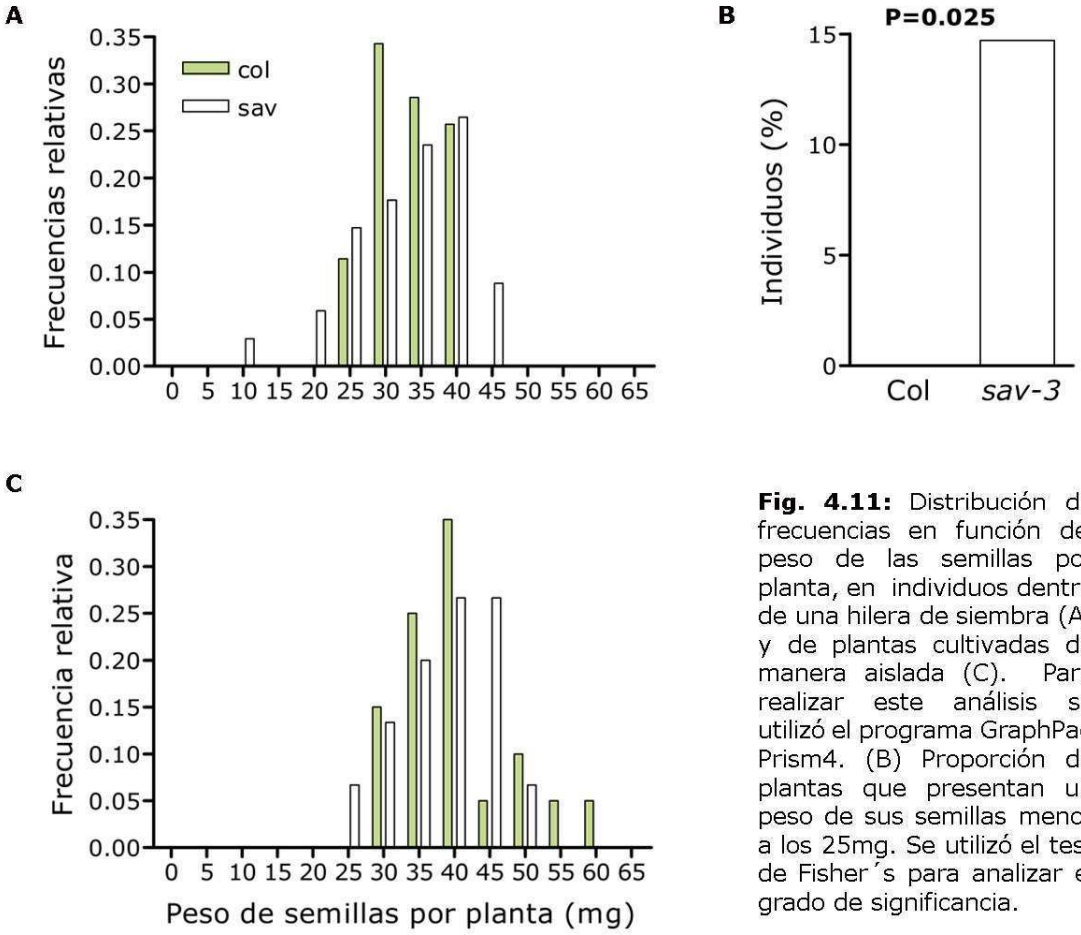


Fig. 4.11: Distribución de frecuencias en función del peso de las semillas por planta, en individuos dentro de una hilera de siembra (A) y de plantas cultivadas de manera aislada (C). Para realizar este análisis se utilizó el programa GraphPad Prism4. (B) Proporción de plantas que presentan un peso de sus semillas menor a los 25mg. Se utilizó el test de Fisher´s para analizar el grado de significancia.

A continuación estudiamos que ocurría con el reordenamiento de las hojas cuando las plantas del genotipo salvaje y la mutante se mezclaban dentro de una hilera de siembra. Las plantas Col acomodaron sus hojas hacia afuera de la hilera, mientras que *sav-3* ordenaron sus hojas de manera aleatoria, (figura 4.12.A). Entonces, nos preguntamos si este comportamiento tendría algún costo para Col, lo que nos llevó a

analizar el área expuesta de ambos genotipos dentro de la hilera. Como podemos observar en la figura 4.12.B las plantas mutantes tienen mayor área expuesta que Col, sin embargo cuando se comparan hileras puras no hay diferencias en el área expuesta (figura 4.12.C). Estos resultados nos hacen pensar que las plantas mutantes *sav-3* tienen un comportamiento deshonesto, dado que Col reconoce a *sav-3* como un pariente y acomoda sus hojas evitando sombrear a su vecino *sav-3*, mientras que éste último no muestra esta respuesta y sombrea a su vecino Col. Este comportamiento cooperativo de Col (el de evitar sombrear a *sav-3*) le genera un costo, que es el de interceptar menos cantidad de luz que su vecino, dado que tiene menos área expuesta.

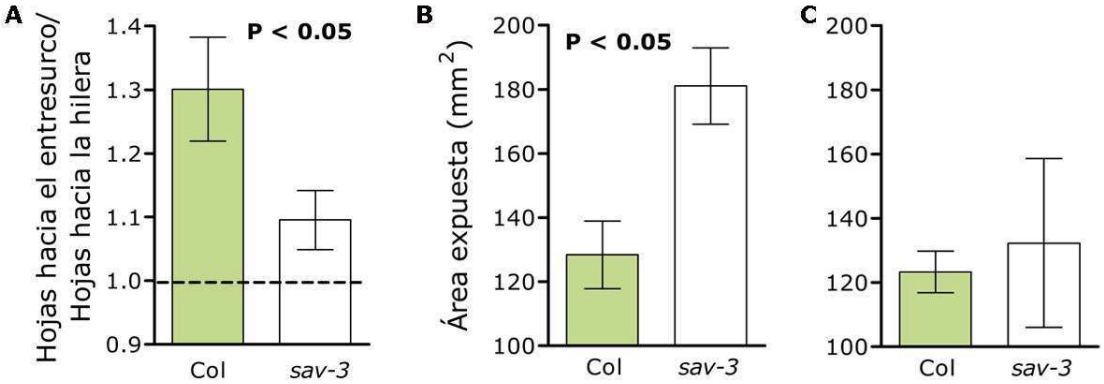


Fig.4.12: (A) Disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas cultivadadas en hileras mezcladas. Los valores graficados en el eje de ordenadas corresponden al promedio de 7 réplicas. Área expuesta por planta en hileras mezcladas (B) y en hileras puras (C). Los datos corresponden al promedio de 3 réplicas.

5 RESULTADOS - CAPÍTULO II

5.1 El reordenamiento de las hojas hacia los laterales es una respuesta muy temprana en el desarrollo de un canopeo con estructura rectangular.

En los experimentos del capítulo anterior, la disposición de las hojas en el plano horizontal era evaluada cuando las plantas finalizaban la producción de hojas en la roseta, es decir, al cambiar de la fase vegetativa a la fase reproductiva. No obstante, durante el transcurso de los experimentos observé que esta respuesta de reordenamiento de las hojas hacia los laterales de la hilera de siembra se producía muy temprano como observa en la figura 5.1.A, en que las plantas tienen 4 pares de hojas verdaderas.

Para evaluar con más precisión la cinética de la respuesta de reordenamiento de las hojas, se sembraron semillas de la accesión Col, cuando las plantas desarrollaban el segundo par de hojas verdaderas, un grupo era colocado en las hilera de siembra, con dos hojas hacia los entresurcos y 2 hojas hacia la hilera (ver esquema de la figura 4.1.A), y otro grupo se cultivaba en macetas aisladas de vecinos. Este momento era considerado día 0. Se midió la disposición de las hojas en el tiempo, durante el transcurso de tres semanas en ambos grupos de plantas. Los datos indican que muy pronto se produce el reordenamiento de las hojas hacia los laterales; al día 3 ya se observó el reordenamiento de las hojas, que se mantuvo estable en el tiempo. En cambio, las plantas aisladas mantuvieron siempre sus hojas dispuestas al azar (valores cercanos a 1) (figura 5.1.B).

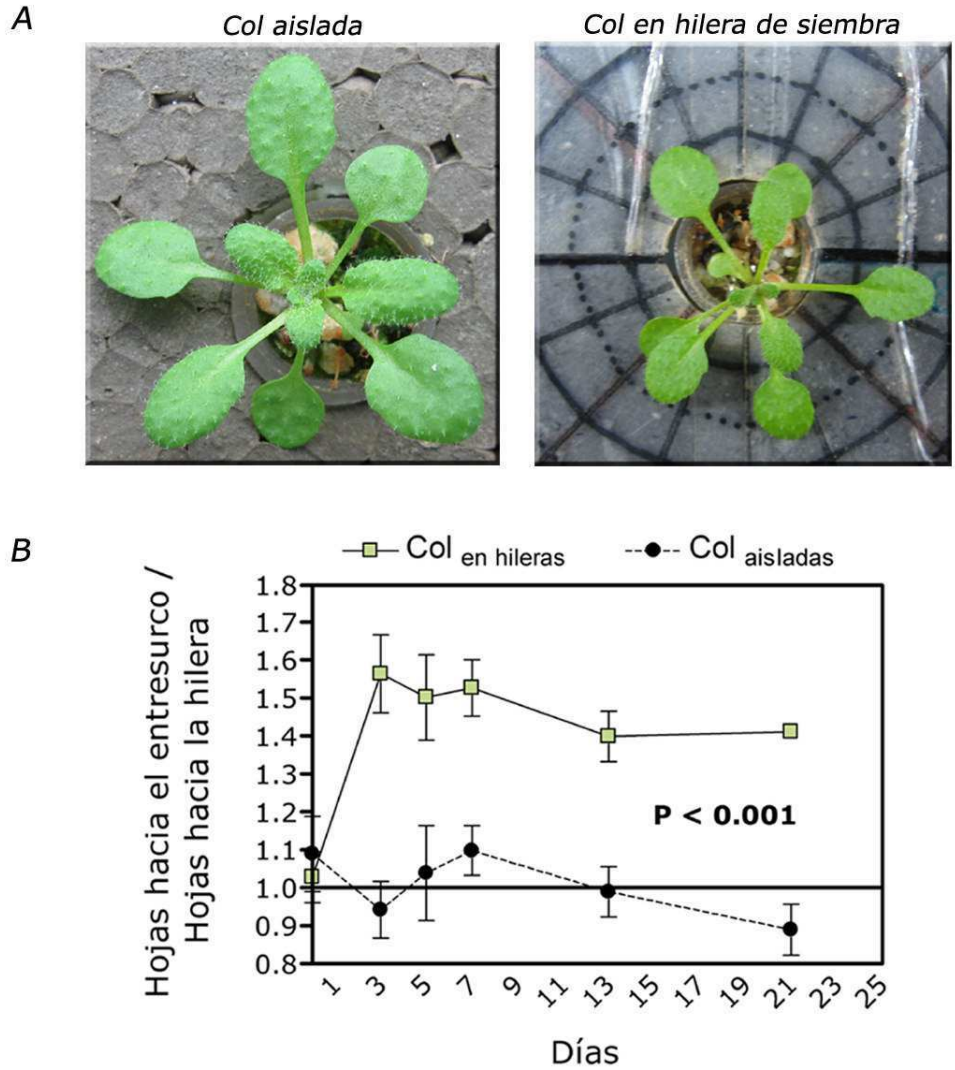


Fig. 5.1: (A) Fotos de plantas de la accesión Col, cultivadas de manera aislada (izquierda) y en un sistema de siembra rectangular (derecha). (B) Disposición de las hojas en el plano horizontal en función del tiempo, de plantas cultivadas en sistemas de siembra rectangular ($Col_{en\ hileras}$), (se promediaron entre 4 y 18 réplicas) o plantas cultivadas de manera aisladas ($Col_{aisladas}$), (se promediaron entre 12 y 36 plantas).

5.1.1 ¿El desarrollo de esta respuesta se debe a un cambio en la filotaxis o en el crecimiento de las hojas?

Nos preguntamos si este reordenamiento de las hojas se debía a un cambio en la disposición que presentan las hojas (filotaxis) o si se debía a un cambio en el crecimiento de las hojas causado por la percepción de su vecina. Para responder a esta pregunta se colocaron plantas de la accesión Col en el diseño experimental descripto en la sección 3.3, en ese momento (día 0), las plántulas tenían dos pares de hojas verdaderas, y a cada una de ellas se las ubicó en la hilera con dos hojas hacia la hilera y dos hojas hacia el entresurco como se muestra en el esquema de la figura 3.3.A. Partimos de que 2 hojas ubicadas en entresurco corresponde al 100% de hojas hacia el entresurco, y lo mismo para las hojas ubicadas hacia la hilera (ver figura 3.3). Se tomó una fotografía de cada hilera evaluada. Al día siguiente se volvió a tomar una fotografía y se comparó la ubicación de las hojas con respecto al día anterior (ver el ejemplo del esquema de la figura 3.3.B), luego se re-calculó el porcentaje de hojas ubicadas en el entresurco y sobre la hilera de siembra de esas 4 hojas iniciales. Durante los 7 días siguientes se observó el crecimiento y redistribución de estas 4 hojas. La figura 5.2.A (panel izquierdo) muestra como se redistribuyeron estas primeras 4 hojas durante el transcurso de una semana. Como podemos ver, a partir del día 4 aumenta notablemente el porcentaje de hojas que se reacomodan hacia el entresurco. Sin embargo, cuando las plantas son cultivadas de manera aislada no se observa este patrón, las hojas permanecen dispuestas al azar (figura 5.2.A, panel derecho).

También se evaluó hacia dónde nacían las hojas nuevas, y este dato fue graficado como porcentaje del total de hojas de la roseta en función de los días. La figura 5.2.B (panel izquierdo) muestra que inicialmente las hojas nuevas (no visibles al día 0) aparecieron indistintamente hacia la hilera o hacia el entresurco cuando las plantas se cultivaron en hileras de siembra y recién se reacomodaron alrededor de los días 4 y 5 (figura 5.2.B, panel izquierdo). Las hojas nuevas en aquellas plantas que fueron cultivadas aisladas de vecinas mantuvieron su distribución al azar (Figura 5.2.B panel derecho).

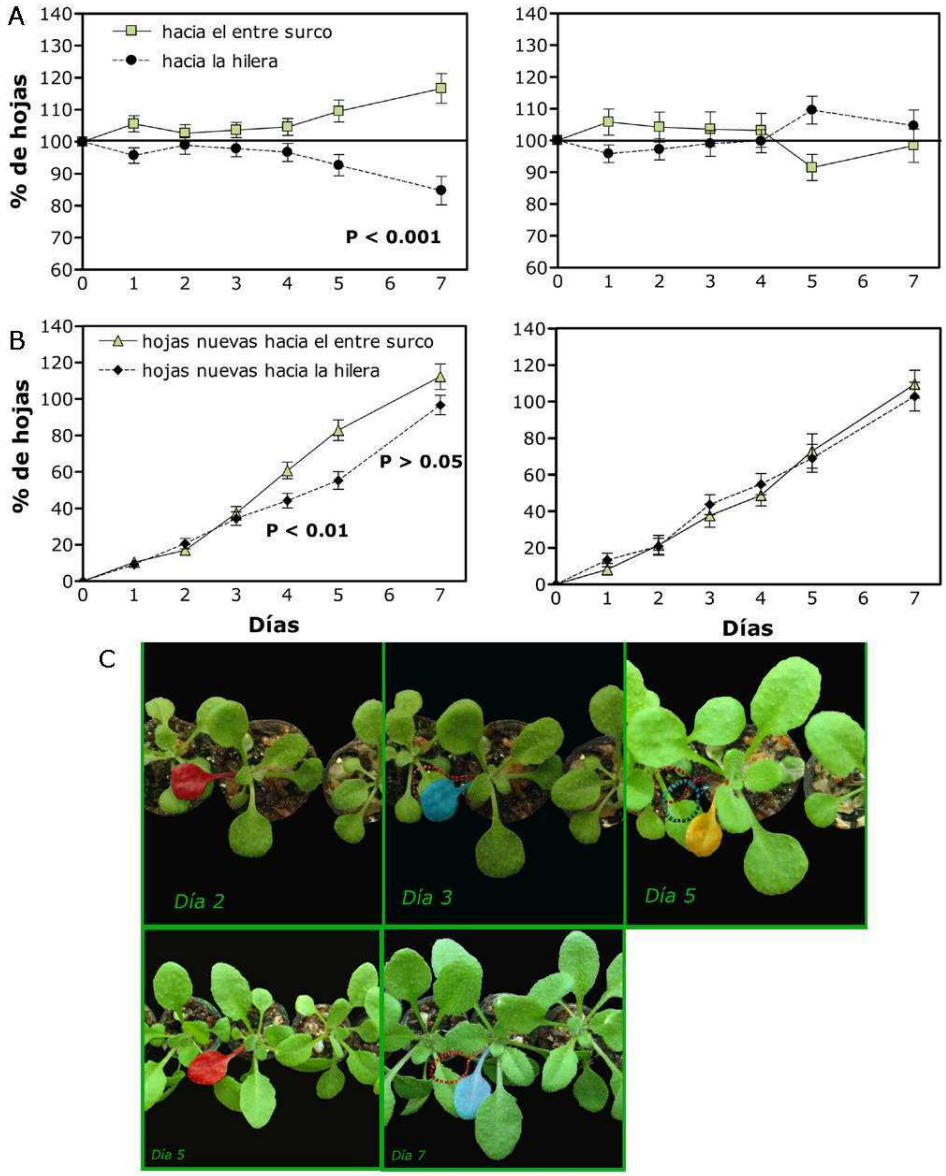


Fig 5.2: (A) Porcentaje de hojas que se reacomodan una vez percibida la señal de su vecina. El panel de la izquierda muestra los resultados de las plantas cultivadas en hileras, el panel de la derecha muestra los resultados de las plantas cultivadas aisladas de vecinas. Las plantas cultivadas en el sistema de siembra rectangular presentan diferencias significativas en la redistribución de sus hojas a partir del día 5 de colocadas en el sistema de cultivo ($P<0.001$). (B) Porcentaje de hojas nuevas que nacen hacia la hilera o hacia el entresurco. No se observan diferencias significativas en las plantas cultivadas en hileras (panel de la izquierda), ni en las plantas cultivadas aisladas de vecinas (panel de la derecha). Cada punto de las curvas es el promedio de al menos 38 plantas (cultivadas en hilera) y 22 plantas (cultivadas aisladas). (C) Fotos donde se muestra este patrón de desarrollo de las hojas. El panel superior corresponde a una hilera de siembra independiente a la del panel inferior.

Los datos presentados aquí, demuestran que las plantas reacomodan sus hojas luego de que emergen y que esta respuesta no es generada por un cambio en la filotaxis de las plantas, es decir por un cambio en su programa de desarrollo. A modo ilustrativo en la figura 5.2.C, se muestran dos hileras distintas de plantas de la accesión Col dónde se puede observar este cambio en la orientación de las hojas a través del tiempo.

5.2 El ambiente lumínico dentro de una hilera de siembra.

Cuando las plantas crecen en altas densidades de cultivo decae la irradiancia de luz que llega a los estratos más bajos de la vegetación, lo cual se ve reflejado en una caída de la irradiancia de la luz azul y la luz R, además de la relación R/RL. En el capítulo anterior habíamos visto que esta respuesta de reordenamiento de las hojas estaba iniciada por la percepción diferencial de la relación R/RL (figura 4.4). Para obtener una descripción más detallada del ambiente lumínico generado por las plantas cultivadas en una hilera de siembra, se midieron la radiación activa fotosintéticamente (RAF), la relación R/RL y la irradiancia de luz azul generados en los cuatro puntos cardinales de la hilera como se indica en la sección 3.4 de materiales y métodos. Al día 2, tanto al Este como al Oeste (puntos cardinales hacia los cuales se encuentran las plantas vecinas de la hilera (figura 5.3.A), los valores relativos a la condición sin planta son menores a 1 (figura 5.3.B). Esto indica que muy temprano en el crecimiento del canopeo el ambiente lumínico se caracteriza por una mayor disponibilidad de luz hacia los laterales de la hilera de siembra, es decir al Norte y Sur (figura 5.3.A); que sobre la hilera de siembra (Este y Oeste). A partir de estos resultados, podemos pensar, que las hojas redireccionan su crecimiento hacia sitios de mayores recursos lumínicos (figura 5.2.A). En la figura 5.3.C se muestra que este patrón lumínico se mantiene a través del tiempo, las mediciones corresponden al día 9.

Estos resultados nos indican que además de la relación R/RL, también varía la irradiancia de la RAF y de la luz azul sobre la hilera de siembra (E, O) respecto al entresurco (N, S).

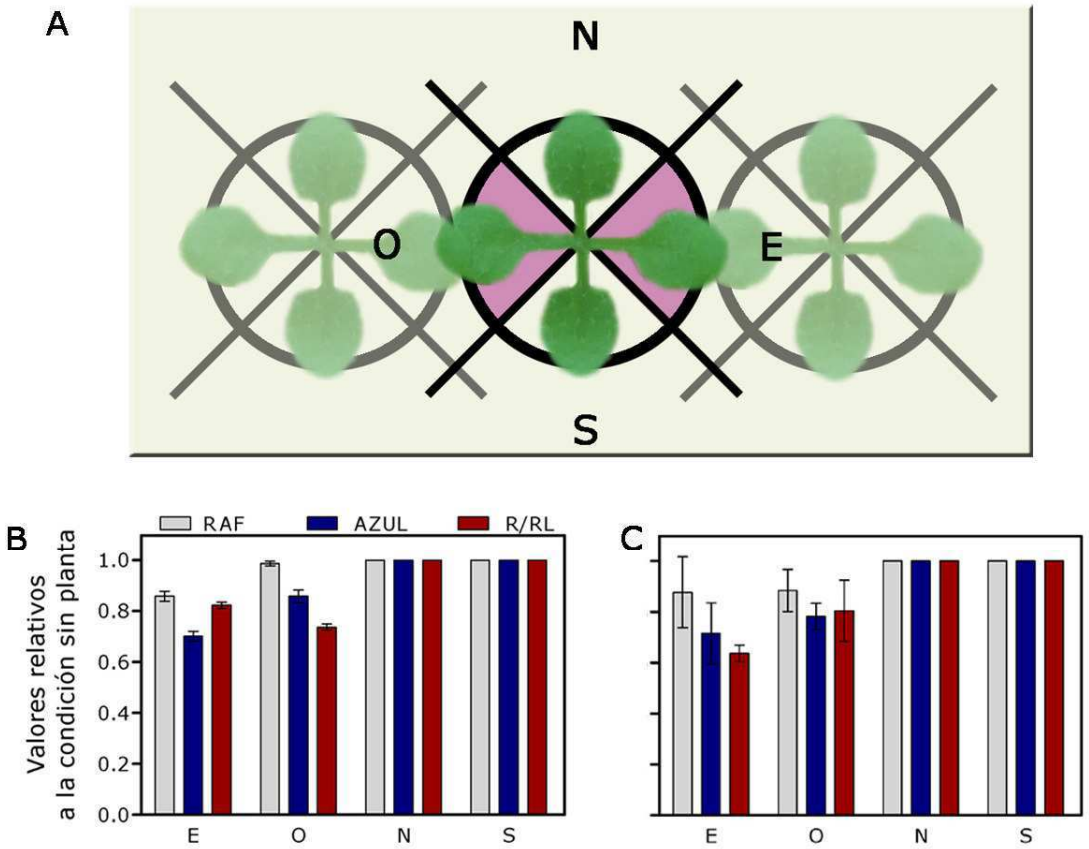
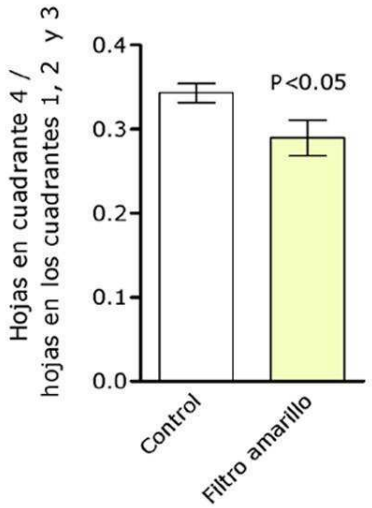


Fig. 5.3: (A) Esquema representativo de la ubicación de la hilera con respecto a los puntos cardinales, nótese que al N y al S no hay plantas cercas (entresurco). (B-C) Patrón horizontal de la señal lumínica: en el eje de ordenadas se grafican los valores de irradiancia relativos a la condición sin planta, mientras que en el eje de abscisas se grafican los cuatro puntos cardinales. Los datos corresponden al ambiente lumínico generado al 2° (B) y al 9° (C) día de colocar las plantas en las hileras de siembra. Cada condición lumínica fue medida al menos en 3 plantas cultivadas en hileras de siembra independientes.

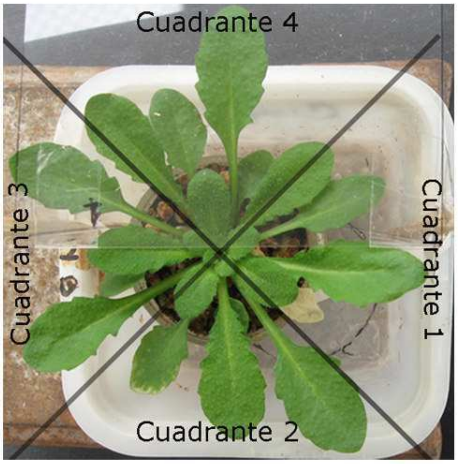
5.3 La respuesta de reordenamiento de las hojas en el plano horizontal está regulada por la percepción diferencial de luz azul.

La irradiancia de luz azul como la relación R/RL decae alrededor de un 20% al E y O (figura 5.3) o lo que es lo mismo en la hilera de siembra donde se encuentran las plantas vecinas. Según los resultados mostrados en el capítulo anterior (sección 4.4.1) esta respuesta de reordenamiento de las hojas se iniciaría por la percepción diferencial de la relación R/RL. Sin embargo, también podría estar afectada por la percepción diferencial de niveles de luz azul. La primera aproximación experimental que realizamos para estudiar si las hojas orientaban su crecimiento hacia sitios con alta irradiancia de luz azul, fue cubrir sólo la mitad de la roseta de plantas de la accesión Col con filtros de acetato amarillo (disminuyen la irradiancia de luz azul que llega a las hojas) y filtros transparentes (usados como control), y luego comparábamos la cantidad de hojas que permanecía en el cuadrante 4 (correspondiente a la menor irradiancia de luz azul en el tratamiento con filtro amarillo, figura 5.4.B). En la figura 5.4.A se puede observar que hubo un menor porcentaje de hojas ubicadas debajo del filtro amarillo (el cual disminuye la irradiancia de luz azul que llega a las hojas) si se lo compara con el control (filtro transparente). La figura 5.5 muestra un ejemplo de como las hojas se alejan de la condición con bajos niveles de luz azul.

A



B



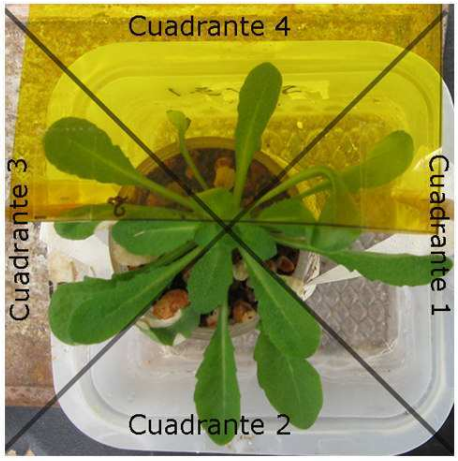


Fig. 5.4: (A) Proporción de hojas. En el eje de ordenadas se grafica la cantidad de hojas en el cuadrante 4 (panel B) dividido la cantidad de hojas en los cuadrantes 1, 2 y 3 (panel B), los datos corresponden al promedio de 10 plantas. Los valores más bajos de esta proporción nos indica que hay menos cantidad de hojas en el cuadrante 4 (sitio de menor irradiancia de luz azul en el tratamiento con filtro amarillo). En el eje de abscisas se grafican los tratamientos. (B) Fotos donde se puede observar como se disponen las hojas en cada cuadrante en los distintos tratamientos: Control con filtro transparente (arriba). Tratamiento con filtro amarillo (abajo), nótese como las hojas se orientan hacia sitios con mayor intensidad de luz azul.

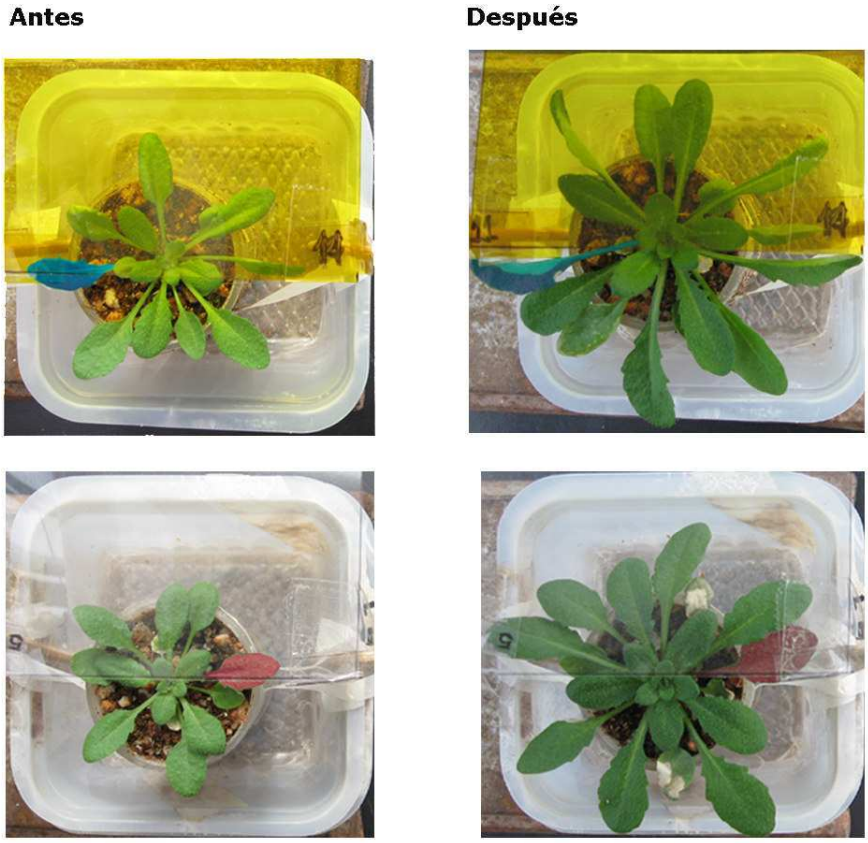


Fig. 5.5: Ejemplo de como las hojas se orientan hacia sitios de mayor intensidad de luz azul. En el tratamiento con filtro amarillo (arriba) se puede observar como en el transcurso de 5 días la hoja marcarda de celeste se localiza completamente fuera del filtro. En cambio, en el caso del control (abajo), podemos ver que la hoja marcada de rojo permanece bajo el filtro transparente.

Hasta aquí podemos decir que la señal de luz azul pareciera estar involucrada en la respuesta de reordenamiento de las hojas, pero las diferencias encontradas cubriendo la mitad de la planta con filtros fueron relativamente pequeñas; entonces, decidimos utilizar otra aproximación: Se cultivaron plantas de la accesión Col en un invernáculo bajo radiación natural, un grupo de plantas creció en hileras bajo un filtro de acetato amarillo

(que disminuye el paso de luz azul), otro grupo creció en hileras sin filtro y un último grupo creció aislado de vecinas también sin filtro. En la figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos luego de evaluar la orientación de las hojas de la roseta en el plano horizontal. Cuando las plantas Col fueron cultivadas en hileras con bajos niveles de luz azul (bajo el filtro amarillo) y aisladas de vecinas no se acomodaron las hojas hacia los laterales como si ocurre con las plantas de Col cultivadas en hileras bajo radiación natural (sin filtro) (figura 5.6). Esto indica que al distorsionar con el filtro las señales de luz azul las plantas no pueden reorientar sus hojas hacia el entresurco. De acuerdo con estos resultados, podemos concluir que la respuesta de reorientación de hojas requiere la presencia de señales de luz azul.

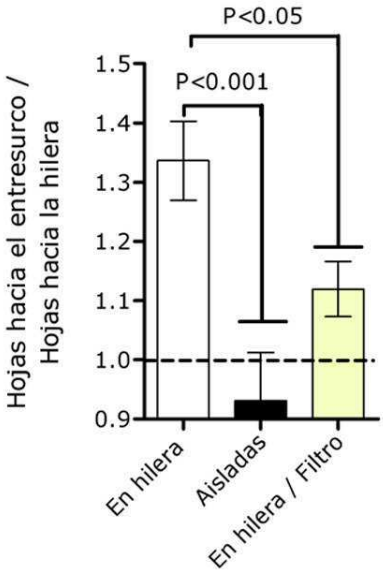


Fig. 5.6: Disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas de la accesión Col cultivadas en hileras sin filtro (barra blanca), aisladas de vecinas (barra negra) y en hileras bajo el filtro amarillo (barra amarilla). Los datos coresponden al promedio de al menos 6 réplicas.

5.3.1 El rol de los criptocromos y fototropinas en la orientación horizontal de las hojas de la roseta.

Las reducciones en la cantidad de luz azul son percibidas por los criptocromos (Yanovsky *et al.*, 1995) y fototropinas (Briggs *et al.*, 2001). Para estudiar si esta respuesta de reordenamiento de las hojas hacia el entresurco estaba mediada por estos fotorreceptores, se evaluaron los mutantes *cry1*, *cry2*, el doble mutante *cry1 cry2*, *phot1*, *phot2* y el doble mutante *phot1 phot2.* Como podemos observar en la figura 5.7, el doble mutante *cry1 cry2* acomoda sus hojas al azar (se obtuvieron valores cercanos a 1); en cambio, los mutantes monogénicos presentan una respuesta intermedia aunque de todos modos difiere significativamente si se la compara con el genotipo salvaje. En base a los resultados observados podemos decir que existe un efecto aditivo en la regulación de esta respuesta de reordenamiento de las hojas en el plano horizontal entre los criptocromos 1 y 2. Los mutantes de fototropinas también fallan en acomodar sus hojas hacia el entresurco, siendo necesarias ambas fototropinas para el desarrollo de esta respuesta.

Hasta aquí, podemos decir que la capacidad de las plantas de reordenar sus hojas hacia el entresurco es una respuesta muy temprana en el desarrollo del canopeo con estructura rectangular, causada por el cambio en la dirección de crecimiento de las hojas en respuesta al ambiente lumínico. La heterogeneidad del ambiente lumínico es generada por la caída de la relación R/RL de la luz y la disminución de los niveles de luz azul en la hilera de siembra; esta respuesta de reordenamiento de las hojas está regulada por los principales receptores de estas señales de luz (criptocromos, fototropinas y fitocromo B).

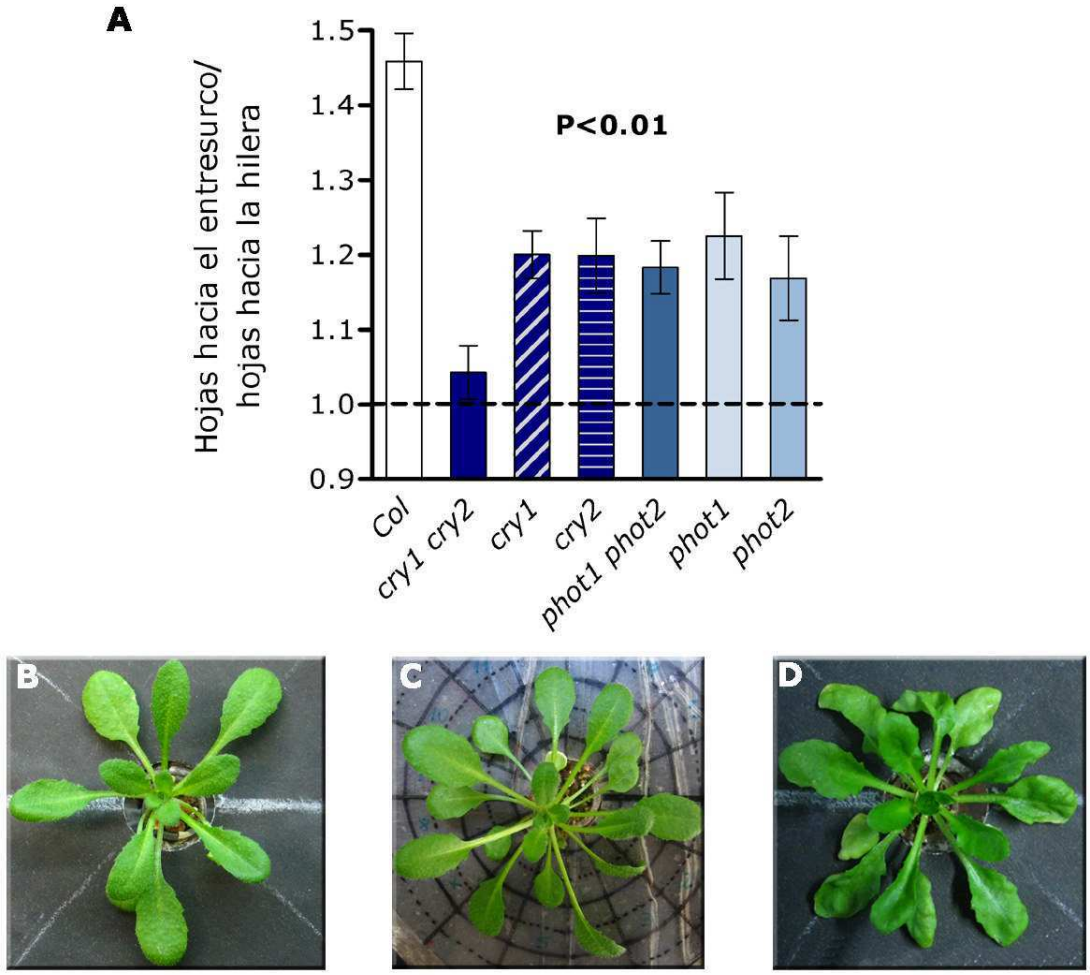


Fig. 5.7: (A) Disposición de las hojas en el plano horizontal de plantas cultivadas en un sistema de siembra rectangular. En el eje de abscisas se grafican los distintos genotipos utilizados. Los datos que se grafican en el eje de ordenadas corresponden al promedio de al menos 8 réplicas. (B-D) Fotos donde se muestra la distribución de las hojas en el plano horizontal de los distintos genotipos utilizados: Col (B), *cry1 cry2* (C) y *phot1 phot2* (D).

5.3.2 El auto-sombreado y su relación con la luz azul.

En el capítulo anterior habíamos demostrado que al acomodar las hojas hacia el entresurco se generaba un costo (mayor auto-sombreado). Esto resultaba evidente al comparar las plantas Col con plantas *sav-3* que no desarrollaban la mencionada respuesta. Nos preguntamos entonces, que ocurriría con las plantas que fueron cultivadas aisladas de vecinas (las mismas tampoco acomodaban sus hojas). Para ello se cultivaron plantas de la accesión Col en el mismo sistema de siembra rectangular descripto antes y plantas aisladas de vecinas, luego se estimó el índice de auto-sombreado por una metodología alternativa a la utilizada en el capítulo previo (sección 3.6 de materiales y métodos), consistente en calcular la cantidad de hojas superpuestas relativas al total de hojas por planta. Aquellas plantas que fueron cultivadas en hileras superponen más sus hojas que aquellas cultivadas de manera aislada (figura 5.8).

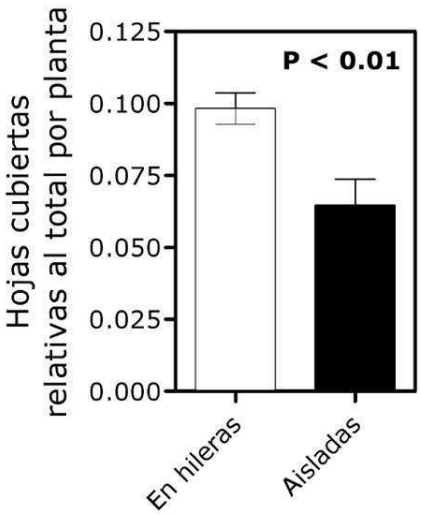


Fig. 5.8: Proporción de hojas sombreadas por la propia planta. Los valores del eje de ordenadas corresponden a la cantidad de hojas cubiertas dividido la cantidad de hojas de la roseta. Los datos son el promedio de 135 plantas cultivadas en hileras de siembra (barra blanca) y 34 plantas cultivadas aisladas de vecinas (barra negra).

Cuando las plantas de la accesión Col fueron cultivadas en hileras bajo un filtro de acetato amarillo (para distorsionar la señal lumínica de luz azul) no acomodaron sus hojas (figura 5.6) y se auto-sombrearon menos que las plantas cultivadas en hilera bajo radiación natural (figura 5.9). Estos resultados nos indican que el mayor auto-sombreado es consecuencia del reordenamiento de las hojas hacia los laterales cuando las plantas son cultivadas en hileras de siembra rectangulares.

Los datos de la figura 5.9 muestran que tanto los mutantes de criptocromos como los de fototropinas presentan un menor índice de auto-sombreado, a pesar que las diferencias no son significativas respecto al genotipo salvaje si se consideran los mutantes de fototropinas separadamente, en conjunto si lo son (P<0.01).

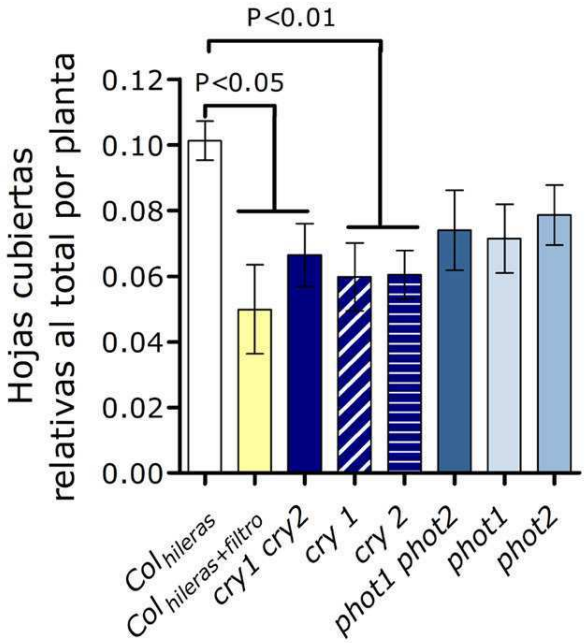


Fig. 5.9: Proporción de hojas sombreadas por la propia planta. Los valores del eje de ordenadas corresponden a la cantidad de hojas cubiertas dividido la cantidad de hojas de la roseta. Los datos son el promedio de al menos 28 plantas. Todas las plantas fueron cultivadas en hileras de siembra rectangulares.

6 DISCUSIÓN.

6.1 La respuesta de reordenamiento de las hojas en el plano horizontal en respuesta al ambiente luminoso de cultivos.

6.1.1 Arabidopsis rápidamente acomoda las hojas fuera de la hilera.

Cuando las plantas de Arabidopsis fueron cultivadas en hileras de siembra, en un lapso de tiempo muy corto (3 días) ordenaron sus hojas hacia los laterales alejándolas de sus vecinas (figura 5.1.B), mientras que las plantas que crecieron aisladas no reordenaron las hojas, que quedaron dispuestas al azar en el plano horizontal. Esta respuesta se mantuvo estable en el tiempo. En los experimentos en que se analizó más específicamente la cinética de redistribución de las primeras cuatro hojas observamos que luego de cuatro días de colocar las plantas en la hilera de siembra aumentó el porcentaje de hojas que se acomodaron hacia el entresurco (figura 5.2.A). Sin embargo, las hojas nuevas (hoja cinco en adelante) aparecieron indistintamente hacia el entresurco o hacia la hilera, y recién comenzaron a acomodarse cuatro días después de que emergieron (figura 5.2.B). A partir de estos resultados concluimos que el desarrollo de esta respuesta no se debe a un cambio en la filotaxis de las plantas, sino a un redireccionamiento del pecíolo durante el crecimiento de las hojas (figura 5.2.C).

6.1.2 El crecimiento del canopeo muy pronto produce un ambiente lumínico heterogéneo.

Desde muy temprano en el crecimiento del canopeo (2 días) el ambiente lumínico se caracterizó por una mayor disponibilidad de luz hacia los laterales de la hilera de siembra (figura 5.3.B). Estos datos sugieren que son los cambios en el ambiente lumínico los que inician la respuesta de las hojas.

Entonces, la respuesta de reordenamiento de las hojas hacia los laterales de la hilera de siembra se produce a través de un cambio en la dirección del pecíolo en el plano horizontal (rotación) durante el crecimiento de las hojas. Este movimiento comenzó a partir de 3-4 días de colocadas las plantas en la hilera, las hojas nuevas que emergieron cuando la planta ya estaba dentro de la hilera también comenzaron a moverse a partir del día 3. El pecíolo direcciona el movimiento de manera tal que la hoja se aleja de las vecinas donde la intensidad lumínica es menor, ubicándose donde hay mayor disponibilidad de luz (el entresurco). El hecho de que se inicie el movimiento en pocos días sugiere que existen mecanismos en las plantas que les permiten percibir rápidamente un ambiente lumínico heterogéneo.

6.1.3 El rol de los fotorreceptores.

En nuestros experimentos observamos una caída en la relación R/RL, en la intensidad de la RAF y en la intensidad de la luz azul en la hilera de siembra con respecto al entresurco (figura 5.3.B y C), lo que concuerda con reportes previos que sostienen que cuando las plantas crecen en un canopeo denso, las reducciones en R/RL son acompañadas por reducciones en la RAF, en particular longitudes de onda R y azul (revisado en Franklin, 2008).

Dado que cuando las plantas salvajes fueron cultivadas bajo filtros selectivos que distorsionaron el gradiente lumínico de la relación R/RL o de la luz azul, perdieron la capacidad de reordenar sus hojas distribuyéndolas al azar en el plano horizontal (figura 4.4.C y 5.6), concluimos que esta respuesta está iniciada por la percepción diferencial de la relación R/RL y de la luz azul. Por lo tanto, evaluamos la función de los principales fotorreceptores de cambios en relación R/RL e irradiancia de luz azul.

Comprobamos que esta respuesta está regulada por el fitocromo B, dado que el mutante careciente de dicho fotorreceptor no acomodó las hojas hacia los laterales (figura 4.4.A). El triple mutante *phyB phyD phyE* presentó una respuesta intermedia aunque significativamente diferente al genotipo salvaje, pensamos que esto se debe a la

morfología propia de la planta y no a la percepción de señales de luz, dado que el triple mutante presenta pecíolos más alargados, el contacto físico con las plantas vecinas podría provocar la exclusión de las hojas de la hilera. No se puede descartar entonces que también estén involucrados en mediar esta respuesta de las hojas el phyD y E. En un futuro sería conveniente evaluar dicha respuesta en los mutantes monogénicos de dichos fitocromos, sin embargo, la acción de estos fotorreceptores es generalmente redundante y sólo se nota cuando ya está mutado el phyB (Franklin *et al.*, 2003).

Las plantas mutantes de criptocromos y fototropinas acomodaron menos las hojas que el genotipo salvaje, lo que indica que estos fotorreceptores también tienen un rol en la modulación de esta respuesta de reorientación de las hojas (figura 5.7.A). El doble mutante *cry1 cry2* acomodó sus hojas casi completamente al azar, sin embargo los mutantes monogénicos mostraron una respuesta intermedia (hojas hacia el entresurco/hojas hacia la hilera= 1,2); si sumamos el grado de respuesta de los mutantes simples obtenemos casi el grado de respuesta del genotipo salvaje (valores cercanos a 1,45). De acuerdo con estos resultados podemos concluir que existe un efecto aditivo en la regulación de esta respuesta entre los criptocromos 1 y 2. En cambio, el doble mutante *phot1 phot2* presenta el mismo grado de respuesta que los mutantes monogénicos *phot1* y *phot2*, concluimos que ambas fototropinas son simultáneamente necesarias para la regulación parcial de esta respuesta.

De acuerdo con lo expuesto concluimos que, el apropiado posicionamiento de las hojas de Arabidopsis hacia los laterales de la hilera de siembra es iniciado por estímulos lumínicos como son la luz azul y las relaciones de luz R/RL. Los movimientos y procesos morfogénicos que permiten el reordenamiento de las hojas hacia una mayor disponibilidad lumínica son muy rápidos y están controlados por la integración de señales mediadas por los fotorreceptores de luz azul (criptocromos y fototropinas) y los fitocromos que perciben las relaciones R/RL (principalmente phyB).

6.1.4 Comparación con otras respuestas de cambio en la posición de las hojas inducidas por la luz.

Las respuestas del escape al sombreado favorecen el posicionamiento de las láminas foliares, principal órgano fotosintético, en estratos más iluminados del canopeo. En tal sentido, las respuestas pueden clasificarse de acuerdo a si el desplazamiento es vertical, hacia estratos más altos, donde la luz no ha sido tan fuertemente interceptada por el follaje (Morgan and Smith, 1976; Morgan and Smith, 1978a; Morgan and Smith, 1981), u horizontal, hacia sectores que la vegetación aún no ha cubierto (Maddonni *et al.*, 2002; Gálvez and Pearcy, 2003; Kahlen *et al.*, 2008). Por otro lado, las respuestas del escape al sombreado pueden clasificarse de acuerdo al órgano que provoca el desplazamiento. Este puede ser el tallo (Morgan *et al.*, 1980; Smith, 1982; Ballaré *et al.*, 1991a; Ballaré *et al.*, 1991b), que al crecer en altura eleva a las hojas, pueden ser las hojas mismas que se elevan hacia posiciones más altas reduciendo su ángulo con la vertical (hiponastia) (Satter and Wetherell, 1968; Whitelam and Johnson, 1982; Pierik, 2004; Inoue *et al.*, 2008; Millenaar *et al.*, 2009; Carbonnel *et al.*, 2010), pueden ser las yemas axilares, que al reprimir su crecimiento impiden la generación del follaje (Deregibus *et al.*, 1983; Deregibus *et al.*, 1985; Casal *et al.*, 1986; Casal *et al.*, 1987.; Casal, 1988; Skinner and Simmons, 1993). Del mismo modo, los tallos existentes (Morgan *et al.*, 1980; Ballaré *et al.*, 1991b), o las hojas pueden crecer hacia los lugares más iluminados en el plano horizontal (Maddonni *et al.*, 2002; Gálvez and Pearcy, 2003; Kahlen *et al.*, 2008).

El reordenamiento de las hojas en el plano horizontal que presentan las plantas de Arabidoposis cuando son cultivadas en hileras, es una respuesta de escape al sombreado. En este caso las plantas en lugar de elevar las hojas por encima de sus vecinos las orientan hacia los laterales de la hilera de siembra donde hay un incremento de la disponibilidad lumínica. De acuerdo con la clasificación descripta en el párrafo anterior, la respuesta estudiada en esta tesis podemos compararla con la respuesta estudia por Maddonni *et al.* (2002) en maíz. Ellos observaron que las hojas de maíz se desplazaban sobre el plano horizontal alejándose de la señal de bajos niveles de R/RL que lograban mediante filtros para simular vegetación vecina en plantas que crecieron aisladas en el campo, sin embargo las hojas no se alejaban cuando mediante filtros disminuían la

irradiancia de la luz azul. En otro experimento, las hojas ya expandidas de plantas que crecieron bajo luz blanca fueron irradiadas desde un lateral con un suplemento de RL, estas hojas se alejaron de la señal; lo que indica que la hoja cambia la dirección una vez percibida la señal como ocurre en Arabidopsis, pero a diferencia de las plantas de maíz, Arabidopsis además de responder al cambio en la relación R/RL, también responde a la disminución de la luz azul.

Otra respuesta donde las hojas cambiaban la dirección en el plano horizontal alejándose del sombreado es la que estudiaron Gálvez *et al*. (2003) en *Psychotria limonenses*. Ellos observaron que ocurría con la distribución en el plano horizontal de las hojas basales de la roseta cuando nacían las hojas nuevas. La reorientación de estas hojas era lograda a través de la curvatura del pecíolo, ellos sostienen que es debido a la percepción del sombreado por las hojas más jóvenes que se desarrollaban arriba, lo cual cambiaba la relación R/RL de la luz percibida por las hojas basales. En cambio, en ambientes abiertos las hojas no se reorientaron, con lo cual ellos sugieren que esta respuesta es específica de ambientes sombreados donde la disponibilidad lumínica es reducida. Lo interesante de esta respuesta es que mejora significativamente la ganancia de C en toda la planta. La respuesta estudiada en Arabidopsis es comparable con la observada por Galvéz *et al.* (2003) en el sentido que la reorientación de las hojas es mediante la curvatura de los pecíolos (figura 4.5 y 4.7), además ambas son mediadas por la percepción diferencial de las señales de R/RL. Una diferencia importante es que en *P. limonenses* al reorientar las hojas basales reduce el auto-sombreado, mientras que en las plantas Col el reordenamiento de las hojas aumentó el auto-sombreado (figura 5.8) en comparación con las plantas Col que crecieron aisladas de vecinas, como se discute en más detalle en la sección 6.2.2.

La respuesta de hiponastía de las hojas en Arabidopsis, donde el cambio en la orientación de las mismas es en el plano vertical, es inducida por la baja relación R/RL que se da cuando hay una alta densidad de vegetación (Pierik *et al.*, 2005), por las bajas irradiancias (Inoue *et al.*, 2008; Millenaar *et al.*, 2009) o por elevadas temperaturas (Koini *et al.*, 2009).

Inoue *et al.* (2008) observaron cambios en la posición de las hojas en el plano vertical y rotación de los pecíolos en su propio eje en respuesta a flujos de luz azul. Cultivaron las plantas en luz blanca, irradiándolas durante 5 días con luz azul desde un lateral, luego cambiaron de posición la fuente de luz azul (arriba) y durante los 5 días siguientes observaron el movimiento de la lámina foliar, los pecíolos en el plano vertical y la rotación de los mismos sobre su eje. Ellos mostraron que el posicionamiento de las hojas puede comprender tanto movimientos muy rápidos como procesos de crecimiento más lentos. En sus estudios encontraron que las hojas cambiaban la dirección en el plano vertical hacia la nueva fuente de luz en unas pocas horas y que a partir de las 8 h se estabilizaban en la nueva posición. Sin embargo, la rotación del pecíolo sobre su propio eje era un cambio más lento que comenzaba a las 24 h desde el comienzo del tratamiento lumínico, y recién a los 5 días completaba el movimiento y las hojas se estabilizaban en su nueva posición. La cinética de rotación de los pecíolos hacia la fuente de luz azul es comparable a la cinética de reorientación de las hojas en el plano horizontal estudiada en esta tesis, ya que las hojas también tardan unos pocos días para ubicarse fuera de la hilera de siembra, pero es a través de la rotación de los pecíolos en el plano horizontal. Además, tanto la respuesta analizada por Inoue *et al.* (2008) como la estudiada aquí, responden a la luz azul y son mediadas por fototropinas. Estos autores han sugerido que el éxito en una regulación rápida en la redirección de las hojas es oportuno para maximizar la intercepción de luz.

Concluimos entonces, que la respuesta estudiada en esta tesis es una respuesta de escape al sombreado, ya que las hojas evitan las bajas relaciones R/RL causadas por plantas vecinas y también es una respuesta fototrópica donde cambia el posicionamiento de las hojas hacia lugares donde hay mayor disponibilidad de luz; pero a diferencia de las las respuestas mencionadas en los párrafos anteriores, es la única conocida en la que el reordenamiento horizontal requiere simultáneamente de fitocromos, criptocromos y fototropinas.

6.1.5 El rol de las auxinas:

Las respuestas fototrópicas y de aplanamiento de las hojas son procesos en que ocurre una coordinación del crecimiento diferencial en distintas partes de un órgano (Harper *et al.*, 2000; Friml and Palme, 2002; Friml, 2003). Tal coordinación del crecimiento está bajo una fina regulación hormonal. Las auxinas, por ejemplo, tienen un rol fundamental en el programa de desarrollo de las plantas, pero también están asociadas con el crecimiento diferencial (Harper *et al.*, 2000; Friml and Palme, 2002; Friml, 2003) y con respuestas de escape al sombreado (Morelli and Ruberti, 2002; Tao *et al.*, 2008; Pierik *et al.*, 2009). Las auxinas están involucradas en la regulación del fototropismo (Holland *et al.*, 2009), en las respuestas que involucran aplanamiento de las hojas (Keller and Van Volkenburgh, 1997; Li *et al.*, 2007b; Bainbridge *et al.*, 2008; Braun *et al.*, 2008), y con la respuesta de la posición de las hojas en el plano vertical (hiponastía) a señales de la relación R/RL y luz azul generadas por plantas vecinas (Tao *et al.*, 2008; Millenaar *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que el metabolismo dependiente de auxinas es necesario en las respuestas de escape al sombreado (Morelli and Ruberti, 2002; Kanyuka *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2008; Pierik *et al.*, 2009); como también en respuesta fototrópicas (Friml and Palme, 2002; Stone *et al.*, 2008); sumado a esto, bajas relaciones de R/RL induce la expresión de genes de respuesta a auxinas (Kurepin *et al.*, 2007). El control del crecimiento del hipocotilo y del pecíolo en Arabidopsis esta controlado por varios fotorreceptores y varias hormonas incluyendo las auxinas que tienen un rol fundamental (Lariguet and Fankhauser, 2004). Por ejemplo, los fitocromos, la síntesis y transporte de auxinas son requeridas para el control del posicionamiento de las hojas en respuesta a bajas relaciones de R/RL (Tao *et al.*, 2008). Bajas condiciones de luz también inician una posición más erecta de las hojas que requiere de criptocromos, fitocromos y síntesis y transporte de auxinas (Millenaar *et al.*, 2009). Carbonnel *et al.* (2010) sugieren que respuestas fototrópicas de posicionamiento de las hojas en respuesta a luz azul son reguladas por un intermediario (PKS2) (Fankhauser *et al.*, 1999; Lariguet *et al.*, 2003; Boccalandro *et al.*, 2008) de la vía de señalización de fototropinas, a través del control homeostático de auxinas (Carbonnel *et al.*, 2010).

Como la respuesta estudiada en esta tesis involucra un cambio de posición de las hojas en el plano horizontal en función de las señales de plantas vecinas, pensamos que también podía estar regulada por auxinas, por ello evaluamos el reordenamiento de las hojas en el plano horizontal de plantas que tienen interrumpida una vía de síntesis de auxinas (*sav-3*). El mutante *sav-3* falló en reorientar el crecimiento de sus hojas en respuesta a sus vecinos (figura 4.6).

Concluimos que las auxinas también están involucradas en la regulación de esta respuesta de reordenamiento en el plano horizontal, lo cual es consistente con los estudios previos que demuestran que el metabolismo dependiente de auxinas es requerido en respuestas de escape al sombreado y en respuestas fototrópicas. A los ejemplos mencionados arriba podemos sumarle esta respuesta de reorientación de las hojas estudiada en este trabajo, ya que tanto fitocromos, criptocromos, fototropinas y auxinas son requeridos para que las hojas redireccionen su crecimiento fuera de las hileras en respuesta a señales de bajas relaciones R/RL y bajas intensidades de azul.

6.2 Consecuencias ecológicas y significado evolutivo de la reorientación del crecimiento de las hojas en el plano horizontal.

6.2.1 Reorientación de hojas en una especie no cultivada.

Las plantas modifican la arquitectura de su follaje en respuesta al ambiente. Las mismas pueden percibir cambios en la calidad e intensidad de luz lo que les permite detectar la presencia de plantas vecinas. Las respuestas de las plantas a la caída de la relación R/RL; típica de cultivos en crecimiento, son consideradas perjudiciales en la agricultura, debido a que la percepción de dicha señal provoca una disminución de las respuestas de defensa anti-hervíboro (Izaguirre *et al.*, 2006) y las defensas antibacterianas (Genoud *et al.*, 2002; Faigón-Soverna *et al.*, 2006) e induce la redistribución de los recursos hacia la elongación de tallos y crecimiento vegetativo a expensas de los órganos cosechables, disminuyendo de esta manera el rendimiento de los cultivos (Ballaré *et al.*, 1997; Schmitt, 1997; Libenson *et al.*, 2002; Franklin and

Whitelam, 2005; Kebrom and Brutnell, 2007). Esto genera un compromiso en la utilización eficiente del espacio y el rendimiento de las plantas cultivadas por unidad de superficie. Sin embargo, en algunos cultivares de maíz, se observó que las hojas se alejaban de las plantas vecinas por reorientación de su crecimiento hacia los espacios donde había una mayor disponibilidad lumínica (entresurco) (Maddonni *et al.*, 2002). Canopeos de maíz que disponen sus hojas de forma perpendicular a la línea de siembra en una proporción mayor que aquellas que ordenan sus hojas al azar presentan una mayor eficiencia en la intercepción de luz (Maddonni *et al.*, 2001) y esto puede redundar en un mayor rendimiento (Toler *et al.*, 1999). Por lo tanto, al menos algunas respuestas a la relación R/RL pueden ser beneficiosas más que perjudiciales para el rendimiento de un cultivo. Decimos que las respuestas de escape al sombreado que históricamente fueron interpretadas como reacciones de competencia pueden dar origen a reacciones más cercanas al altruismo que a la competencia, dado que como en el caso del maíz, esta respuesta en la distribución de las hojas evita el sombreado mutuo entre plantas vecinas y esto conduce a un mejor *fitness* para el cultivo en su conjunto.

Dado que las plantas de Arabidopsis ordenan sus hojas hacia los laterales cuando son cultivadas bajo condiciones de alta rectangularidad (figura 4.1.B), concluimos que esta respuesta no es necesariamente consecuencia de la selección por rendimiento en cultivos de uso comercial, sino que puede ocurrir cuando se cultiva en condiciones de alta rectangularidad plantas que no fueron seleccionadas en dicho arreglo espacial, típico de cultivos.

6.2.2 El reordenamiento de las hojas y el ambiente de la planta individual.

Las plantas responden rápidamente a los cambios del ambiente lumínico. Entre otras características, esto puede involucrar la reorientación de la dirección del crecimiento que tiende a optimizar la posición de los órganos de la planta en relación a la dirección del recurso lumínico, como concluye Millenaar *et al*. (2009). En el caso de la respuesta estudiada en este trabajo de tesis hay una reorientación del crecimiento del pecíolo (figura 4.5 y 5.2) que permite que la hoja se disponga rápidamente hacia el lugar donde

hay mayor disponibilidad del recurso lumínico en el plano horizontal. Sin embargo, las plantas que fueron cultivadas en hileras y respondieron acomodando sus hojas hacia los laterales presentaron un mayor porcentaje de hojas auto-sombreadas que las plantas cultivadas en hileras que acomodaban sus hojas al azar (como *sav-3*) o aquellas cultivadas aisladas de vecinas (figura 4.8.A y 5.8).

Incluso cuando cultivamos en hileras plantas Col bajo filtros selectivos que disminuyen la irradiancia de luz azul, y de esta manera las plantas no acomodan las hojas hacia los laterales el porcentaje de hojas superpuestas fue similar al de las plantas cultivadas aisladas (figura 5.9). En mutantes de fotorreceptores de luz azul que no acomodaron las hojas hacia los laterales, también observamos un menor porcentaje de hojas sombreadas por la propia planta (figura 5.9).

A partir de estos resultados, concluimos que el hecho de alejar las hojas de la hilera de siembra hacia un sitio donde la disponibilidad lumínica aumenta, le genera un costo a la planta, el de sombrear sus propias hojas. Entonces, ¿tiene alguna ventaja para las plantas que crecen en hileras desarrollar esta respuesta? Esto nos hace pensar que esta respuesta parecería perjudicial, pero dado que es una respuesta a vecinas debería ser analizada en el contexto del canopeo.

6.2.3 El reordenamiento de las hojas en el plano horizontal reduce el sombreado entre plantas dentro del canopeo.

Como el mutante *sav-3* no acomoda sus hojas hacia los laterales y es morfológicamente indistinguible de las plantas de genotipo salvaje que si reordenan sus hojas hacia los entresurcos, este material genético nos proporcionó una excelente herramienta para evaluar las consecuencias del reconocimiento de parientes que deriva en el reordenamiento de la posición de las hojas.

Cuando comparamos plantas del genotipo salvaje creciendo en hileras de siembra con plantas del mutante *sav-3*, también creciendo en hileras; observamos que el

posicionamiento de las hojas hacia los entresurcos donde hay mayor disponibilidad de luz les permite a las plantas sombrearse menos con sus vecinas (figura 4.8.B), suponemos entonces que de esta manera pueden interceptar mayor cantidad de luz.

El apropiado posicionamiento de las hojas es importante para aumentar la intercepción de luz y la eficiencia fotosintética (Gálvez and Pearcy, 2003; Inoue *et al.*, 2008; Kahlen *et al.*, 2008) de las plantas que crecen dentro de un canopeo denso. La exposición al sombreado induce una intensa aclimatación a niveles fotosintéticos, incluyendo una relocalización del Nitrógeno de la maquinaria fotosintética desde las hojas sombreadas más viejas hacia las más jóvenes que se encuentran más arriba en la canopia, donde las condiciones lumínicas son favorables (Boonman *et al.*, 2006). Esta respuesta de acomodar las hojas hacia los laterales les permite a las plantas reducir el riesgo de que sus hojas más nuevas sean sombreadas por plantas vecinas, a pesar de sombrear sus propias hojas, las más viejas con menor capacidad fotosintética.

Entonces podemos pensar, que esta estrategia de posicionamiento de las hojas hacia los laterales que permite evitar el sombreado de las hojas más jóvenes (con mayor capacidad fotosintética) por las plantas vecinas, proporcione un beneficio para el conjunto de plantas cultivadas en una misma hilera, a pesar de los costos del auto-sombreado.

6.2.4 El reacomodamiento de las hojas reduce el riesgo de caídas severas en los niveles de *fitness.*

La respuesta de reordenamiento de las hojas fuera de la hilera de siembra reduce el sombreado entre las plantas vecinas, pero aumenta el auto-sombreado. Entonces, ¿el desarrollo de esta respuesta genera un beneficio para las plantas que crecen dentro de una hilera de siembra?

Para responder esta pregunta analizamos el sombreado mutuo y la producción de semillas planta por planta dentro de la hilera. Observamos que los individuos que no acomodan sus hojas hacia los laterales como los mutantes *sav-3* presentaron un menor

costo de auto-sombreado (figura 4.8.A), pero se sombrearon más mutuamente y el 55% de individuos de la hilera de siembra presentó más de un 20% de su área foliar sombreada por sus vecinos (figura 4.10), lo cual se traduce en una mayor cantidad de individuos con pobre *fitness* (figura 4.11.B). Es decir, que los individuos con menor capacidad competitiva son más vulnerables de ser sombreados muy intensamente y esto repercute en su rendimiento reproductivo. Sin embargo, en hileras puras de plantas Col sólo un 5% de individuos presentó más de un 20% de su área foliar sombreada, pero lo más interesante fue que los individuos tuvieron un rendimiento en semillas por encima de los 25 mg. Por otro lado, cabe destacar que todas las plantas de ambas accesiones cultivadas aisladas de vecinas presentaron un rendimiento por encima de los 25 mg. Es decir, que plantas que reconocen a su vecina como pariente y acomodan las hojas hacia los laterales superan el mismo nivel de rendimiento que aquellas plantas que crecen sin competencia por el recurso lumínico.

El mayor costo que genera el auto-sombreado en plantas Col que acomodan sus hojas hacia los laterales es rápidamente compensado por el menor sombreado mutuo (donde las hojas más nuevas con mayor capacidad fotosintética tienen mayores riesgos de ser sombreadas por las plantas vecinas). A partir de estos resultados podemos concluir que el hecho de acomodar las hojas hacia los laterales en respuesta a los vecinos emparentados les genera un beneficio a las plantas Col, ya que todas las plantas de la hilera alcanzan un *fitness* comparable a las plantas cultivadas aisladas de vecinos que no compiten por los recursos, en cambio en hileras de plantas *sav-3* que no acomodan sus hojas algunos individuos presentan niveles muy bajo de *fitness* comparado con otros (figura 4.11.A). Con esto demostramos que la respuesta de acomodar las hojas dentro de la hilera de siembra se asemeja más a un comportamiento cooperativo que competitivo, donde todos los individuos de la hilera se encuentran beneficiados en sus niveles de *fitness.*

De los resultados obtenidos podemos decir que las plantas que acomodan sus hojas hacia los laterales presentan un mayor auto-sombreado (figura 4.8.A, 5.8 y 5.9). En las hileras donde crecieron plantas Col con vecinas *sav-3* no se midieron los índices de auto-sombreado, pero podemos suponer que Col; que acomoda sus hojas hacia los

laterales (figura 4.12.A), se auto-sombrea más que *sav-3* (que no acomoda sus hojas). Teniendo en cuenta que *sav-3* presentó mayor área expuesta que Col (figura 4.12.B), podemos pensar que también intercepta más el recurso lumínico disponible. Entonces en este caso, el mayor costo de auto-sombreado en Col no es compensado por un menor sombreado por las plantas vecinas; ya que exponen menos área para interceptar la luz que sus vecinas *sav-3.* Con lo cual, el costo (auto-sombreado) es rápidamente compensado (menor sombreado mutuo) cuando todas las plantas dentro de la hilera ordenan sus hojas hacia los laterales y lo cual resulta beneficioso en el *fitness* inclusivo de las plantas cultivadas en la misma hilera de siembra. Entonces, la respuesta de reordenamiento de las hojas hacia los laterales donde hay mayor disponibilidad de luz, puede ser interpretada como un carácter favorable, ya que reduce el riesgo de caídas en los niveles de *fitness.*

6.2.5 El reordenamiento de las hojas en el plano horizontal requiere el reconocimiento de parientes.

Los resultados demostraron que para que las hojas se dispongan hacia el entresurco cuando se cultivan plantas en sistemas de alta rectangularidad, éstas deben ser genéticamente iguales (figura 4.2.A), pero además debe existir homogeneidad en el cuerpo de las mismas (figura 4.2.B). Con lo cual podemos concluir que bajo ciertas condiciones de crecimiento las plantas pueden responder diferencialmente hacia vecinos estrechamente emparentados. En este caso también existe un reconocimiento de individuos de la misma camada (camadas distintas se diferencian por la estructura aérea), con lo cual suponemos que el factor clave para esta respuesta de reordenamiento de las hojas es la estructura aérea de la planta (figura 4.2.C).

Por otro lado, cabe destacar que en nuestros ensayos las plantas fueron cultivadas en macetas individuales por lo que no existieron interacciones entre sus raíces. Si bien en algunos casos como lo mencionan Murphy y Dudley (2009) y Dudley y File (2007), es necesario que exista interacción entre las raíces para el reconocimiento de parientes, esta

no es una condición imprescindible para que haya reconocimiento entre plantas de una misma progenie. Nuestros resultados demuestran que plantas de distintas accesiones como Col y *Ler* que presentan diferencias en su estructura morfológica aérea, también presentan diferencias en el perfil vertical de la relación R/RL que generan (figura 4.3). Esto nos permitió pensar que las plantas de Arabidopsis perciben el patrón lumínico que genera la estructura y tamaño morfológico de la planta vecina, y de esta manera pueden discriminar entre individuos parientes o extraños.

Este estudio provee evidencia que apoya la hipótesis de que las plantas tienen la capacidad de reconocer individuos emparentados. Nosotros demostramos que existe reconocimiento de parientes en plantas de A. thaliana y es a través de un mecanismo que se da en individuos que comparten fenotipos similares denominado "*phenotype matching"*, mediante el cual un individuo compara las señales fenotípicas de otros individuos de la población con las propias para determinar el parentesco (Biedrzycki and Bais, 2010), en este caso la señal de reconocimiento es el perfil vertical de la relación R/RL que las plantas generan. Es un mecanismo que depende de una correlación entre el genotipo y el fenotipo, las plantas además de ser genéticamente iguales deben tener la misma estructura morfológica aérea para ser reconocidas como parientes, recordemos que plantas del mismo genotipo pero con distinto tamaño corporal no se reconocen como "hermanas". Dado que esta respuesta de reorientación de las hojas depende de las señales de luz azul, en un futuro sería interesante evaluar si las mismas también están involucradas en el reconocimiento de parientes y estudiar los perfiles verticales de luz azul generados por diferentes accesiones. Los perfiles verticales de luz azul obtenidos hasta el presente resultan muy variables para discernir si esta señal contribuye a distinguir entre individuos emparentados y no emparentados o simplemente a distinguir entre presencia o ausencia de vecinos. Por el momento podemos afirmar que las señales de luz azul son necesarias pero no suficientes para responder a los vecinos emparentados.

6.2.6 Plantas "hermanas" creciendo en hileras presentan beneficio mutuo.

Dudley y File (2007) demostraron que las plantas de la especie *Cakile edentula* discriminan a otras plantas que no son de la misma progenie en interacciones de competencia. Cuando estas plantas crecían en macetas con parientes (plantas derivadas de semillas colectadas de la misma planta madre), la biomasa de la raíz era menor que cuando crecían con vecinos extraños (plantas de la misma especie, pero crecidas de semillas colectadas de diferentes plantas madres). En su trabajo los autores sugieren que las interacciones a nivel de las raíces podrían proporcionar la señal para el reconocimiento de plantas emparentadas, y que dichas interacciones son las responsables de la competencia limitada en individuos que comparten el mismo recurso. Estudios realizados en *Impatiens cf. pallida* por Murphy y Dudley (2009) proveen evidencia que apoyan la hipótesis de reconocimiento de parientes; y que la interacción entre las raíces es necesaria para el reconocimiento de parientes, como había sido observado unos años antes en *Cakile edentula* por Dudley y File (2007). En contraste a *C. edentula*, sin embargo, *I. cf. pallida* incrementa la asignación de caracteres competitivos hacia las estructuras aéreas de la planta en lugar de las estructuras subterránea en respuesta a vecinos extraños. Entonces, grupos de parientes podrían cooperar reduciendo el grado de competencia, mientras que grupos de extraños podrían tener una relación de competencia más intensa. Estos trabajos demostraron que la respuesta diferencial hacia parientes o extraños son respuestas especie-específicas, y que cuando hay reconocimiento de parientes disminuye la competencia.

El estudio hecho en *C. edentula* generó posturas muy controvertidas desde el punto de vista experimental, y en las conclusiones a las que llegaron, ya que un menor crecimiento de las raíces no necesariamente implica menor competencia, ni que esa menor competencia se traduzca en un mayor *fitness* inclusivo entre plantas hermanas (Dudley and File, 2008; Klemens, 2008).

Dado que numerosos estudios demuestran que las raíces responden diferencialmente a raíces de vecinos dependiendo del genotipo, de la especie, de las relaciones parentales, y si el vecino es el mismo o no; Biedrzycki *et al.* (2010) concluye que las plantas son capaces de alterar el crecimiento de sus raíces de acuerdo a la presencia o ausencia de vecinos específicos. Dudley y File, (2007) proponen el

reconocimiento de parientes a través de las raíces y que es el menor crecimiento de las raíces lo que facilita el desarrollo de los parientes que viven en el mismo habitat. Pero, ¿es el reconocimiento de parientes a través de interacciones químicas entre raíces (Mahall and Callaway, 1991; Mahall and Callaway, 1992; Falik *et al.*, 2003; Gruntman and Novoplansky, 2004; Perry *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2006) lo que determina que el crecimiento de las raíces en grupos de parientes sea menor que con grupos de extraños? O, ¿este menor crecimiento de las raíces en grupos de hermanos se debe a que compiten más entre sí al tomar recursos del mismo lugar y por lo tanto crecen menos?

Biedrzycki et al. (2010) presentaron experimentos que sugieren que el reconocimiento de parientes en plantas de Arabidopsis puede ser a través de interacciones químicas de las raíces. Estos autores encontraron que la exposición de plantas a exudados de raíces de extraños indujo mucho más la formación de raíces laterales que la exposición a exudados de parientes, sin embargo cuando utilizaron un inhibidor de la secreción las plantas no reconocieron a los extraños. Este trabajo favorece las conclusiones de Dudley y File (2007), porque efectivamente demostraron que puede existir reconocimiento de parientes a través de interacciones de raíces y que dichas interacciones determinan el menor crecimiento de las raíces, excluyendo la posibilidad de una competencia exacerbada por los mismos recursos. Mientras que algunos estudios han reportado que las plantas tienen mejor producción de biomasa y/o semillas cuando crecen en competencia con hermanas (Willson *et al.*, 1987; Donohue, 2003; Dudley and File, 2007; Murphy and Dudley, 2009), otros han reportado efectos opuestos (Allard and Adams, 1969; Milla *et al.*, 2009).

La teoría de selección de parentesco predice que individuos que viven con parientes podrían invertir menos en competencia, permitiendo un mejor rendimiento reproductivo comparado con individuos que viven con extraños (Hamilton, 1964). En este sentido habría un comportamiento más altruista hacia los individuos relacionados que hacia los individuos no relacionados. Dudley y File (2007) argumentan que los parientes fueron menos competitivos que los extraños, por eso el menor crecimiento de las raíces.

Masclaux et al., (2009) en un estudio hecho en Arabidopsis, encontraron una gran diferencia en las habilidades competitivas de las distintas accesiones testeadas, sin embargo no encontraron efectos de individuos relacionados o no relacionados sobre el *fitness*; por lo tanto ellos cuestionan las diferencias encontradas en otros trabajos, por ej.: Andalo *et al.*, 2001 y plantean que las asociaciones hechas dentro de grupos relacionados y *fitness* o reproductividad pueden ser debidas a las diferencias entre los genotipos en cuanto a las capacidades competitivas.

En contraste a la teoría de selección de parentesco, el particionamiento del recurso o particionamiento del nicho, predice que la competencia de individuos no relacionados dentro de un grupo permitiría la repartición de los recursos más eficientemente que los individuos relacionados y de esta manera los individuos no relacionados obtendrían mayores *fitness* (Young, 1981; Price and Waser, 1982).

Milla et al. (2009) encontraron signos de reconocimiento de parientes a través de interacciones de raíces, pero no detectaron ningún efecto sobre el *fitness* individual o de grupo (Milla *et al.*, 2009). Sus estudios evidencian al igual que otros previos (Allard and Adams, 1969; Schmitt and Ehrhardt, 1987; Kelley, 1989; Cheplick and Kane, 2004) que individuos que viven en la vecindad con extraños alcanzan altos niveles de *fitness.* Estos resultados apoyan la teoría de que individuos no relacionados particionan mejor los recursos y por lo tanto compiten menos. Además, Milla et al. (2009) encontraron evidencias de competencia temprana por la luz en grupos de parientes, dado que estos crecían más lento en las primeras etapas del desarrollo. Por otro lado estos autores sugieren que componentes del *fitness* no siempre correlacionan positivamente; ya que encontraron que familias de plantas con el mejor crecimiento vegetativo, no fueron la que obtuvieron el mejor rendimiento (Milla *et al*., 2009).

Experimento hechos en el campo permitieron también argumentar que la inversión en raíces genera un *trade off* con la asignación de recursos reproductivos (Gersani *et al.*, 2001). Y, si pensamos en la teoría de repartición de los recursos, las plantas en la vecindad con extraños pueden invertir menos en raíces, debido a un más eficiente particionamiento de los recursos, y asignar más recursos para la reproducción. Teniendo

esto en cuenta, Milla *et al*., (2009) cuestiona que entonces el patrón observado por Dudley y File (2007) es poco probable.

Sin embargo, el uso de macetas es un artefacto que arroja dudas en la mayoría de las evidencias previas que consideran este *trade off* (Hess and De Kroon, 2007); ya que estos autores proponen que el mayor crecimiento de las raíces en presencia de otras plantas, estarían dadas por la mayor disponibilidad del volumen del suelo; por lo cual no sería por una mayor competencia entre individuos extraños. Si la disponibilidad de nutrientes totales es la misma para ambas condiciones, el peso de la planta es mayor cuando se producen más raíces, si la biomasa total es la misma; cuando se divide por la biomasa de las raíces, da una menor biomasa reproductiva; pero al considerar esto como un *fitness* menor, los que desarrollan más raíces no es porque compiten con sus vecinos no parientes, sino porque tienen más espacio en el suelo porque aprovechan distintos perfiles.

La otra posibilidad es que la sobre producción de raíces no tenga un *trade off* con el tamaño o biomasa reproductiva, es más, esto puede promover una mayor adquisición de recursos, permitiendo una mayor biomasa de la planta y reproducción en general. En este caso, como la producción de raíces fue mayor en presencia de extraños (Dudley and File, 2007), podría permitir un patrón opuesto al esperado bajo selección de parentesco, donde el mejor *fitness* sea conseguido en convivencia con extraños, esto es justamente lo que encontró Milla *et al*. (2009) y por eso cuestiona también la falta de evidencia y conclusiones a priori tomadas en el trabajo de Dudley y File (2007).

Nosotros estudiamos qué ocurría con el reconocimiento de parientes en un carácter que no produce reducciones inmediatas en el crecimiento, lo que nos permitió evadir el problema de las distintas posibles interpretaciones como cuando se estudian caracteres donde se mide crecimiento.

La capacidad para discriminar entre parientes y extraños es un importante elemento del comportamiento social. El reconocimiento de parientes es especialmente ventajoso bajo situaciones de competencia, si evita los costos de un comportamiento

competitivo hacia sus parientes o promueve la cooperación entre individuos de una misma progenie (Axelrod and Hamilton, 1981; Waldman, 1988). Dado que las plantas viven a menudo en grupos de vecinos altamente relacionados, el reconocimiento de parientes es probable que evolucione (Waldman, 1988). Los caracteres que tienen plasticidad fenotípica en respuesta a otras plantas son candidatos a caracteres competitivos que pueden afectar el *fitness* de plantas vecinas y por lo tanto más probables a discriminar entre parientes. Estos caracteres incluyen cambios en la asignación de recursos a raíces, tallos y hojas, como también número de ramas, altura de la planta y elongación del tallo. Esto fue observado previamente en *Impatiens capensis* (Dudley and Schmitt, 1995; 1996). Sin embargo, la orientación de las hojas hacia los laterales en plantas cultivadas en hileras también es un carácter que expresa plasticidad fenotípica en respuesta a otras plantas y afecta el *fitness* de las plantas cultivadas en hileras de siembra (figura 4.11).

En función de lo expuesto podemos concluir que esta respuesta de reordenamiento de las hojas hacia los laterales se manifiesta cuando existe reconocimiento entre parientes entre individuos cultivados en una misma hilera de siembra. Las plantas Col que acomodan sus hojas se sombrean menos entre ellas si lo comparamos con las plantas *sav-3* que no acomodan sus hojas (figura 4.8.B), lo que sugiere que el hecho de acomodar las hojas hacia los laterales disminuye la competencia por el recurso lumínico, con lo cual esta respuesta se asemeja más a un comportamiento cooperativo.

Un comportamiento cooperativo o altruista es comúnmente asociado con costos para el individuo cooperativo, y es beneficioso para otro individuo. La evolución de la cooperación entre individuos no relacionados es atribuida frecuentemente al término altruismo recíproco, donde un acto cooperativo incrementa la probabilidad de beneficiarse de la cooperación en futuras interacciones (Rutte and Pfeiffer, 2009). Sin embargo, cuando la cooperación podría proveer un beneficio de *fitness* directo sobre el actor, esto sería en realidad beneficio mutuo (West and Gardner, 2010). Según West & Gardner (2010), el uso del término altruismo recíproco, define al altruismo por las consecuencias de *fitness* a corto plazo, pero la selección natural opera sobre consecuencias de *fitness* a largo plazo (toda la vida), no sobre plazos cortos arbitrarios. Entonces, el altruismo

recíproco no es realmente altruismo, y por lo tanto el mejor término es el de beneficio mutuo. Ellos clasifican un comportamiento cooperativo como altruista a aquel en donde el actor sufre una disminución sobre su *fitness* directo (es decir que es costoso) y cuyo comportamiento es favorecido si es dirigido hacia individuos relacionados y estos son beneficiados por un incremento en su *fitness* directo. En cambio, un comportamiento cooperativo es definido como beneficio mutuo cuando puede estar dirigido hacia individuos relacionados o no, y tanto el actor como el destinatario se benefician, por un incremento del *fitness* directo.

Tomando en cuenta estos conceptos, podemos decir que las plantas Col cuando crecen dentro de una hilera de siembra, al acomodar sus hojas hacia el entresurco donde hay mayor disponibilidad de luz (figura 4.1.B), manifiestan un comportamiento caracterizado por el beneficio mutuo. Donde el costo (un incremento del auto-sombreado) es rápidamente compensado por una reducción en el sombreado mutuo (figura 4.8). Esto se ve reflejado en que cada individuo dentro de la hilera de siembra presenta un rendimiento en la producción de semillas por encima de 25 mg, comparable al de las plantas que crecen aisladas sin competencia por el recurso lumínico. Las plantas Col se benefician de este comportamiento cooperativo, no así las plantas *sav-3* que presentan un comportamiento más competitivo con sus vecinas por el recurso lumínico.

La cooperación puede evolucionar a través de diferentes mecanismos de altruismo recíproco (o beneficio mutuo) que están basados en diferentes tipos de información (Rutte and Pfeiffer, 2009), entre ellos uno es el de reciprocidad directa, el cual requiere que los individuos interactúen con un único compañero durante algún tiempo o requiere de habilidades cognitivas como ser el reconocimiento individual y algo de memoria para recordar las consecuencias de interacciones pasadas con cada compañero potencial (Rutte and Pfeiffer, 2009). En nuestro caso, este comportamiento cooperativo de acomodar las hojas hacia los laterales en plantas Col cultivadas en hileras ocurre por el reconocimiento de la planta vecina como pariente, percibida por la señal en el perfil vertical de la relación R/RL que las mismas generan. Dada la naturaleza sésil de las plantas, se cumple con el requisito de interacciones persistentes con un mismo individuo.

Cuando se cultivaron plantas Col junto con mutantes *sav-3* en una hilera de siembra, las plantas Col reconocieron a *sav-3* como pariente y acomodaron las hojas hacia los entresurcos (figura 4.12.A), en cambio *sav-3* no acomodó sus hojas y en consecuencia presentó mayor área expuesta lo que le permitiría interceptar mayor cantidad de luz que su vecino Col (figura 4.12.B); en base a esto podemos decir que *sav-3* presenta un comportamiento egoísta con respecto a su vecino Col. Un comportamiento egoísta es aquel que es costoso para el destinatario (en nuestro caso Col es sombreado por su vecino *sav-3* y por lo tanto presenta menor área expuesta con lo cual podría interceptar menos cantidad de luz), pero provee un beneficio para el actor (*sav-3* que no acomoda sus hojas hacia los laterales, sombrea a Col y en consecuencia presenta mayor área expuesta que le permitiría interceptar más luz). Este beneficio es a menudo una reducción de la competencia a futuro por los recursos, para el actor o para sus descendientes; en este caso las consecuencias sobre el *fitness* directo se consideran a corto plazo y no durante la vida del actor (West and Gardner, 2010). La alta capacidad competitiva de *sav-3* con vecinos parientes está ligada posiblemente a la incapacidad de elevar las hojas hacia los estratos más altos del canopeo (Tao *et al.*, 2008) donde las señales de R/RL son mayores. Este costo podría mantener el comportamiento egoísta de *sav-3* en el tiempo evolutivo.

El reconocimiento de parentesco genera un beneficio mutuo donde todos los individuos dentro de la hilera de siembra son beneficiados por este comportamiento cooperativo. Los mecanismos de reconocimiento de parentesco son altamente diversos y pueden o no presentarse en una especie. A pesar de que existen trabajos que refutan la posibilidad de reconocimiento de parentescos en plantas, incluso en Arabidopsis (Masclaux *et al.*, 2010) porque no encontraron evidencias de cambios en el crecimiento de las plantas o *fitness* reproductivo en sus estudios, existen otros trabajos como el nuestro que apoyan la existencia de reconocimiento de parentesco en esta especie (Biedrzycki *et al.*, 2010). Así como en animales la diversidad en el reconocimiento de parentesco esta presente entre las especies y en determinados ambientes, la diversidad también existe en especies de plantas (Biedrzycki *et al.*, 2010), incluso el reconocimiento de parentesco puede depender de la respuesta estudiada en determinadas condiciones de crecimiento de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Ahmad, M., Lin, C. & Cashmore, A.R. (1995) Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive antocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Journal* **8**, 653-658.

Allard, R.W. & Adams, J. (1969) Population Studies in Predominantly Self-Pollinating Species. XIII. Intergenotypic Competition and Population Structure in Barley and Wheat. *The American Naturalist* **103**, 621-645.

Andalo, C., Goldringer, I. & Godelle, B. (2001) Inter- and Intragenotypic Competition under Elevated Carbon Dioxide in Arabidopsis thaliana. *Ecology* **82**, 157-164.

Andrieu, B., Ivanov, N. & Boissard, P. (1995) Simulation of light interception from a maize canopy model constructed by stereo plotting. *Agric. For Meteorol* **75**, 103-119.

Aukerman, M.J., Hirschfeld, M., Wester, L., Weaver, M., Clack, T., Amasino, R.M. & Sharrock, R.A. (1997) A deletion in the *PHYD* gene of the Arabidopsis Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell* **9**, 1317-1326.

Axelrod, R. & Hamilton, W.D. (1981) The evolution of cooperation. *Science* **211**, 1390-1396.

Bainbridge, K., Guyomarc'h, S., Bayer, E., Swarup, R., Bennett, M., Mandel, T. & Kuhlemeier, C. (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev* **22**, 810-823.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. & Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 233-266.

Ballaré, C.L. (1994) Light gaps: sensing the light opportunities in highly dynamic canopy environments. *In Exploitation of environmental heterogeneity by plants. Ecophysiological processes above and belowground, Caldwell, M.,Pearcy, R., eds (San Diego, CA: Academic Press)*, 73-110.

Ballaré, C.L., Casal, J.J. & Kendrick, R.E. (1991a) Responses of light-grown wild-type and long-hypocotyl mutant cucumber seedlings to natural and simulated shade light. *Photochemistry and Photobiology* **54**, 819-826.

Ballaré, C.L., Casal, J.J. (2000) Light signals perceived by crop and weed plants. *Field Crops Research* **67**, 149-160.

Ballaré, C.L., Sánchez, R.A., Scopel, A.L., Casal, J.J. & Ghersa, C.M. (1987) Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlight. *Plant, Cell and Environment* **10**, 551-557.

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

Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, R.A. (1991b) Photocontrol of stem elongation in plant neighbourhoods: effects of photon fluence rate under natural conditions of radiation. *Plant, Cell and Environment* **14**, 57-65.

Ballaré, C.L., Scopel, A.L. & Sánchez, R.A. (1997) Foraging for light: photosensory ecology and agricultural implications. *Plant, Cell and Environment* **20**, 820-825.

Biedrzycki, M.L. & Bais, H.P. (2010) Kin recognition in plants: a mysterious behaviour unsolved. *Journal of Experimental Botany* **61**, 4123-4128.

Biedrzycki, M.L., Jilany, T.A., Dudley, S.A. & Bais, H.P. (2010) Root exudates mediate kin recognition in plants. *Communicative and Integrative Biology* **3**, 28-35.

Boardman, N.K. (1977) Comparative Photosynthesis of Sun and Shade Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **28**, 355-377.

Boccalandro, H.E., De Simone, S.N., Bergmann-Honsberger, A., Schepens, I., Fankhauser, C. & Casal, J.J. (2008) Phytochrome kinase substrate1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiology* **146**, 108-115.

Boccalandro, H.E., Rugnone, M.L., Moreno, J.E., Ploschuk, E.L., Serna, L., Yanovsky, M.J. & Casal, J.J. (2009) Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in arabidopsis. *Plant Physiology* **150**, 1083-1092.

Boonman, A., Anten, N.P., Dueck, T.A., Jordi, W.J., van der Werf, A., Voesenek, L.A. & Pons, T.L. (2006) Functional significance of shade-induced leaf senescence in dense canopies: an experimental test using transgenic tobacco. *American Naturalist* **168**, 597-607.

Braun, N., Wyrzykowska, J., Muller, P., David, K., Couch, D., Perrot-Rechenmann, C. & Fleming, A.J. (2008) Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* **20**, 2746-2762.

Briggs, W. & Christie, J. (2002) Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204-210.

Briggs, W.R., Beck, C.F., Cashmore, A.R., Christie, J.M., Hughes, J., Jarillo, J.A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M. & Watson, J.C. (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**, 993-997.

Callaway, R.M. & Mahall, B.E. (2007) Plant ecology: Family roots. *Nature* **448**, 145-147.

Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M.G., Inoue, S., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K., Hangarter, R. & Fankhauser, C. (2010) The Arabidopsis PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiology* **152**, 1391-1405.

Casal, J.J. (1988) Light quality effects on the appearance of tillers of different order in wheat (*Triticum aestivum*). *Annals of Applied Biology* **112**, 167-173.

Casal, J.J., Ballaré, C.L., Tourn, M. & Sánchez, R.A. (1994) Anatomy, growth and survival of a long-hypocotyl mutant of *Cucumis sativus* deficient in phytochrome B. *Annals of Botany* **73**, 569-575.

Casal, J.J., Luccioni, L.G., Oliverio, K.A. & Boccalandro, H.E. (2003) Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochemestry & Photobiology Sciences* **2**, 625-698.

Casal, J.J., S nchez, R.A. & Deregibus, V.A. (1986) The effect of plant density on tillering: The involvement of R/FR and the proportion of radiation intercepted per plant. . *Environmental and Experimental Botany* **26**, 365-371.

Casal, J.J., Sánchez, R.A. & Deregibus, V.A. (1987.) Tillering responses of Lolium multiflorum plants to changes of red/far-red ratio typical of sparse canopies. *Journal of Experimental Botany* **38**, 1432-1439.

Casal, J.J. & Smith, H. (1989.) The function, action and adaptive significance of phytochrome in light-grown plants. . *Plant, Cell and Environment* **12**, 855-862.

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J. & Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.

Cipollini, D.F. & Schultz, J.C. (1999) Exploring Cost Constraints on Stem Elongation in Plants Using Phenotypic Manipulation. *The American Naturalist* **153**, 236-242.

Clack, T., Mathews, S. & Sharrock, R.A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Molecular Biology* **25**, 413-427.

Corré, W.J. (1983) Growth and morphogenesis of sun and shade plants II. The influence of light quality. *Acta Bot. Neerl.* **32**, 185-202.

Cheplick, G.P. & Kane, K.H. (2004) Genetic relatedness and competition in Triplasis purpurea (Poaceae): resource partitioning or kin selection? . *International Journal of Plant Sciences* **165**, 623-630.

Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E. & Briggs, W.R. (1998) *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.

Darwin, C. (1859) On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life, (John Murray, London, UK).

Dehesh, K., Franci, C., Parks, B.M., Seeley, K.A., Short, T.W., Tepperman, J.M. & Quail, P.H. (1993) Arabidopsis hy8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**, 1081-1088.

Deregibus, V.A., Sanchez, R.A. & Casal, J.J. (1983) Effects of light quality on tiller production in *Lolium* spp. *Plant Physiology* **72**, 900-902.

Deregibus, V.A., Sánchez, R.A., Casal, J.J. & Trlica, M.J. (1985) Tillering responses to enrichment of red light beneath the canopy in a humid natural grassland. *Journal of Applied Ecology* **22**, 199-206.

Devlin, P., Patel, S.R. & Whitelam, G.C. (1998) Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1479-1488.

Devlin, P.F., Halliday, K.J., Harberd, N.P. & Whitelam, G.C. (1996) The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant Journal* **10**, 1127-1134.

Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A. & Whitelam, G.C. (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in Arabidopsis by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiology* **119**, 909-915.

Donohue, K. (2003) The influence of neighbor relatedness on multilevel selection in the Great Lakes sea rocket. *Am Nat* **162**, 77-92.

Donohue, K., Pyle, E.H., Messiqua, D., Heschel, M.S. & Schmitt, J. (2001) Adaptive divergence in plasticity in natural populations of Impatiens capensis and its consequences for performance in novel habitats. *Evolution* **55**, 692-702.

Dudley, S.A. & File, A.L. (2007) Kin recognition in an annual plant. *Biology Letters* **3**, 435-438.

Dudley, S.A. & File, A.L. (2008) Yes, kin recognition in plants! *Biology Letters* **4**, 69-70.

Dudley, S.A. & Schmitt, J. (1995) Genetic differentiation in morphological responses to simulated foliage shade between populations of *Impatiens capensis* from open and woodland sites. *Functional Ecology* **9**, 655-666.

Dudley, S.A. & Schmitt, J. (1996) Testing the adaptive plasticity hypothesis: Density-dependent selection on manipulated stem length in *Impatiens capensis*. *The American Naturalist* **147**, 445-465.

Faigón-Soverna, A., Harmon, F.G., Storani, L., Karayekov, E., Staneloni, R.J., Gassmann, W., Más, P., Casal, J.J., Kay, S.A. & Yanovsky, M.J. (2006) A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in Arabidopsis photomorphogenic development. *Plant Cell* **18**, 2919-2928.

Falik, O., Reides, P., Gersani, M. & Novoplansky, A. (2003) Self/non-self discrimination in roots. *Journal of Ecology* **91**, 525-531.

Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. & Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* **284**, 1539-1541.

Franklin, K.A. (2008) Shade avoidance. *New Phytol* **179**, 930-944.

Franklin, K.A., Davis, S. J., Stoddart, W. M., Vierstra, R. D., Whitelam, G. C. (2003) Mutant analyses define roles for phytochrome C in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell* **15**, 1981-1989.

Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J. & Whitelam, G.C. (2003) Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 1340-1346.

Franklin, K.A. & Whitelam, G.C. (2005) Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of Botany* **96**, 169-175.

Friml, J. (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 7-12.

Friml, J. & Palme, K. (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* **49**, 273-284.

Gálvez, D. & Pearcy, R.W. (2003) Petiole twisting in the crowns of *Psychotria limonensis*: Implications for light interception and daily carbon gain. *Oecologia* **135**, 22-29.

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

Gersani, M., Brown, J.s., O'Brien, E.E., Maina, G.M. & Abramsky, Z. (2001) Tragedy of the commons as a result of root competition. *Journal of Ecology* **89**, 660-669.

Goodnight, C., J., (1985) The Influence of Environmental Variation on Group and Individual Selection in a Cress. *Evolution* **39**, 545-558.

Gruntman, M. & Novoplansky, A. (2004) Physiologically mediated self/non-self discrimination in roots. *Proccedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 3863-3867.

Halliday, K.J., Koornneef, M. & Whitelam, G.C. (1994) Phytochrome B and at least one other phytochrome mediate the accelerated flowering response of Arabidopsis thaliana L. to low red/far-red ratio. *Plant Physiology* **104**, 1311-1315.

Hamilton, W.D. (1964) The genetical evolution of social behaviour. *Journal of Theorical Biology* **7**, 1-52.

Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Murtuo, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K. & Liscum, E. (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plan Cell* **12**, 757-770.

Heindl, J.C. & Brun, W.A. (1983) Light and shade effects on abscission and ^{14}C-photoassimilate partition among reproductive structrures in soybean. *Plant Phisiology* **73**, 434-439.

Hess, L. & De Kroon, H. (2007) Effects of rooting volume and nutrient availability as an alternative explanation for root self/non-self discrimination. *Journal of Ecology* **95**, 241-251.

Holmes, M.G. & Smith, H. (1977) The function of phytochrome in the natural environment. II. The influence of vegetation canopies on the spectral energy distribution of natural daylight. *Photochemistry and Photobiology* **25**, 539 - 545.

Holland, J.J., Roberts, D. & Liscum, E. (2009) Understanding phototropism: from Darwin to today. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1969-1978.

Inoue, S., Kinoshita, T., Takemiya, A., Doi, M. & Shimazaki, K. (2008) Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light. *Mol Plant* **1**, 15-26.

Izaguirre, M.M., Mazza, C.A., Biondini, M., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2006) Remote sensing of future competitors: Impacts on plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 7170-7174.

Jarillo, J.A., Ahmad, M. & Cashmore, A.R. (1998) NPL1 (accession no. AF053941): a second member of the NPH serine/threonine kinase family of Arabidopsis. *Plant Physiology* **117**, 719.

Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. & Cashmore, A.R. (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplasts relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954.

Kahlen, K., Wiechers, D. & StuÌˆtzel, H. (2008) Modelling leaf phototropism in a cucumber canopy. *Functional Plant Biology* **35**, 876-884.

Kanyuka, K., Praekelt, U., Franklin, K.A., Billingham, O.E., Hooley, R., Whitelam, G.C. & Halliday, K.J. (2003) Mutations in the huge Arabidopsis gene BIG affect a range of hormone and light responses. *The Plant Journal* **35**, 57-70.

Kebrom, T.H. & Brutnell, T.P. (2007) The molecular analysis of the shade avoidance syndrome in the grasses has begun. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3079-3089.

Keiller, D. & Smith, H. (1989) Control of carbon partitioning by light quality mediated by phytochrome. *Plant Science* **63**, 25-29.

Keller, C.P. & Van Volkenburgh, E. (1997) Auxin-Induced Epinasty of Tobacco Leaf Tissues (A Nonethylene-Mediated Response). *Plant Physiol* **113**, 603-610.

Kelley, S.E. (1989) Experimental Studies of the Evolutionary Significance of Sexual Reproduction. VI. A Greenhouse Test of the Sib-Competition Hypotheses. *Evolution* **43**, 1066-1074.

Klemens, J.A. (2008) Kin recognition in plants? *Biology Letters* **4**, 67-68.

Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. & Franklin, K.A. (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology* **19**, 408-413.

Kurepin, L.V., Emery, R.J.N., Pharis, R.P. & Reid, D.M. (2007) Uncoupling light quality from light irradiance effects in Helianthus annuus shoots: putative roles for plant hormones in leaf and internode growth. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2145-2157.

Lariguet, P., Boccalandro, H.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Chory, J., Casal, J.J. & Fankhauser, C. (2003) A growth regulatory loop that provides homeostasis to phytochrome A signaling. *Plant Cell* **15**, 2966-2978.

Lariguet, P. & Fankhauser, C. (2004) Hypocotyl growth orientation in blue light is determined by phytochrome A inhibition of gravitropism and phototropin promotion of phototropism. *Plant Journal* **40**, 826–834.

Li, L.C., Kang, D.M., Chen, Z.L. & Qu, L.J. (2007a) Hormonal regulation of leaf morphogenesis in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 75-80.

Li, L.C., Kang, D.M., Chen, Z.L. & Qu, L.J. (2007b) Hormonal regulation of leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **49**, 75-80.

Libenson, S., Rodriguez, V., Sánchez, R.A. & Casal, J.J. (2002) Low red to far-red ratios reaching the stem reduce grain yield in sunflower. *Crop Science* **42**, 1180-1185.

Lin, C. (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14**, S207-225.

Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J. & A, C. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedlings of the National Academic of Sciencies* **95**, 2686-2690.

Maddonni, G.A., Chelle, M., Drouet, J.L. & Andrieu, B. (2001) Light interception of contrasting azimuth canopies under square and rectangular plant spatial distributions: simulations and crop measurements. *Field Crops Research* **70**, 1-13.

Maddonni, G.A., Otegui, M.E., Andrieu, B., Chelle, M. & Casal, J.J. (2002) Maize leaves turn away from neighbors. *Plant Physiology* **130**, 1181-1189.

Mahall, B.E. & Callaway, R.M. (1991) Root communication among desert shrubs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A* **88**, 874-876.

Mahall, B.E. & Callaway, R.M. (1992) Root communication mechanisms and intracommunity distributions of two Mojave Desert shrubs. *Ecology* **73**, 2145-2151.

Mahall, B.E. & Callaway, R.M. (1996) Effects of regional origin and genotype in intraspecific root communication in the desert shrub Ambrosia dumosa (Asteraceae). *American Journal of Botany* **83**, 93-98.

Masclaux, F., Hammond, R.L., Meunier, J., Gouhier-Darimont, C., Keller, L. & Reymond, P. (2010) Competitive ability not kinship affects growth of Arabidopsis thaliana accessions. *New Phytologist* **185**, 322-331.

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

Middleton, L. (2001) Shade-tolerant flowering plants: adaptations and horticultural implications *Acta Horticulturae (ISHS)* **552**, 95-102.

Milla, R., Forero, D.M., Escudero, A. & Iriondo, J.M. (2009) Growing with siblings: A common ground for cooperation or for fiercer competition among plants? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 2531-2540.

Millenaar, F.F., van Zanten, M., Cox, M.C., Pierik, R., Voesenek, L.A. & Peeters, A.J. (2009) Differential petiole growth in Arabidopsis thaliana: photocontrol and hormonal regulation. *New Phytol* **184**, 141-152.

Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Philips, S. & Quail, P.H. (2003) Isolation and Characterization of *phyc* Mutantants in Arabidopsis Reveals Complex Crosstalk between Phytochrome Signaling Pathways. *The Plant Cell* **15**, 1962-1980.

Morelli, G. & Ruberti, I. (2002) Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiology* **122**, 621-626.

Morgan, D. & Smith, H. (1978a) Simulated sunflecks have large, rapid effects on plant stem extension. *Nature* **273**, 534-536.

Morgan, D.C., O'Brien, T. & Smith, H. (1980) Rapid photomodulation of stem extension in light-grown Sinapis alba L. Studies on kinetics, site of perception and photoreceptor. *Planta* **150**, 95-101.

Morgan, D.C. & Smith, H. (1976) Linear relationship between phytochrome photoequilibrium and growht in plants under natural radiation. *Nature* **262**, 210-212.

Morgan, D.C. & Smith, H. (1978b) The relationship between phytochrome-photoequilibrium and Development in light grown *Chenopodium album* L. *Planta* **142**, 187-193.

Morgan, D.C. & Smith, H. (1979) A systematic relationship between phytochrome-controlled development and species habitat, for plants grown in simulated natural radiation. *Planta* **145**, 253-258.

Morgan, D.C. & Smith, H. (1981) Control of development in *Chenopodium album* L. by shadelight: the effect of light quantity (total fluence rate) and light quality (red - far-red ratio). *New Phytologist* **88**, 239-248.

Murphy, G.P. & Dudley, S.A. (2009) Kin recognition: Competition and cooperation in Impatiens (Balsaminaceae). *American Journal of Botany* **96**, 1990-1996.

Nagatani, A., Chory, J. & Furuya, M. (1991) Phytochrome B is not detectable in the hy3 mutant of Arabidopsis, which is deficient in responding to end-of-day far- red light treatments. *Plant Cell Physiol.* **32**, 1119-1122.

Nagatani, A., Reed, J.W. & Chory, J. (1993) Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiology* **102**, 269-277.

Ninkovic, V. (2003) Volatile communication between barley plants affects biomass allocation. . *Journal of Experimental Botany* **54**, 1931-1939.

Novoplansky, A. (2009) Picking battles wisely: Plant behaviour under competition. *Plant, Cell and Environment* **32**, 726-741.

Parks, B.M. & Quail, P.H. (1993) hy8, a new class of Arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *The Plant Cell* **5**, 39-48.

Perry, L.G., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Weir, T.L. & Callaway, R.M. (2005) Dual role for an allelochemical: (±)-catechin from Centaurea maculosa root exudates regulates conspecific seedling establishment. *Journal of Ecology* **93**, 1126-1135.

Pierik, R., . , Millenaar, F.F., Peeters, A.J.M. & Voesenek, L.A.C.J. (2005) New perspectives in flooding research: the use of shade avoidance and Arabidopsis thaliana. *Annals of Botany* **96**, 533-540.

Pierik, R., Cuppens, M. L., Voesenek, L. A., Visser, E. J. (2004) Interactions between Ethylene and Gibberellins in Phytochrome-Mediated Shade Avoidance Responses in Tobacco. *Plant Physiology* **136**, 2928-2936.

Pierik, R., Djakovic-Petrovic, T., Keuskamp, D.H., de Wit, M. & Voesenek, L.A.C.J. (2009) Auxin and ethylene regulate elongation responses to neighbour proximity signals independent of GA and DELLA proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**, 1701-1712.

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

Platt, T.G. & Bever, J.D. (2009) Kin competition and the evolution of cooperation. *Trends Ecol Evol* **24**, 370-377.

Price, M.V. & Waser, D.M. (1982) Population structure, frequency-dependent selection, and the maintenance of sexual reproduction. *Evolution* **36**, 35-43.

Quail, P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Rev Mol Cell Biol* **3**, 85-93.

Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M. & Chory, J. (1993) Mutations in the gene for the Red/Far-Red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* **5**, 147-157.

Robson, P.R.H., Whitelam, G.C. & Smith, H. (1993) Selected components of the shade-avoidance syndrome are displayed in a normal manner in mutants of Arabidopsis thaliana and Brassica rapa deficient in phytochrome B. . *Plant Physiology* **102**, 1179-1184.

Rutte, C. & Pfeiffer, T. (2009) Evolution of reciprocal altruism by copying observed behaviour. *Current Science Association* **97**, 1573-1578.

Sakai, T., Kagawadagger, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M. & Okada, K. (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proccedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 6969-6974.

Sakai, T., Kagawadagger, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., Okada, K. (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proccedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 6969-6974.

Sakamoto, K. & Briggs, W. (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* **14**, 1723-1735.

Satter, R.L. & Wetherell, F. (1968) Photomorphogenesis in *Sinningia speciosa*, cv. Queen Victoria I. Characterization of phytochrome control. *Plant Physiology* **43**, 953-960.

Schenk, H.J. (1999) Clonal splitting in desert shrubs. . *Plant Ecology* **141**, 41-52.

Schmitt, J. (1997) Is photomorphogenic shade avoidance adaptive? Perspectives from population biology. *Plant, Cell and Environment* **20**, 826-830.

Schmitt, J. & Ehrhardt, D., W., (1987) A Test of the Sib-Competition Hypothesis for Outcrossing Advantage in *Impatiens capensis*. *Evolution* **41**, 579-590.

Schmitt, J., McCormac, A.C. & Smith, H. (1995) A test of the adaptive plasticity hypothesis using transgenic and mutant plants disabled in phytochrome- mediated elongation responses to neighbors. *Amer Naturalist* **146**, 937-953.

Schmitt, J., Stinchcombe, J.R., Heschel, M.S., Huber, H. & (2003) The Adaptive Evolution of Plasticity: Phytochrome-Mediated Shade Avoidance Responses **43** 459-469.

Schmitt, J. & Wulff, R.D. (1993) Light spectral quality, phytochrome and plant competition. *Trends in Ecology and Evolution* **8**, 47-50.

Sellaro, R., Crepy, M., Trupkin, S.A., Karayekov, E., Buchovsky, A.S., Rossi, C. & Casal, J.J. (2010) Cryptochrome as a Sensor of the Blue/Green Ratio of Natural Radiation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **154**, 401-409.

Skinner, R.H. & Simmons, S.R. (1993) Modulation of leaf elongation, tiller appearance and tiller senescence in spring barley by far-red light. *Plant, Cell and Environment* **16**, 555-562.

Smith, H. (1982) Light quality, photoperception and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 481-518.

Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants-an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585 - 590.

Smith, H. & Whitelam, G.C. (1997) The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**, 840-844.

Somers, D.E., Sharrock, R.A., Tepperman, J.M. & Quail, P.H. (1991) The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* **3**, 1263-1274.

Stone, B.B., Sotowe, -.E., E.L.,, Harper, R.M., Brandon Celaya, R., Ljung, K., Sandberg, G. & Liscum, E. (2008) Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in Arabidopsis. *Mol Plant* **1**, 129-144.

Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J. & Cerdán, P.D. (2010) *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proccedings of the National Academy of Sciences, USA* **107**, 4776-4781.

Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T. & Shimazaki, K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17**, 1120-1127.

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

Toler, J.E., Murdock, E.C., Stapleton, G.S. & Wallace, S.U. (1999) Corn leaf orientation effects on light interception, intraspecific competition, and grain yields. *Journal of Production Agriculture* **12**, 396-399.

Tonsor, S., J., (1989) Relatedness and Intraspecific Competition in *Plantago lanceolata*. *The American Naturalist* **134**, 897-906.

Waldman, B. (1988) The Ecology of Kin Recognition. *Annual Review of Ecology and Systematics* **19**, 543-571.

Wang, H. & Deng, X.W. (2002) Phytochrome signaling mechanism. *The Arabidopsis book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, 9/30/02 doi/10.1199/tab.0074 http://www.aspb.org/publications/arab

Weinig, C. (2002) Phytochrome photoreceptors mediate plasticity to light quality in flowers of the Brassicaceae
American Journal of Botany **89**, 230-235.

West, S.A. & Gardner, A. (2010) Altruism, Spite, and Greenbeards. *Science* **327**, 1341-1344.

West, S.A., Griffin, A.S. & Gardner, A. (2007) Evolutionary Explanations for Cooperation. *Current biology : CB* **17**, R661-R672.

Whitelam, G.C. & Johnson, C.B. (1982) Photomorphogenesis in *Impatiens parviflora* and other plant species under simulated natural canopy radiations. *New Phytologist* **90**, 611-618.

Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S. & Harberd, N.P. (1993) Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**, 757-768.

Whitelam, G.C. & Smith, H. (1991) Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis, cucumber and tomato. . *Journal of Plant Physiology* **139**, 119-125.

Willson, M.F., Hoppes, W.G., Goldman, D.A., Thomas, P.A., Katusic-Malmborg, P.L. & Bothwell, J.L. (1987) Sibling Competition in Plants: An Experimental Study. *The American Naturalist* **129**, 304-311.

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

Young, J. (1981) Sib competition can favor sex in two ways. *Theoretical Biology* **88**, 755-756.