

Mecanismos moleculares involucrados en el control de la germinación mediada por el fitocromo A y su interacción con la acción del fitocromo B en semillas de *Arabidopsis thaliana*.

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

Silvia Elizabeth Ibarra
Licenciada en Biotecnología - UNQ - 2005

Lugar de trabajo: IFEVA-FAUBA



FAUBA

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



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Javier Francisco Botto

Lic. En Ciencias Biológicas (UBA)

Dr. en Ciencias Biológicas (UBA)

Consejero de Estudios

Jorge José Casal

Ingeniero Agrónomo (UBA)

Ph D (Leicester)

*A Lourdes, por haber cambiado
el sentido de mi vida justo a tiempo.
Te amo hija.*

Agradecimientos.

Confieso que siento el mismo vértigo al escribir los agradecimientos que al iniciar esta tesis. Quisiera poder transmitir a todos los que han sido parte de este camino, que no podría haberlo hecho sin ustedes.

Gracias a Javier por los recursos y el espacio para realizar esta tesis.

A Rodolfo Sánchez, por su invaluable aporte a mi formación. Gracias por la humildad y compromiso con los que ha abordado cada uno de mis cuestionamientos. Ha sido un placer enorme haber compartido con usted estos años de investigación.

Al labo grande, mi segundo hogar. Como alguien dijo alguna vez, el alma del labo supera a las personas que circunstancialmente lo habiten, y creo que así es. Gracias a todos por hacer del almuerzo el momento de terapia, catarsis y diversión de cada día. Por defender el trabajo comunitario sin competencias, por ser ese lugar donde siempre se encuentra un mate listo. Hermoso lugar.

A Rocío, por aceptar mis interminables sugerencias. ¡Gracias por tanta ayuda!

A mis amigos de la facu: los ñoños. ¡Seguimos avanzando juntos! Bet, Die, Jog y Pato, gracias por estar cerca siempre.

A Pau, Ely, Ana y Andre. Chicas, he pasado con cada una de ustedes momentos inolvidables. ¡Las quiero!

A Romina por su inigualable amistad. Por su nobleza y cariño, por su sencillez y gran amor por nuestro trabajo, por su compañía, por sus consejos, por desafiar conmigo alegremente los límites del sonido, por tantas tantas anécdotas que guardo en mi memoria, gracias Roco, te quiero.

A Quiquin, por abrirme las puertas al maravilloso mundo de la ciencia. Mi gran maestro.

A Jorge y Diony, gracias por modificar sus rutinas hasta el límite para que estas hojas estén completas. Gracias por todo el amor que me brindaron siempre.

A mi nona, por acompañar largas horas de estudio en un cálido silencio y haciéndome mate.

A mis papás, por no soltarme la mano nunca. Por permitirme ir lejos y volver cuantas veces quise. Gracias por la libertad. Gracias por acompañarme aún en los momentos más difíciles, los amo.

A Javy, mi hermano de la vida. A Gaby, por su incondicionalidad y su infinito amor.

A July y Caro por enseñarme desde su llegada que la vida es eso que nos pasa cuando estamos ocupados haciendo... una tesis.

A Leandro, mi gran amor. Porque no importa cuántas veces baraje malas el destino, podemos hacerlo juntos.

Y finalmente a mi Lula, porque ella hizo el esfuerzo más grande de todos. Te amo hija.

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

Lic. Silvia Elizabeth Ibarra.

Publicaciones derivadas de esta tesis.

Ibarra S.E., Auge G., Sánchez R.A. & Botto J.F. (2013).

Transcriptional Programs Related to Phytochrome A Function in Arabidopsis Seed Germination.

Molecular Plant, 6 (4):1261-73.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Conceptos generales.....	02
1.2. Germinación y Dormición.....	04
1.2.1. Reguladores de la dormición.....	09
1.2.2. Potencial de crecimiento embrionario.....	10
1.3. Fotomorfogénesis.....	12
1.4. Rol de las hormonas durante la inducción de la germinación y salida de la dormición.....	21
1.4.1. Ácido Giberélico.....	22
1.4.2. Ácido Abscísico.....	24
1.5. Integración de señales: luz y hormonas.....	26
1.6. Modelo de Estudio: <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	28
1.7. Objetivos.....	29
 CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	 31
2.1. Condiciones generales de germinación y crecimiento de plantas.....	32
2.2 Condiciones lumínicas y experimentos de germinación en <i>Landsberg erecta</i>.....	32
2.2.1 Ensayo fisiológico.....	32
2.2.2. Tratamiento a muestras analizadas mediante microarreglos	33

2.2.3. Tratamiento a muestras analizadas mediante q-Real Time	34
2.3. Condiciones lumínicas y experimentos de germinación en <i>Columbia</i>	35
2.3.1. Ensayo fisiológico	35
2.3.2. Ensayo de germinación en medio suplementado con hormonas	35
2.3.3. Ensayo de germinación en medio suplementado con inhibidores de hormonas	36
2.4. Extracción de ADN de plantas	37
2.5. Extracción de ARN total de semillas	37
2.6. Cuantificación de material genético.	38
2.7. Obtención de cADN a partir de ARN	38
2.8. Análisis de expresión de genes mediante q-Real Time	39
2.9. Análisis de expresión de genes mediante microarreglos	43
2.10. Cuantificación de ABA y GA	44
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	46
SECCIÓN 3.1: PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE LA GERMINACIÓN MEDIADA POR PHYA	47

3.1.1. Identificación del patrón de expresión temporal de genes regulados por phyA.....	50
3.1.2. PhyA como regulador transcripcional.....	53
3.1.3. Vías hormonales vinculadas a la acción de phyA.....	57
3.1.3.1. Genes de señalización y metabolismo de las hormonas vinculados a la germinación mediada por el phyA.....	57
3.1.3.2. Dentro de los genes sensibles a la actividad de phyA se encuentran sobre representados elementos pertenecientes a las vías de GA y Auxinas.....	59
3.1.4. Las vías de señalización activadas durante la germinación inducida por RL mediada por el phyA son parcialmente compartidas por las vías de acción de PIL5.....	60
3.1.5. La evaluación de la germinación de semillas mutantes confirma la germinación dependiente del phyA.....	63
3.1.6. El phyA regula negativamente la expresión de <i>DELLAs</i>	65
3.1.7. La expresión de genes asociados a ABA, GA y expansinas depende del fondo genético cuando la germinación es inducida por phyA.....	69
3.1.8. Discusión.....	72
 SECCIÓN 3.2: ENTRADA EN DORMICION SECUNDARIA EN SEMILLAS DE <i>A. THALIANA</i>.....	 78

3.2.1. Entrada en dormición secundaria por incubación en oscuridad a temperatura constante.....	79
3.2.2. Acción de las Giberelinas en la entrada en dormición secundaria.....	82
3.2.3. Acción del Ácido Abscísico en la entrada en dormición secundaria.	84
3.2.4. Determinación de los niveles de ABA y GA en semillas despiertas y dormidas.....	87
3.2.5. Expresión de genes vinculados a las vías hormonales de GA y ABA durante la entrada en dormición secundaria	88
3.2.6. Rol de DOG1 y PIL5 en la entrada en dormición secundaria de las semillas	94
3.2.7. Discusión.....	101
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES GENERALES	108
4.1. Conclusiones generales.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	114

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla. 2.8.1. Secuencia de cebadores para la evaluación de transcritos mediante q-Real Time.....	41
---	----

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

SECCIÓN 3.1: PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE LA GERMINACIÓN MEDIADA POR PHYA

Tabla 3.1.2.1. Lista de transcritos dependientes de phyA y PIL5 vinculados a metabolismo y señalización de hormonas.....	55
---	----

SECCIÓN 3.2: ENTRADA EN DORMICION SECUNDARIA EN SEMILLAS *A. THALIANA*

Tabla 3.2.5.1. Análisis de niveles de expresión de genes asociados a la entrada en dormición secundaria en bases de datos publicados en Cadman et al., 2006.....	94
---	----

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Fig. 1.1.1. Estructura de la semilla.....	03
Fig. 1.2.1. Curva de entrada de agua en semilla.....	04
Fig. 1.2.2. Diagrama de flujo que representa cambios en los niveles de dormición.....	08
Fig. 1.3.1. Estructura del fitocromo.....	13
Fig. 1.3.2. Modelo de fotointerconversión de los fitocromos.....	14
Fig. 1.3.3. Espectro de absorción de las formas estables interconvertibles de los fitocromos.....	15
Fig. 1.3.4. Modos de acción de los fitocromos.....	18
Fig. 1.4.1.1. Ruta de acción de las giberelinas y su interacción con las proteínas DELLAs.....	23
Fig. 1.4.2.1. Biosíntesis de Ácido abscísico.....	25
Fig. 1.5.1. Actividad de PIL5 durante la germinación.....	27

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

SECCIÓN 3.1: PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE LA GERMINACIÓN MEDIADA POR PHYA

Fig. 3.1.1.1. Porcentaje de germinación de semillas incubadas por 24 h a 25C en respuesta a un pulso de luz.....	50
---	----

Fig. 3.1.1.2. Protocolo experimental para las extracciones de ARN utilizado en el análisis de microarreglos ATH1.....	51
Fig. 3.1.1.3. Clasificación temporal de genes dependientes de phyA.....	52
Fig. 3.1.1.4. Asignación de ontología génica para genes dependientes de phyA.....	53
Fig. 3.1.4.1. Diagrama de Venn de genes vinculados a phyA y PIL5.....	61
Fig. 3.1.4.2. Sobre representación de genes agrupados según su función biológica vinculados a phyA y PIL5.....	61
Fig. 3.1.4.3. Análisis de correlación entre genes comunes utilizando los cocientes Ler/phyA y PIL5/Col.....	62
Fig. 3.1.4.4. Tasa de cambio de genes vinculados a pared promovidos por phyA o PIL5.....	63
Fig. 3.1.5.1. Germinación inducida por luz en semillas mutantes mediante T-DNA.....	64
Fig. 3.1.6.1. Protocolo experimental para las extracciones de ARN utilizado en el análisis de q RT- PCR.....	65
Fig. 3.1.6.2. Niveles relativos de expresión de transcritos <i>DELLAs</i> en respuesta a la luz RL de forma temprana y tardía.....	67
Fig. 3.1.6.3. Germinación de semillas sobre expresantes de ABI5 en presencia y ausencia de RGL2.....	68
Fig. 3.1.7.1. Variación natural en los niveles de expresión de genes asociados a GA inducidas a germinar por RL.....	69

Fig. 3.1.7.2. Variación natural en los niveles de expresión de genes asociados a ABA en semillas inducidas a germinar por RL.....70

Fig. 3.1.7.3. Variación natural en los niveles de expresión de expansinas en semillas inducidas a germinar mediante un pulso de RL.....71

SECCIÓN 3.2: ENTRADA EN DORMICION SECUNDARIA EN SEMILLAS *A. THALIANA*

Fig. 3.2.1.1. Protocolo experimental utilizado para evaluar germinación en función de los días de incubación en oscuridad a 25C80

Fig. 3.2.1.2. Inducción de la germinación mediada por luz.....81

Fig. 3.2.2.1. Respuesta a GA de semillas *Columbia* en semillas despiertas y dormidas.....83

Fig. 3.2.2.2. Evaluación de la sensibilidad a GA durante la entrada en dormición secundaria.....84

Fig. 3.2.3.1. Respuesta a ABA de semillas *Columbia* en semillas despiertas y dormidas.....85

Fig. 3.2.3.2. Evaluación de la sensibilidad a ABA durante la entrada en dormición secundaria86

Fig. 3.2.4.1. Niveles de hormona en semillas inducidas a entrar en dormición secundaria.....87

Fig. 3.2.5.1. Niveles relativos de expresión de componentes de las vías metabólicas de GA.....89

Fig. 3.2.5.2. Expresión relativa de *DELLAs* en respuesta a tratamientos de inducción a entrada en dormición secundaria.....90

Fig. 3.2.5.3. Niveles relativos de expresión de componentes de las vías metabólicas de ABA.....	91
Fig. 3.2.5.4. Expresión relativa de factores de transcripción vinculados a vías de señalización de ABA en respuesta a tratamientos de inducción a la entrada en dormición secundaria.....	92
Fig. 3.2.6.1. Respuesta a la incubación prolongada en oscuridad de mutantes para reguladores de la entrada en dormición primaria.....	95
Fig. 3.2.6.2. Expresión relativa de DOG1 en respuesta a tratamientos de inducción a la entrada en dormición secundaria.....	96
Fig. 3.2.6.3. Respuesta a GA de semillas <i>Col</i> y <i>dog1</i> en semillas despiertas y dormidas.....	97
Fig. 3.2.6.4. Evaluación de la sensibilidad a GA durante la entrada en dormición secundaria.	97
Fig. 3.2.6.5. Respuesta a ABA en dos tiempos diferentes de incubación en semillas despiertas y dormidas.....	98
Fig. 3.2.6.6. Evaluación de la sensibilidad a ABA durante la entrada en dormición secundaria.....	99
Fig. 3.2.6.7. Relación entre los niveles de dormición primaria y secundaria de distintas accesiones.....	100
Fig. 3.2.7.1. Mecanismo de regulación de la entrada en dormición secundaria de las semillas.....	106

CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES GENERALES

Fig. 4.1.1. Modelo de integración entre las distintas clases de dormición.....	112
---	-----

Abreviaturas.

A. thaliana	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Ácido absícico
ABI1	<i>ABA Insensitive 1</i> , Insensible a ABA 1
ABI3	<i>ABA Insensitive 3</i> , Insensible a ABA 3
ABI4	<i>ABA Insensitive 4</i> , Insensible a ABA 4
ABI5	<i>ABA Insensitive 5</i> , Insensible a ABA 5
ARF18	<i>Auxin response factor 18</i> , Factor de respuesta a Auxina 18
ATHB	<i>Arabidopsis thaliana homeobox</i>
ATMYB34	<i>Myb domain protein 34</i> , Proteína con dominio myb 34
AXR1	<i>Auxin resistant 1</i> , Resistente a Auxina1
AXR4	<i>Auxin resistant 4</i> , Resistente a Auxina4
BEH1	<i>BES1/BZR1 homolog 1</i> , Homólogo a BES1
BES1	<i>Brassinazole resistant 2</i> , Resistente a Brasinazole 2
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i> , Motivo hélice rulo hélice
BR	Brassinosteroides
Col	<i>Columbia</i>
CRF1	<i>Cytokinin response factor 1</i> , Factor de respuesta a citoquinina1
CRF2	<i>cytokinin response factor 2</i> , Factor de respuesta a citoquinina2
CRF3	<i>cytokinin response factor 3</i> , Factor de respuesta a citoquinina3
CVI-0	<i>Cape Verde Islands</i>
CYP707A2	<i>Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2</i> . Citocromo p450, familia 707, subfamilia A, polipéptido 2
CYP707A3	<i>Cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 3</i> . Citocromo

	p450, familia 707, subfamilia A, polipéptido 3
CYP79B2	<i>Cytochrome P450, family 79, subfamily B, polypeptide 2</i> . Citocromo p450, familia 79, subfamilia B, polipéptido 2
D. ferox	<i>Datura ferox</i>
DELLAs	Proteínas GRAS con dominio DELLA
DOG1	<i>Delay of germination 1</i> , Retraso de la germinación 1
DPA	Ácido di hidrofaseico
EXP1	<i>Expansin A1</i> , Expansina A1
EXP10	<i>Expansin A10</i> , Expansina A10
EXP2	<i>Expansin A2</i> , Expansina A2
F	Fluridona
FUS3	<i>FUSCA3</i>
GA	Ácido giberélico
GA2OX2	<i>Gibberellin 2-oxidase2</i> , Giberelina 2-oxidasa2
GA3OX1	<i>Gibberellin 3-oxidase 1</i> , Giberelina 3-oxidasa1
GAI	<i>Gibberellic acid insensitive</i> , Insensible a ácido giberélico
GASA4	<i>GAST1 Protein homolog 4</i> , Proteína homóloga a GAST1
GASA6	<i>GA-Stimulated Arabidopsis 6</i> , Estimulador de GA en Arabidopsis
GRAS	Familia que agrupa (<i>GAI</i> , <i>RGA</i> , <i>SCR</i>)
HAT4	<i>Arabidopsis thaliana homeobox protein 2</i> , Proteína del tipo Homeobox de <i>Arabidopsis thaliana</i>
HFR1	<i>Reduced sensitivity to far red light 1</i> , Sensibilidad reducida al RL
HIR	<i>High irradiance response</i> , Respuesta a alta irradiancia
JA	Ácido jasmónico

JAZ12	<i>Jasmonate-zim-domain protein 12</i> , Proteína con dominio de reconocimiento a JA 12
JAZ3	<i>Jasmonate-zim-domain protein 3</i> , Proteína con dominio de reconocimiento a JA 3
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> , Proteínas abundantes en la fase final de embriogénesis
LER	<i>Landsberg erecta</i>
LFR	<i>Low fluence response</i> , Respuesta a bajos flujos
LIG	Light induced to germinate
MYB66	<i>MYB Domain protein 66</i> , Proteína con dominio myb 66
MYC2	Proteína con dominio MYC 2
MYC3	Proteína con dominio MYC 3
MYC4	Proteína con dominio MYC 4
NCED5	<i>Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5</i> , Nueve-cis-epoxicarotenoide deshidrogenasa 5
NCED9	<i>Nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 9</i> , Nueve-cis-epoxicarotenoide deshidrogenasa 9
NILs	<i>Near inbred lines</i> , Líneas cercanas isogénicas
NIT3	<i>Nitrilase 3</i> , Nitrilasa 3
OSC	Oscuridad
P	Pacobutrazol
PA	Ácido faseico
Pfr	Forma activa de los fitocromos que absorbe luz en la zona de la luz roja lejana

Pfr/Pt	Relación entre la forma activa de los fitocromos y la cantidad total de cromoproteína (Pfr+Pr)
phy	Fitocromo cromoproteína
PHYA	fitocromo A
PHYB	fitocromo B
PIL2	<i>phytochrome interacting factor 3-like 2</i> , Factor de interacción con fitocromo 3 del tipo 2
PIL5	<i>phytochrome interacting factor 1-like 5</i> , Factor de interacción de fitocromo 1 del tipo 5
PIN1	<i>Auxin efflux carrier family protein</i> , Proteína de la familia de transportadores de eflujo de Auxinas
PIN2	<i>Auxin efflux carrier family protein</i> , Proteína de la familia de transportadores de eflujo de Auxinas
PIN7	<i>Auxin efflux carrier family protein</i> , Proteína de la familia de transportadores de eflujo de Auxinas
Pr	Forma inactiva de los fitocromos que absorbe luz en la zona de la luz roja
PYL7	<i>PYR1-like 7</i> , Proteína del tipo "pyrabactin resistance" 7
q-Real Time	<i>Quantitative Real time</i> , Cuantificación en tiempo real
QTLs	<i>Quantitative trait locus</i>
R	Luz roja (660 nm)
RCI2A	<i>Rare-cold-inducible 2A</i> , Proteína inusual inducible por frío 2 ^a
RGA	<i>Repressor of GA</i> , Represor de GA
RGL1	<i>RGA-like 1</i> , Proteína del tipo RGA 1
RGL2	<i>RGA-like 2</i> , Proteína del tipo RGA 2

RGL3	<i>RGA-like protein 3</i> , proteína del tipo RGA3
RIL	<i>Recombinant inbred line</i> , Líneas recombinants
RL	Luz roja lejana (730 nm)
SAG29	<i>Senescence-associated gene 29</i> , Gen 29 asociado a senescencia
SCF E3	Ubiquitin ligase
SCL 3	<i>SCARECROW-like 3</i> , Proteína del tipo Scarecrow 3
SCL4	<i>SCARECROW-like 4</i> , Proteína del tipo Scarecrow 4
SCL8	<i>SCARECROW-like 8</i> , Proteína del tipo Scarecrow 8
SD1	<i>Secondary dormancy</i> , dormición secundaria
SHA	<i>Shadara</i>
VLFR	<i>Very low fluence response</i> , Respuesta a muy bajos flujos

Resumen

Mecanismos moleculares involucrados en el control de la germinación mediada por el fitocromo A y su interacción con la acción del fitocromo B en semillas de *Arabidopsis thaliana*.

La dormición y germinación son procesos fisiológicos centrales que rigen el desempeño de las semillas integrando condiciones endógenas y del ambiente. Dentro de los factores externos capaces de inducir ó inhibir dichos procesos en *A. thaliana*, se destacan la temperatura y la luz. La dormición puede clasificarse en función del momento en que se establece: a) dormición primaria: se impone durante los últimos estadios del desarrollo y b) dormición secundaria: se induce por efectos ambientales desfavorables para la germinación.

Con el propósito de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la salida de dormición primaria cuando semillas que tienen una alta sensibilidad a la luz germinan con un pulso de luz RL, se analizaron los perfiles transcriptómicos de semillas salvajes y mutante phyA. Se demostró que transcriptoma asociado a la acción del phyA es parcialmente distinto al que se activa cuando la germinación de las semillas es promovida por el phyB. Estos resultados indican que los mecanismos moleculares que promueven la salida de dormición primaria dependen del ambiente lumínico y de la sensibilidad de las semillas a la luz.

Por otro lado, se evaluó la entrada en dormición secundaria de semillas incubadas en oscuridad a 25C, observándose que los niveles y sensibilidad a GA disminuyen mientras que las cantidades y sensibilidad a ABA se mantienen constante. Además, se identificó un rol antagónico por parte de DOG1, regulador

positivo de la dormición primaria, al observarse que su ausencia facilita la entrada en dormición secundaria de las semillas. Estas características representan diferencias novedosas entre los mecanismos que intervienen en la dormición primaria y secundaria en semillas de *A. thaliana*.

Palabras clave: *germinación, dormición, luz, temperatura, A. thaliana.*

Molecular mechanisms involved in phy A mediated germination and its interaction with phyB in *Arabidopsis thaliana* seeds.

Seed dormancy and germination are essential physiological processes that, along with endogenous and ambient conditions, rule seeds performance. Among the environmental factors, light and temperature have notorious effects both inhibiting and inducing such processes in *Arabidopsis thaliana*. Depending on the moment when it develops, seed dormancy can be classified as: a) primary seed dormancy: when it sets during the final developmental stages or b) secondary seed dormancy: when it is induced by unfavorable ambient conditions for germination.

In order to identify the molecular mechanisms underlying the release of primary seed dormancy by far red light (FR), transcriptional changes caused by FR light treatments in wild type and phyA mutant seeds were analyzed. We found that phyA related transcriptome is markedly different than those phyB related transcriptome generated during seed germination. We conclude that molecular mechanisms responsible for primary seed dormancy release and germination are specific of light environmental conditions.

On the other hand, secondary seed dormancy onset under darkness condition at 25C was evaluated. We found that GA sensitivity levels decrease whereas sensitivity to ABA remains unchanged. This is a contrasting novel feature between mechanisms underlying primary and secondary seed dormancy. Moreover, we identified an antagonistic role for DOG1, previously reported as a positive regulator of primary seed dormancy, though we found that lack of DOG1 promotes secondary seed dormancy onset. These results represent novel differences

between mechanisms involve in primary and secondary dormancy in *Arabidopsis thaliana* seeds.

CAPÍTULO 1:

INTRODUCCIÓN

1.1. Conceptos generales.

Las plantas, durante su ciclo de vida, son capaces de evaluar y responder de un modo plástico a los estímulos que dan cuenta de su entorno.

Resulta vital la habilidad de integrar distintas señales ambientales para establecer una respuesta concertada al medio que las rodea. La humedad, temperatura, cantidad y calidad de luz, son algunos de los estímulos tenidos en cuenta y que disparan mecanismos endógenos con el propósito de adecuarse, del mejor modo posible, al exterior. El momento en que una semilla germina resulta crucial para el éxito de dicho individuo.

La germinación se define como la aparición de la radícula a través de las estructuras circundantes de la semilla iniciándose con la incorporación de agua (Bewley, 1997; Baskin & Baskin, 2004; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

A nivel estructural, una semilla consta de una cubierta o testa y un embrión (Fig. 1.1.1). La testa puede presentar distintas texturas y apariencias: generalmente es dura y con una capa externa y otra interna de cutícula fácilmente diferenciables además de varias láminas gruesas que ofrecen protección. Estas características le confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y algunos gases, permitiéndole influir sobre la regulación metabólica de la semilla. Frecuentemente en la testa es posible observar el micrópilo: en muchas ocasiones está asociado con una cicatriz llamada hilio, que marca el punto donde la semilla se separó del tallo (funículo) por medio del cual estaba adherido al fruto (Vaughan, 1970).

El endosperma tiene como función almacenar las reservas alimenticias de las semillas, aunque no siempre está presente. Entre las semillas que tienen un

endosperma bien desarrollado están las gramíneas como el trigo, el maíz, la cebada y algunas dicotiledóneas. En estos casos los cotiledones son relativamente pequeños. El endosperma de las gramíneas, y de otras especies, se caracteriza por presentar una capa externa o aleurona. Tienen paredes gruesas y en su interior se desarrollan los llamados granos de aleurona.

El embrión está formado básicamente por un eje hipocótilo-raíz con uno o dos cotiledones y un meristema apical en los ápices de raíz y tallo.

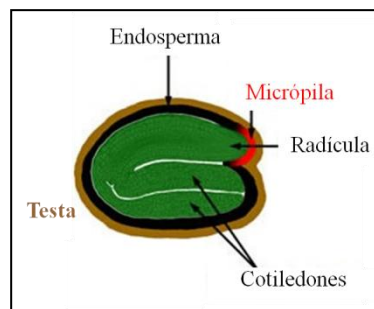


Fig. 1.1.1. Estructura de la semilla (*A. thaliana*).

1.2. Germinación y Dormición.

El momento en que una semilla germina representa un rasgo clave desde el punto de vista ecológico y como tal, es un fenómeno altamente regulado que responde a señales endógenas y del ambiente (Wilkinson et al., 2002).

La germinación sucede luego de la incorporación de agua. Este fenómeno responde a una curva trifásica (Fig.1. 2.1, Bewley & Black, 1994) en la cual, durante la primera fase, el ingreso de agua es vigoroso para luego detenerse formando un plateau y culminando con una nueva incorporación de agua (Bentsik & Koornneef, 2008).

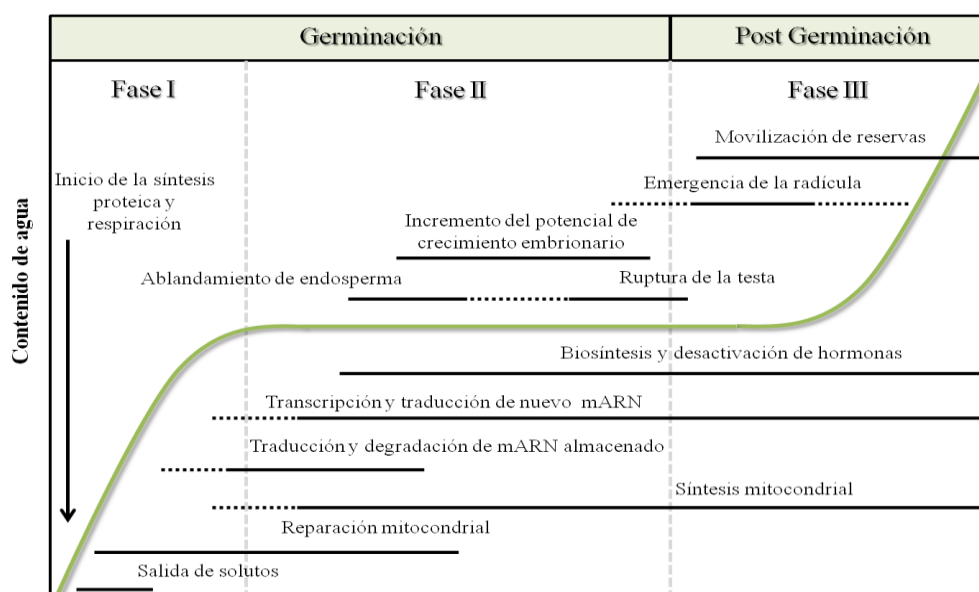


Fig. 1.2.1. Curva de entrada de agua en semilla.

Los primeros eventos asociados a la germinación están vinculados a la reactivación de la maquinaria transcripcional y traduccional (Barroco et al., 2005). Dichos sucesos son coetáneos a la fase I de entrada de agua a la semilla. Durante la segunda fase, se traduce y degrada mARN almacenado, se sintetizan y

desactivan hormonas y se ablanda el endosperma junto con la ruptura de la testa. La tercera fase de la curva que describe el comportamiento hídrico de la semilla se desarrolla junto con los eventos de post germinación, donde la aparición de la radícula es sucedida por la movilización de recursos y el crecimiento de la plántula (Nonogaki et al., 2008).

En *Arabidopsis*, desde el punto de vista físico, la germinación puede describirse como un proceso compuesto por dos etapas: en la primera tiene lugar la ruptura de la testa y endosperma y en la segunda, la ruptura del endosperma micropilar que permite la salida de la raíz.

Un mecanismo íntimamente vinculado con la germinación es la dormición. Este fenómeno se ha definido como la incapacidad de una semilla para germinar aún en condiciones óptimas (Finch Savage & Leubner-Metzger, 2006). El proceso de dormición se ha independizado *sensu stricto* de la germinación ya que existen cambios en los niveles de dormición de una semilla sin que la germinación ocurra.

Cuando las semillas son dispersadas de la planta madre, lo hacen en un estado de dormición conocido como *dormición primaria*. En dicha situación, las semillas son incapaces de germinar debido a un bloqueo endógeno que, desde el punto de vista ecológico, resulta favorable ya que evita la germinación precoz de las mismas. Durante los años '90 se han identificado componentes moleculares involucrados en la regulación de esta clase de dormición: en maíz, tomate y *Arabidopsis* dichos componentes pertenecen a las vías de síntesis y señalización de ABA (véase a continuación, Groot et al., 1991; McCarty, 1995).

Por otro lado, los estadios de dormición presentes en semillas maduras se conocen como *dormición secundaria*, y a su vez estos pueden subdividirse en función de las condiciones ambientales capaces de inducir satisfactoriamente la

germinación. Sin embargo, los factores que controlan la dormición en semillas enterradas en el campo son poco conocidos.

Los niveles de dormición dependen fuertemente del genotipo de las semillas y del ambiente donde han desarrollado. Esto es consistente con el hecho que el grado de dormición de las semillas, no sólo depende de sus características genéticas, sino que además se ve fuertemente modulado por los eventos ambientales que tuvieron lugar durante el desarrollo de las mismas (Donohue, 2005).

Mientras que el establecimiento de la dormición primaria tiene lugar durante la maduración, la dormición secundaria ocurre en semillas embebidas expuestas a condiciones ambientales desfavorables para la germinación (Finkelstein et al., 2008). El análisis de los perfiles de expresión de semillas con distintas clases de dormición (primaria y secundaria) ha permitido postular la existencia de transcriptomas similares, aunque no idénticos, en semillas con distinto nivel de dormición (Toorop et al., 2005; Cadman et al., 2006). Dentro de las categorías exclusivas a cada clase de dormición, las semillas con dormición primaria presentaron una sobre representación de genes asociados a la síntesis de proteínas y genes vinculados a la respuesta a estrés. Por su parte, se observó que semillas en estado de dormición secundaria presentaron una sobre representación de genes asociados a la transcripción y desarrollo. Dentro del grupo de genes con niveles de expresión similares entre semillas en estado de dormición primaria y secundaria se identificaron categorías como metabolismo, comunicación celular y hormonas.

Las semillas de algunas especies presentan requerimientos estrictos para romper su dormición, esto implica que la salida de la misma puede conseguirse por diferentes vías, utilizando la combinación correcta de diversos factores

exógenos. Por este motivo, el control de la germinación y dormición resulta un modelo interesante para comprender el modo en que tiene lugar la integración de señales ambientales sobre la señalización de las plantas.

En algunas especies como *Arabidopsis thaliana*, la dormición es leve y se encuentra impuesta por la cubierta de las propias semillas, esto significa que el embrión desnudo es capaz de germinar en condiciones en las cuales la semilla completa no lo consigue. En algunos casos, la dormición disminuye con la imbibición en frío o por efectos de la post maduración (Kucera et al., 2005)

La dormición puede ser superada por la acción de factores que favorecen la germinación. Por ejemplo el almacenamiento en seco, la luz y temperatura son factores ambientales, que si bien no ejercen un efecto absoluto sobre la germinación, representan estímulos exógenos que actúan positivamente sobre el tipo de respuesta de una semilla ante la posibilidad de germinar (Cone & Spruit, 1983).

Ya que los escenarios reales en donde las condiciones ambientales que afectan el desempeño de las semillas enterradas interaccionan de forma compleja, resulta útil organizar de forma simplificada los factores que controlan la dormición de las semillas. Se han propuesto dos categorías: la primera agrupa aquellos elementos que modulan los distintos grados de dormición de las semillas (por ejemplo, temperatura y situación hídrica del suelo) mientras que la segunda incluye factores capaces de remover los últimos frenos que inhiben la germinación (determinadas clases de luz y temperaturas alternadas; Fig. 1.2.2).

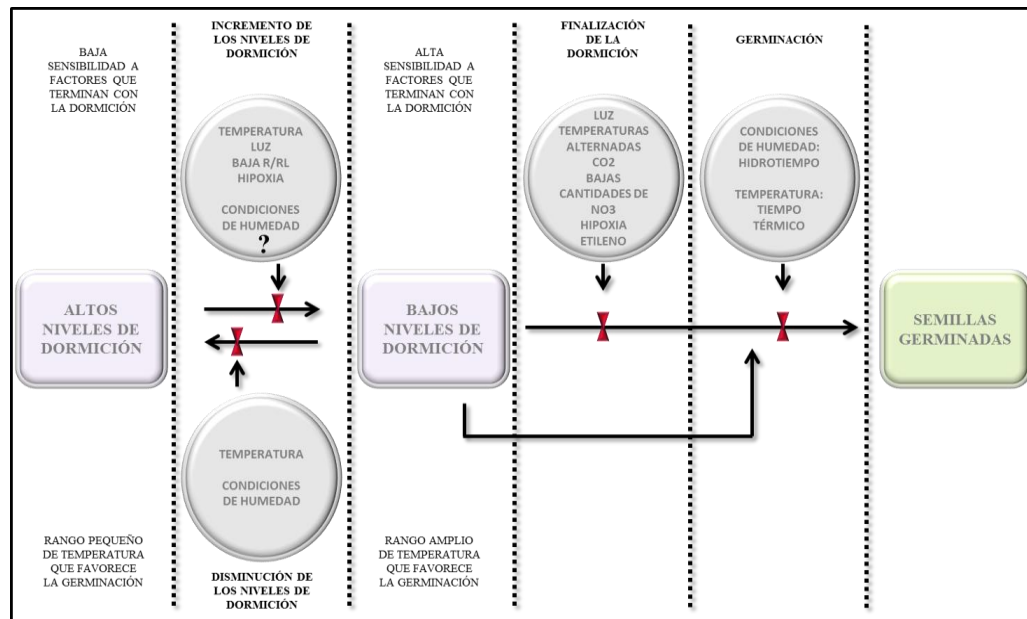


Fig. 1.2.2. Diagrama de flujo que representa cambios en los niveles de dormición y en la terminación de dicho proceso junto con los factores que afectan principalmente cada etapa. (Benech-Arnold et al., 2000).

Uno de los desafíos en el estudio de la dormición y germinación radica en la posibilidad de identificar la naturaleza de reguladores cruciales que impiden la germinación propiciando la dormición y su interacción. Para ello, resulta de vital importancia determinar el grado de relevancia que toman los distintos factores ambientales como ser la luz y temperatura y el modo en que dichas señales son decodificadas por las semillas.

1.2.1. Reguladores de la dormición.

Mediante la caracterización fisiológica, genética y molecular de semillas mutantes generadas artificialmente en *Arabidopsis* con bajos niveles de dormición, se consiguieron las primeras evidencias que dan cuenta de la complejidad en la regulación de la dormición. Se han identificado, por ejemplo, factores de transcripción vinculados a las vías de ABA como ABI5 y FUSCA3.

El factor de transcripción FUSCA3 (FUS3) es un regulador central del desarrollo en semillas y un nodo importante en las redes de interacción de las hormonas en *Arabidopsis*. Su función ha sido caracterizada durante el desarrollo embrionario donde FUS3 se expresa promoviendo la maduración de las semillas e imponiendo la dormición mediante la regulación del balance ABA/GA (Chiu et al., 2012).

El ácido abscísico (ABA) posee un rol central durante los últimos estadios de maduración de las semillas, momento en el cual se promueve la acumulación de ABI5 (*ABA-insensitive 5*) factor que activa la transcripción de genes del tipo LEA (*Late Embriotic Abundant*) cuyos productos confieren osmotolerancia al embrión (Lopez-Molina & Chua, 2000). De este modo, las semillas maduras contienen altos niveles de ABA y cantidades sustanciales de ABI5 y LEA. Bajo condiciones normales de germinación, la expresión de *ABI5* disminuye hasta ser indetectable luego de 12 h de imbibición.

La variación natural para la dormición de las semillas es una característica que comparten varias especies. Se han identificado regiones de QTLs validadas por NILs (del inglés, Near Isogenic Lines) para *Arabidopsis*, Cebada y Arroz (Bentsink et al., 2007). Sin embargo, en ninguno de los casos se ha definido la función molecular de los genes asociados a los QTLs caracterizados.

DOG1 (*Delay Of Germination*) fue identificado como un loci mayor y pleiotrópico a diferentes condiciones ambientales de incubación de las semillas. Este gen codifica para una proteína de función desconocida que impone dormición y que está involucrado en la vía de señalización de ABA (Bentsink et al., 2006).

1.2.2. Potencial de crecimiento embrionario.

Los niveles de germinación pueden vincularse directamente con el potencial de crecimiento del embrión. En semillas donde la dormición es impuesta por la cubierta, los embriones desnudos son capaces de crecer aún ante la ausencia de estímulos exógenos.

Si bien el incremento en el potencial de crecimiento del embrión acompaña al fenómeno de germinación, y existe sobrada evidencia que demuestra la necesidad de contención para que la radícula protruya, las bases moleculares y fisiológicas del incremento de la capacidad expansiva del embrión son apenas conocidas. Sobre el aumento del potencial de crecimiento del embrión mediado por fitocromo, la información también es muy escasa. En lechuga se lo ha vinculado con una disminución en el potencial osmótico (Carpita et al., 1979) aunque se admite que también hay cambios en la extensibilidad de las paredes. Con respecto al origen de los cambios en extensibilidad se ha sugerido la posibilidad de que las expansinas participen en este fenómeno.

Las expansinas son proteínas de la pared celular con la habilidad de ablandarlas en función a variaciones del pH. Se cree que su actividad se resume a la ruptura de puentes hidrógeno entre fibras de hemicelulosa y celulosa promoviendo el crecimiento celular a costas de incrementos en la presión de turgencia (Mc Queen-Mason & Cosgrove 1995).

Se han establecido fuertes correlaciones entre la expresión de genes que codifican para expansinas y el crecimiento celular. Esto sugiere que dichas proteínas serían un punto de control endógeno para el crecimiento celular. (Cosgrove, 2000). Su expresión se encuentra regulada, no solo por procesos del desarrollo, sino que también se ve afectada por signos ambientales como por ejemplo estrés hídrico. (Zhao et al., 2012).

Para el caso de semillas, en varias especies se ha reportado ablandamiento del endosperma previo al evento de germinación (Groot & Karssen, 1987). Las paredes celulares del endosperma se componen principalmente de mananos, polímero que le otorgaría resistencia mecánica a este tejido. En *D. ferox*, el ablandamiento está acompañado por una disminución significativa de mananos de pared (Sanchez et al., 1990) y en tomate se han trazado relaciones entre la actividad de enzimas que degradan mananos y el evento de germinación (Nonogaki et al, 2000).

Como se ha mencionado con anterioridad, la actividad de enzimas con la propiedad de debilitar las rígidas paredes celulares, se encuentra regulada no sólo por mecanismos endógenos del desarrollo, sino que responden de una forma plástica a estímulos exógenos como la luz. La activación de fitocromos induce a respuestas concertadas donde se ven afectados los niveles hormonales de la semilla y esto, a su vez, modula el ablandamiento de las paredes celulares.

1.3. Fotomorfogénesis.

La luz es uno de los factores del ambiente más sutilmente evaluado por las plantas. A través del censado de múltiples parámetros de la luz ambiental, las plantas consiguen información de su entorno y de acuerdo a ello ajustan su crecimiento y desarrollo con el propósito de incrementar sus chances de sobrevivir y propagarse. La luz regula procesos de desarrollo dentro de los cuales, se encuentra la fotomorfogénesis (Jiao et al., 2007). Ésta involucra cambios morfológicos como la germinación, inhibición del alargamiento del hipocotilo, estimulación del desarrollo de los cotiledones, desarrollo de una maquinaria fotosintética funcional y crecimiento de la raíz (Chory et al., 1989; Deng et al., 1991). Estos cambios los realiza mediante un rearreglo masivo de expresión de genes que incluye la protección a los efectos nocivos de la luz (Tepperman et al., 2001).

Además, la presencia de plantas vecinas se traduce en cambios en la calidad de la luz percibida. El intervalo del espectro que abarca desde el Rojo Lejano (RL, 700-800 nm) hasta el Rojo (R, 600-700 nm) da cuenta de la densidad del follaje. La relación R/RL en suelos desnudos ronda el 1.1 mientras que dicha razón disminuye a medida que la presencia de plantas incrementa. Este efecto se debe a que las plantas son capaces de absorber la luz R y de reflejar el RL enriqueciendo la luz del ambiente con esta clase de fotones (Smith, 2000; Ballaré et al., 1999)

El primer paso en el proceso de la percepción de la luz es la captación de la misma mediante fotorreceptores específicos.

En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado y caracterizado mediante estudios genéticos, bioquímicos y moleculares distintas familias de moléculas capaces de absorber luz, a una longitud de onda específica, y hacer de ella una señal que

induce respuestas en las plantas. Existen cuatro grupos de fotorreceptores: los *fitocromos* que absorben principalmente entre las longitudes de onda del R y RL, los *criptocromos* que se activan en la franja del azul/UV-A, las *fototropinas* y *zeitlupe* cuyo rango de acción corresponde al azul. (Cashmore et al., 1999; Deng & Quail, 1999; Kim et al., 2007; Koorneef et al., 1980).

Para el caso de la germinación, los fotorreceptores involucrados son los fitocromos y la luz que desencadena respuestas en las semillas es la que corresponde al intervalo que va desde el RL hasta el R. (Casal et al., 1998b).

Fitocromos. Son moléculas formadas por una proteína ó apoproteína y un cromóforo (estructura que, al igual que la proteína a la que se une, cambia su conformación en respuesta a la luz). Se los conoce como Cromoproteínas. Son estructuras homodiméricas formadas por polipéptidos de aproximadamente 125Kda. A su vez, cada monómero cuenta con un dominio carboxi-terminal que media la dimerización y el dominio amino-terminal que se encuentra unido covalentemente a un cromóforo tetrapirrólico (Fig. 1.3.1). La excitación del cromóforo altera la conformación de la apoproteína y, como consecuencia, incide sobre su capacidad de acción biológica (Quail, 1991).

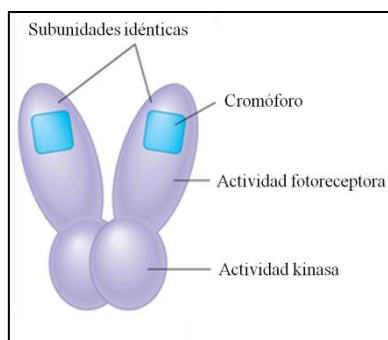


Fig. 1.3.1. Estructura del fitocromo.

Una de las características más importantes de los fitocromos es su fotointerconversión (Fig. 1.3.2): presentan dos formas estables dentro de las cuales oscilan según el tipo de luz absorbido. Se las conoce como P_r , cuyo máximo de absorción ronda los 660 nm y P_{fr} , donde la absorción es óptima en los 730 nm y es la forma biológicamente activa (Quail et al., 1995; Chory, 1997).

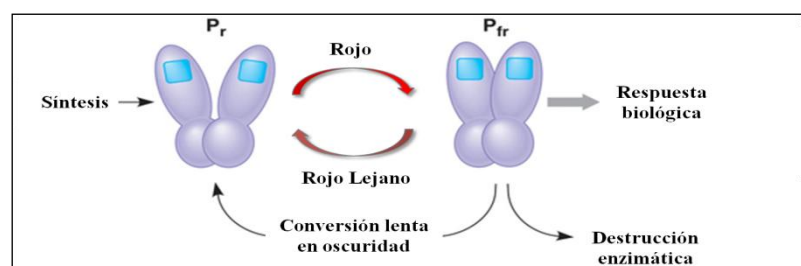


Fig. 1.3.2. Modelo de fotointerconversión de los fitocromos.

Como se observa en la Fig. 1.3.3, los espectros de absorción de P_{fr} y P_r se solapan. Esto se traduce en la existencia de fotoequilibrio dinámico entre las formas P_r y P_{fr} dentro de las células, dependiendo del tipo de luz al que se encuentre expuesto el sistema. La proporción del P_{fr} respecto al fitocromo total (P_{fr}/P), dependerá del espectro absorbido. Es decir, la luz monocromática correspondiente a 660 nm establecerá una alta proporción del P en su forma P_{fr} (87% aproximadamente) mientras que la luz monocromática de 730 nm presentará una proporción de P_{fr}/P cercana al 3%. Cuando se expone a las plantas a la luz solar, y dependiendo de su entorno, los valores de P_{fr}/P fluctuarán entre los valores previamente mencionados según la proporción de R y RL presentes (Mancinelli et al, 1994). Cuanto mayor sea la relación R/RL de luz incidente, mayor será el P_{fr}/P .

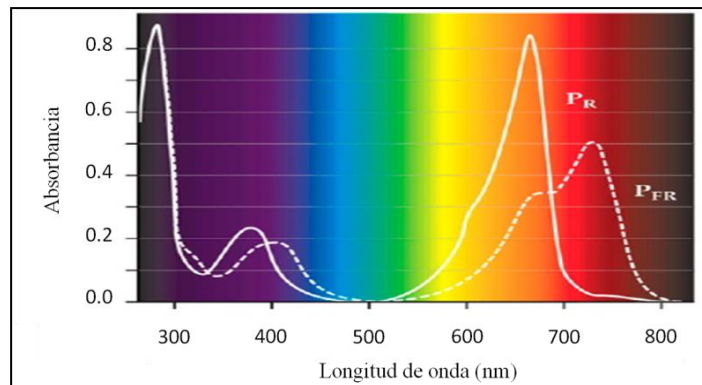


Fig. 1.3.3. Espectro de absorción de las formas estables interconvertibles de los fitocromos.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado y caracterizado cinco fitocromos: A, B, C, D y E. Mediante la utilización de herramientas de genética inversa (esto es: a partir del análisis de mutantes sin respuesta a un tratamiento dado, se identifica el potencial gen involucrado) se han establecido los principales roles fisiológicos de dichas apoproteínas (Devlin et al., 1998; Qin et al., 1997; Smith et al., 2000; Whitelam & Devlin, 1997). Los fitocromos mejor caracterizados de *A. thaliana* son el fitocromo A (phyA) y el fitocromo B (phyB) que además son los más importantes desde el punto de vista funcional.

Dentro de los fitocromos es posible establecer una categorización adicional: se han identificado fitocromos con distintos niveles de estabilidad del Pfr a la luz.

- Tipo I: Inestables a la luz. phyA (su vida media oscila entre 1 y 2 h).
- Tipo II: Estables a la luz (phyB-phyC-phyD-phyE).

Para el caso del phyA, su inestabilidad frente a la luz le confiere características especiales que determinan los procesos en los cuales cumple roles centrales. Por un lado, su corta vida media establece una competencia entre la acción biológica y los procesos de destrucción (Clough & Viestra, 1997). Por otro, puede interferir

en procesos donde la cantidad de Pfr necesaria para gatillar una respuesta sea muy baja. Es decir, donde la luz incidente responda a razones bajas de R/RL.

Modo de acción de los fitocromos. Los fitocromos están involucrados en distintos procesos durante todo el ciclo de vida de la planta. La acción de estos se encuentra modulada mediante la cantidad y calidad de luz percibida. Cuando se hace referencia a la cantidad de luz se habla del número de fotones incidentes por unidad de superficie ($\mu\text{Mol. m}^{-2}$).

Se conocen tres modos de acción a los cuales se vinculan los fitocromos (Casal et al., 1998b).

- **VLFR** (de sus siglas en inglés: Very Low Fluence Response). La respuesta a muy bajos flujos tiene lugar cuando la cantidad de luz no supera los $5 \mu\text{Mol. m}^{-2}$. Por lo tanto, este tipo de respuesta está vinculada a la acción de cantidades bajas de Pfr (menores al Pfr/P: 0.03). Esto impone una característica adicional y sumamente importante: es un tipo de respuesta que no permite reversibilidad por acción del RL. En *Arabidopsis thaliana* el fitocromo involucrado en este tipo de respuesta es el phyA. A efectos prácticos es posible estimar el VLFR mediante la comparación entre las respuestas conseguidas en tratamientos donde se expone material a RL y Oscuridad. La diferencia entre ambas evaluaciones se la conoce como respuesta a muy bajo flujo. (Casal et al., 1998b).

- **LFR** (Low Fluence Response). La respuesta a bajos flujos se dispara en situaciones establecidas por Pfr/P altos conseguidos mediante luz R. La característica fundamental de este tipo de respuesta es su reversibilidad: es posible inactivar el estímulo disparado mediante la acción de un pulso de RL. Es

importante destacar que esta reversibilidad tiene lugar en un período de tiempo finito. Los fitocromos principalmente responsables de este tipo de respuesta son, en primer lugar, el PhyB y luego phyD y phyE (Franklin et al., 2003). El modo de calcular la magnitud de la Respuesta a Bajos Flujos es estimando la respuesta al R y restándole la respuesta a RL.

- **HIR** (High Irradiance Response). Para conseguir este tipo de respuesta es menester una exposición prolongada o continua a altas irradiancias. Esto significa que no sólo es importante la cantidad de fotones absorbida, sino también el tiempo en que esto sucede. Este tipo de respuesta tiene un nivel de saturación mucho mayor que el que presenta una LFR y no es fotorreversible. El fitocromo involucrado es el phyA. (Casal et al., 1998a; Casal et al., 2003).

Tanto las respuestas VLFR como LFR son proporcionales a la cantidad de Pfr establecida y esto permite graficar una determinada respuesta fisiológica en función a la cantidad de fotones incidentes. Se observa una curva bifásica de intensidad de respuesta cuya variable independiente es la proporción Pfr/P. (Fig. 1.3.4).

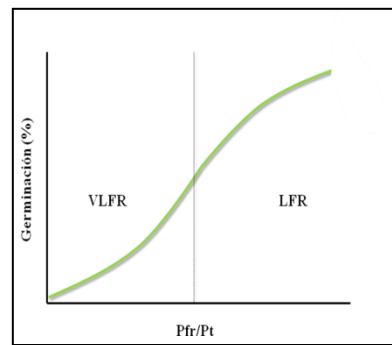


Fig. 1.3.4. Modos de acción de los fitocromos.
Respuestas a muy bajo flujo (VLFR) y bajo flujo (LFR).

La primera fase de la curva corresponde al tipo de respuesta a muy bajo flujo, mientras que la segunda porción se le adjudica a la inducción por LFR. Este tipo de respuesta bifásica se ha observado en procesos como germinación (Cone et al., 1985), expansión de cotiledones (Casal, 1994) y síntesis de antocianas (Drumm & Schopfer., 1974), entre otras.

Efectos de la luz mediante la acción de fitocromos.

La luz es capaz de promover o inhibir la germinación de las semillas; esto depende de su irradiancia y composición espectral, del estado fisiológico de las semillas y de otros factores ambientales como ser la temperatura y disponibilidad de agua (Casal & Sanchez, 1998).

La germinación inducida por luz se encuentra modulada únicamente por acción de los fitocromos. La pérdida de la dormición debido a condiciones propias del suelo ó procesos controlados de incubación pueden provocar que algunas semillas adquieran una sensibilidad superlativa a la luz (Casal & Sanchez, 1998). En estos casos una exposición del rango de milisegundos, es capaz de inducir la germinación; esto se conoce como respuesta a muy bajo flujo (VLFR). Para el caso de Arabidopsis, el fitocromo involucrado en dicha respuesta es el phyA. Esta respuesta se ve saturada por bajas proporciones de Pfr, y no experimenta la clásica reversibilidad entre rojo y rojo lejano (Botto et al., 1998). Este modo de acción de los fitocromos resulta de suma importancia a nivel agronómico ya que una breve exposición a la luz durante la labranza del suelo sería suficiente para estimular semillas e inducir las a germinar (Scopel et al., 1991).

En otras condiciones fisiológicas, la salida de la dormición requiere de proporciones de Pfr más altas y la germinación responde a un tipo de respuesta rojo-rojo lejano reversible (Borthwick et al., 1952). Cuando el modo de acción involucrado es el de respuesta a bajo flujo (LFR), el principal fitocromo involucrado en semillas de Arabidopsis es el phyB.

La inhibición de la germinación mediada por luz se produce por acción del rojo lejano ó azul (Bewley et al., 1978). Con muy pocas excepciones, la inhibición inducida por rojo lejano requiere de exposiciones prolongadas a la luz o pulsos

frecuentes siendo dependiente de la irradiancia. Estos efectos se conocen con respuesta a alta irradiancia (HIR) y en tomate, por ejemplo, son llevados a cabo por el fitocromo A (Shichijo et al., 2001).

1.4. Rol de las hormonas durante la inducción de la germinación y salida de la dormición.

La germinación es uno de los eventos de desarrollo que se encuentra fuertemente regulado por la luz incidente. Durante este proceso fisiológico, la semilla experimenta cambios trascendentes modulados y coordinados por hormonas. No obstante, el estado endógeno de las semillas, reflejado por su escenario hormonal, afecta sustancialmente el tipo de respuesta disparado por acción de la luz. (Neff et al., 2006). Claramente, la fotomorfogénesis debe ser entendida como la interacción de múltiples factores involucrados en la traducción de señales reguladas tan sutilmente, que les confieren a las plantas una plasticidad tal que les permite adaptarse al cambiante escenario al que se encuentran sometidas. Se han reportado varias hormonas capaces de regular la división y expansión celular que acompaña el crecimiento. Las giberelinas, auxinas y brasinoesteroides se consideran hormonas estimulantes del mismo. Tanto el etileno como las citoquinas fueron originariamente caracterizadas como hormonas que lo inhiben (Neff et al., 2006). De todas formas, estas fitohormonas son capaces de actuar de forma concertada o bien de modo antagónico. Además, existen casos donde las hormonas que típicamente actuaban como inhibidores promueven en verdad el crecimiento y viceversa.

1.4.1. Giberelinas.

Las giberelinas (GA) regulan varios procesos del desarrollo a lo largo del ciclo de vida de una planta, desde la germinación, pasando por la expansión de las hojas, la inducción de la floración, hasta el control del desarrollo de la semilla. (Sun & Gubler, 2004).

Las rutas biosintéticas de las giberelinas se han dilucidado con la asistencia de herramientas bioquímicas y aproximaciones genéticas. Sólo los pasos iniciales de biosíntesis se encuentran conservados de forma interespecífica, siendo los últimos donde se observan diferencias según la especie. La biosíntesis de giberelinas se inicia con la modificación enzimática del precursor Geranilgeranil difosfato hasta conseguir GA₄ (forma biológicamente activa) (Hedden & Phillips, 2000). De todas formas, en la mayoría de los casos se requiere de la actividad de enzimas del tipo 20 Oxidasa (GA20OX) y 3 Oxidasa (GA3OX) para mantener los niveles de GA. En las vías de desactivación se destaca la enzima 2 Oxidasa (GA2OX). Los niveles endógenos de GA dependen de una autoregulación transcripcional donde altos niveles de GA inhiben la expresión de genes que codifican para GA20OX y GA3OX y promueven, a su vez, la expresión de GA2OX (Weiss et al., 2007).

Dentro de las vías de transducción de señales de giberelinas, se han identificado proteínas DELLAs pertenecientes a la familia GRAS (factores de transcripción específicos de plantas) caracterizadas como reguladores negativos de las vías de acción de las giberelinas. En Arabidopsis se han identificado cinco DELLAs: RGA, GAI, RGL1, RGL2 y RGL3.

GA₄ se liga a uno de sus receptores (denominado GID) causando un cambio conformacional que le permite al complejo GA₄-GID unirse a DELLAs (Fig. 1.4.1.1). Esta vinculación favorece la interacción con una proteína del tipo

Ubiquitin ligasa (SCF E3) mediante la acción de proteínas del tipo F-box. En conjunto, el resultado de la interacción de estos componentes favorece a la ubiquitinación de las proteínas DELLA y su consecuente degradación mediante proteosoma 26S. (Dill et al., 2004).

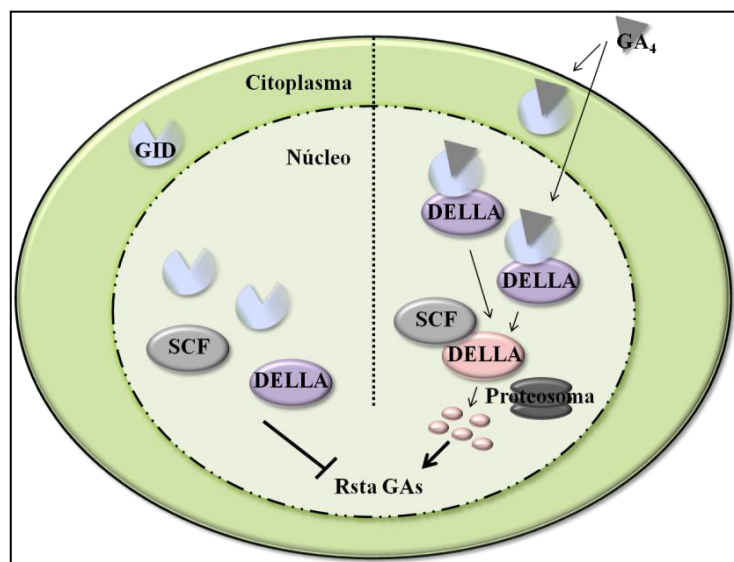


Fig. 1.4.1.1. Ruta de acción de las giberelinas y su interacción con las proteínas DELLAs.

Resulta importante destacar que el modo en que las plantas responden a GA depende de los niveles hormonales presentes y de la sensibilidad de los tejidos a dicha hormona (Kamiya & Garcia-Martinez, 1999).

Se ha sugerido interacción entre la luz y las vías de las giberelinas en semillas (Hilhorst & Karssen, 1988). En lechuga, arveja y *Arabidopsis*, por mencionar algunos ejemplos, se requiere de luz roja para germinar. Sin embargo, el agregado de giberelina exógena compensa la falta de luz, sugiriendo que la luz roja modularía positivamente la biosíntesis de giberelinas (Yamaguchi & Kamiya, 2001). Además, la acción del pulso de rojo puede neutralizarse por acción de un pulso de rojo lejano. Esto último involucra a los fitocromos en dicho proceso.

Existe sobrada evidencia que da cuenta que varias enzimas de las biosíntesis, como así también la retroalimentación que modula los niveles endógenos propios de las GA, se encuentran bajo el control de la luz. (Hedden et al., 1997; Hedden & Phillips, 2000; Ogawa et al., 2003).

1.4.2. Ácido Abscísico.

El ácido abscísico (ABA) es un derivado de los carotenoides y se lo vincula con la inducción de genes que intervienen en la respuesta al estrés, el cierre de estoma, y desarrollo de las semillas (Nambara & Marion-Poll, 2005). Por otro lado, el ABA reprime la germinación y se presume estabiliza el estado de dormición de las semillas (Finch Savage et al., 2006).

El primer precursor de ABA es la Zeaxantina a partir del cual se genera anteraxantina y trans-violaxantina, estos últimos son convertidos a su vez en compuestos de 40C que una vez cortados forman compuestos de 15C y 25C. Las enzimas involucradas en estos pasos aún no se han identificado. De todas formas, se ha establecido que la síntesis de 9-cis-xantosina a partir de 9-cis-neoxantina o 9-cis-violaxantina se encuentra modulada por la acción de 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) consiguiendo el primer precursor citosólico del ABA. La expresión de NCED responde a estrés ambiental y la actividad de esta enzima es quien determina la velocidad de la biosíntesis de ABA (Fig. 1.4.2.1).

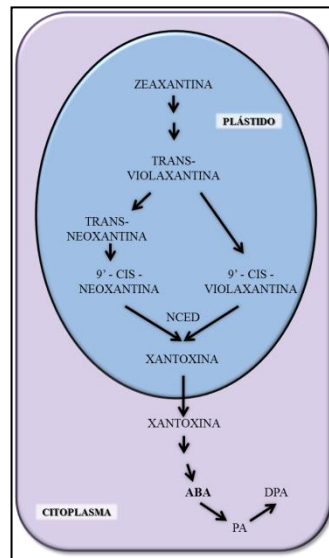


Fig. 1.4.2.1. Biosíntesis de Ácido abscísico.

Con respecto a las reacciones de las vías catabólicas, es posible categorizarlas en dos tipos: de hidroxilación y conjugación. Normalmente el ABA es convertido en un compuesto hormonalmente inactivo e inestable mediante la intervención de ABA 8'-Hidroxilasa. En *Arabidopsis*, esta enzima pertenece a una familia formada por cuatro miembros (AtCYP707A1-4). El 8'-hidroxi ABA isomeriza espontáneamente a ácido faseico (PA) para luego catabolizar a ácido dihydrofaseico (DPA).

La disminución de los niveles de ABA durante la imbibición de las semillas correlaciona con un incremento en PA. Por otro lado, se ha propuesto que la hidroxilación del ABA modularía los niveles de dormición de las semillas (Rodríguez-Gacio et al., 2009).

1.5. Integración de señales: luz y hormonas.

Como se ha mencionado con antelación, la luz es un factor ambiental que modula diversos procesos del desarrollo y crecimiento de las plantas. En dichos procesos, múltiples vías hormonales se ven afectadas por acción de la luz siendo las intermediarias de estos cambios en el sistema. A su vez, los niveles hormonales de las plantas representan señales endógenas que influyen sobre las respuestas a la luz. Es por ello, que la interacción entre las hormonas y la luz se ha estudiado intensamente y evaluaciones recientes han identificado los factores que conectan ambas vías. Estos integradores se han definido como PIFs (Phytochrome Interacting Factor). Los PIFs representan componentes centrales que regulan la respuesta a la luz mediante la acción de los fitocromos. Los procesos en los que se encuentran involucrados son los de fotomorfogénesis mediante la regulación de los niveles de GA, ABA, auxinas y citoquininas (Lau & Deng, 2010). Con respecto a la germinación, está controlada por PIF1, también conocido como PIL5 que la modula negativamente. En oscuridad, PIL5 reprime la germinación mediante la disminución de la respuesta a GA y la regulación de los niveles de GA y ABA. Como paso inicial, PIL5 activa directamente la transcripción de dos DELLAS: *GAI* y *RGA* quienes son reguladores negativos de los niveles de GA (Fig. 1.5.1). En presencia de luz, los fitocromos asisten a la destrucción de PIL5 anulando los efectos negativos de la actividad de este factor de transcripción sobre la germinación de las semillas.

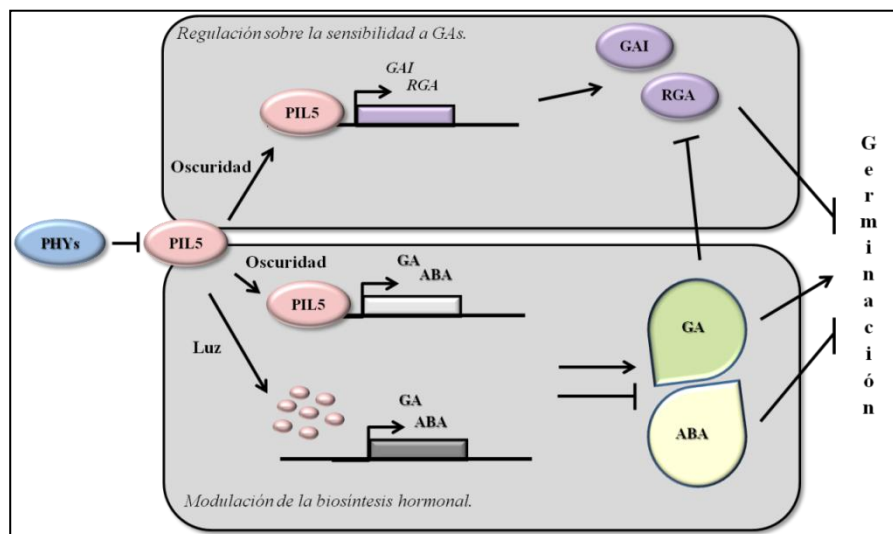


Fig. 1.5.1. Actividad de PIL5 durante la germinación.

1.6. Modelo de Estudio: *Arabidopsis thaliana*.

El sistema de estudio utilizado para el desarrollo de esta tesis fue *Arabidopsis thaliana*. Los fundamentos sobre los cuales se realizó dicha selección se detallan a continuación.

Arabidopsis thaliana pertenece a la familia de las crucíferas que ha llegado a ser uno de los más importantes sistemas para el estudio de muchos aspectos de la biología de las plantas. Sus características ofrecen ventajas únicas para ser considerada modelo de investigación.

En primer lugar, es diploide con un ciclo de vida corto (6-8 semanas), de fecundación autógena, y produce numerosas semillas que permanecen viables durante años. Su rápido crecimiento permite el análisis de un gran número de individuos en un mínimo espacio y por lo tanto, la consiguiente amplificación rápida de los genotipos útiles para posteriores estudios.

Además, su compacto genoma y la decodificación completa del mismo la convierten en un sistema ideal para estudios genéticos y moleculares.

Por otro lado, puede ser transformada por *Agrobacterium tumefaciens* y mediante el plásmido Ti es posible introducir genes de interés y mantenerlos de forma estable.

Considerando los procesos de germinación y dormición evaluados en esta tesis, *Arabidopsis thaliana* es una especie capaz de germinar en respuesta a la luz y con bajos niveles de dormición.

1.7. Objetivos.

Debido a que los requerimientos para que la germinación ocurra se modifican junto con los niveles de dormición de una población de semillas, y teniendo presente que sería de suma utilidad ser capaces de establecer un modelo predictivo de la emergencia de las semillas en un banco agrícola, resulta indispensable entender los mecanismos mediante los cuales el ambiente determina cambios en los requerimientos sobre los factores exógenos para atenuar o intensificar los niveles de dormición de las semillas.

El objetivo general de esta tesis es estudiar algunos de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la salida de la dormición por luz y la entrada en dormición secundaria en semillas de *A. thaliana*. En particular en esta tesis indagamos:

(a) el transcriptoma asociado al phyA que promueve la germinación de las semillas con un pulso de luz RL;

(b) mecanismos fisiológicos y moleculares que participan en la entrada en dormición secundaria cuando las semillas embebidas son incubadas a temperatura constante en oscuridad.

Objetivos específicos:

1. Establecer el perfil de expresión que tiene lugar durante la salida de dormición primaria y la germinación en respuesta al RL por acción de phyA.

2. Evaluar similitudes y diferencias a nivel transcripcional de semillas inducidas a germinar con distintos tipos de luz (R y RL) mediante la acción de phyB y phyA.
3. Analizar la entrada en dormición secundaria de semillas en respuesta a la incubación prolongada en oscuridad a temperatura constante.
4. Determinar el modo en que reguladores centrales ya caracterizados de la dormición primaria afectan y regulan la entrada en dormición secundaria.
5. Evaluar cambios en la sensibilidad y respuesta a hormonas (GA y ABA) durante el proceso de entrada en dormición secundaria.

CAPÍTULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Condiciones generales de germinación y crecimiento de plantas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas en cajas de plástico transparentes con 5ml de ágar-agua 0.8% (p/v) y se incubaron a 5C en total oscuridad durante 72h. Luego se sometieron a luz roja por 2 h volviendo a oscuridad por otras 24 h a 25C. Finalmente, se expusieron a luz blanca hasta ser trasplantadas en recipientes plásticos de 250 cm³ con una mezcla de vermiculita, turba y perlita en iguales proporciones. Para su crecimiento se utilizó una solución nutritiva de Hakaphos® violeta (13-40-13+MgO+M.E).

Las plantas fueron cultivadas en invernáculo bajo condiciones de temperatura que oscilaron entre 18 y 23C en períodos en los cuales los días presentaron no menos de 10 h de luz.

Los genotipos requeridos para cada experimento fueron cultivados en simultáneo y sus semillas cosechadas en el momento en que todas las silicuas estuvieran completamente secas. Las semillas fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a 25C hasta que consiguieran el estado fisiológico deseado y luego conservadas a 5C.

2.2 Condiciones lumínicas y experimentos de germinación en *Landsberg erecta*.

2.2.1 Ensayo fisiológico.

Muestras de 20 semillas por genotipo (Ler y *phyA201*) fueron sembradas en cajas plásticas con 5mL de agar-agua 0.8% (p/v). Con el objeto de evitar efectos indeseados causados por altos niveles de Pfr presentes en las semillas secas, estas fueron embebidas por 2 h en oscuridad a 25C y luego irradiadas con un pulso

saturante de RL de 20 min con el objeto de establecer el mínimo e idéntico fotoequilibrio entre las unidades experimentales y de este modo minimizar la germinación en oscuridad.

Las cajas se incubaron en completa oscuridad durante 24 h. Luego, las semillas fueron expuestas a pulsos de 20 min de RL con filtros RG9 con el objeto de establecer cocientes de Pfr/P de 0.03 (42mmol 22m 21s) ó de 20 min de R equivalente a un cociente de Pfr/P de 0.87 (35mmol 22m 21s) (Casal et al., 1991). El control se mantuvo en total oscuridad durante los tratamientos. Seguido a estos tratamientos de luz, las muestras volvieron a oscuridad durante 72 h hasta el momento de contabilizar germinación. El criterio utilizado para determinar germinación fue el de emergencia de la radícula calculándose con ello el porcentaje (%) de germinación obtenido en cada caso. En estos experimentos, la clásica respuesta reversible de bajo flujo (LFR) se calculó como la diferencia en el porcentaje de germinación en R y RL, mientras que la respuesta a muy bajo flujo (VLFR) se estimó en base a la diferencia en el porcentaje de germinación establecido por el pulso de RL y el observado en el control de oscuridad (Casal et al., 1998b).

2.2.2. Tratamiento a muestras analizadas mediante microarreglos.

Seis muestras de semillas de 28 mg c/u de los genotipos Ler y *phyA201* fueron sembradas en cajas plásticas con 5 mL de ágar-agua 0.8% (p/v). Se las conservó en oscuridad a 25C durante 2 h hasta que se las sometió a un pulso de RL de 20 min. Luego se las mantuvo en oscuridad absoluta por un período de 24 h a 25C. Dos unidades experimentales de cada genotipo provenientes de la oscuridad

fueron cosechadas y conservadas a -70C. Las muestras restantes fueron irradiadas con RL por 20 min y devueltas a oscuridad. Transcurridos 30 min y 5 h luego de la finalización del pulso se realizaron 4 nuevas cosechas (dos por genotipo) por punto y conservadas a -70C.

2.2.3. Tratamiento a muestras analizadas mediante q-Real Time.

Cuatro muestras de semillas (28 mg c/u) de los genotipos Ler y *phyA201* fueron sembradas en cajas plásticas con 5 mL de ágar-agua 0.8% (p/v). Se las conservó en oscuridad a 25C durante 2 h hasta que se las sometió a un pulso de RL de 20 min. Luego se las mantuvo en oscuridad absoluta por un período de 24 h a 25C. Dos unidades experimentales de cada genotipo provenientes de la oscuridad fueron sometidas a un pulso de RL de 20 min mientras que las restantes se mantuvieron en completa oscuridad. Transcurridas 5 h de finalizado el pulso se cosecharon todas las muestras. El material se conservó a -70C.

2.3. Condiciones lumínicas y experimentos de germinación en Columbia.

2.3.1. Ensayo fisiológico.

Muestras de 20 semillas por genotipo (Col, *phyA*: salk_014575C, *phyB*: salk_069700, *dog1*: salk_000867, *pil2*: salk_147579C, *myb66*: salk_114008C, *gasa4*: salk_042431C, *saur-like*: salk_134586C y *pin7*: salk_044687C obtenidos de ABRC, www.arabidopsis.org) fueron sembradas en cajas plásticas con 5mL de ágar-agua 0.8% (p/v). Con el objeto de evitar efectos indeseados causados por altos niveles de Pfr presentes en las semillas secas, estas fueron embebidas por 2 h en oscuridad a 25C y luego irradiadas con un pulso saturante de RL de 20 min con el objeto de establecer el mínimo e idéntico fotoequilibrio entre las unidades experimentales y de este modo minimizar la germinación en oscuridad.

Las cajas se incubaron en completa oscuridad durante períodos variables (desde 1 hasta 10 días) a 25C. Luego, las semillas fueron expuestas a pulsos de 20 m de RL con filtros RG9 con el objeto de establecer cocientes de Pfr/P de 0.03 (42mmol 22m 21s) ó de 20 min de R equivalente a un cociente de Pfr/P de 0.87 (35mmol 22m 21s) (Casal et al., 1991). El control se mantuvo en total oscuridad durante los tratamientos de luz. Seguido a esto, las muestras volvieron a oscuridad durante 72 h hasta el momento de contabilizar germinación.

2.3.2. Ensayo de germinación en medio suplementado con hormonas.

Muestras de 20 semillas se sembraron en cajas plásticas con 5 mL de agar-agua 0.8% (p/v). Rectángulos de 6 cm² de papel de filtro fueron embebidos en soluciones con distinta concentración de ABA o GA (0uM, 0.1uM, 1uM, 10uM y 100uM). Las unidades experimentales fueron mantenidas en oscuridad a 25C por

2 h y luego irradiadas con RL. Luego de períodos variables de incubación (según el genotipo 1, 2 ó 4 días) en oscuridad a 25C las muestras se sometieron a 20 min a un pulso R. Finalmente, cumplidas 72 h en oscuridad a 25C se evaluó el porcentaje de germinación de cada tratamiento. El control se mantuvo en total oscuridad durante los tratamientos de luz. Seguido a esto, las muestras volvieron a oscuridad durante 72 h hasta el momento de contabilizar germinación.

2.3.3. Ensayo de germinación en medio suplementado con inhibidores de hormonas.

Muestras de 20 semillas se sembraron en cajas plásticas con 5 mL de agar-agua 0.8% (p/v). Rectángulos de 6 cm² de papel de filtro fueron embebidos en soluciones con distinta concentración de ABA o GA (0uM, 0.1uM, 1uM, 10uM y 100uM) en presencia Fluridona (F) o Pacobutrazol (P), respectivamente. La concentración utilizada de P fue de 50uM mientras que la de F de 100 uM. Las cantidades de inhibidores utilizadas fueron escogidas a partir de curvas de respuesta realizadas para determinar los valores mínimos necesarios para bloquear completamente la actividad de las hormonas evaluadas (datos no mostrados). Las unidades experimentales fueron mantenidas en oscuridad a 25C por 2 h y luego irradiadas con RL. Luego de períodos variables de incubación (según el genotipo 1, 2 ó 4 días) en oscuridad a 25C las muestras se sometieron a 20 min a un pulso R. Finalmente, cumplidas 72 h en oscuridad a 25C se evaluó el porcentaje de germinación de cada tratamiento. El control se mantuvo en total oscuridad durante los tratamientos de luz.

2.4. Extracción de ADN de plantas.

Se utilizó tejido foliar joven de *Arabidopsis thaliana*, al cual se le realizó el siguiente procedimiento de extracción: Se pulverizó con nitrógeno líquido tejido foliar recién cortado y se lo expuso a 350 uL de buffer CTAB (2% de CTAB, 100 mM de tris base pH 8,0, 10 mM de EDTA y 0,7 M de NAC1) provisto de 2-β mercaptoetanol. Luego de una agitación suave se incubó por 0.5 h a 65°C. Se agregaron 300 uL de cloroformo se mezcló y luego centrifugó por 5 min a 14000 rpm. La fase acuosa fue tratada con 500 uL de isopropanol mantenida a temperatura ambiente por 15 min y luego centrifugada por otro cuarto de hora a 14000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el pellet obtenido lavado dos veces con 500 uL de etanol al 70%. Seguido a cada lavado con alcohol, se centrifugó por 2 min a velocidad máxima. Por último, se descartó el sobrenadante para permitir que el ADN se seque al aire libre por 1 h. El material genético extraído se resuspendió en 150 mL de H₂Omq.

2.5. Extracción de ARN total de semillas.

El ARN total de semillas fue extraído utilizando el kit Rneasy Plant Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo el protocolo del fabricante. La única modificación realizada fue la adición de polinilpirrolidona (PVP) al 10% al buffer de extracción.

2.6. Cuantificación de material genético.

La concentración de ADN se evaluó en geles de agarosa al 1% tomando como referencia marcadores estándar de ADN de λ no digerido, visualizados con Bromuro de Etídio bajo luz UV.

Por otro lado, la concentración ARN se determinó mediante espectrofotometría. Se utilizó 1 uL de muestra diluido en 200 uL de H₂Omq. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorción a 260nm y que las proteínas lo hacen a 280nm, se evaluó la razón de absorbancias en estas dos longitudes de onda para determinar la pureza del material genético. Una razón óptima de trabajo ronda el valor de 2.

Con el objeto de confirmar los datos obtenidos mediante espectrofotometría se corrió el ARN extraído en gel de Agarosa 2% con Bromuro de Etidio con el fin de descartar la posible presencia de ADN en la muestra o bien RNA degradado.

2.7. Obtención de cADN a partir de ARN.

Esta técnica fue utilizada para amplificar cADN a partir de ARN total siguiendo el protocolo:

En primer lugar y para evitar la posible interferencia de ADN contaminante en el ARN obtenido, las muestras se trataron con DNasa I del siguiente modo: Se trataron 2 µg de ARN total con 1µL de inhibidor de nucleasas de ARN (1U/ µL), 1 µL de DNasa I completándose hasta volumen final de reacción con buffer DNasa 10X. Esta solución fue incubada por un lapso de 30 min a 37C y luego inactivada con 1 uL de solución Stop. Para confeccionar cADN se utilizó la enzima

transcriptasa inversa que sintetiza el nuevo cADN en los sitios determinados según el tipo de cebador utilizado. Mezclamos 2µg de ARN total con 2 µL de cebadores oligo-dT e incubamos a 65C durante 5 min. Inmediatamente enfriamos a 4C. Añadimos a cada muestra 4 µL de buffer 5X, 1µL de dNTPs 250 µM de cada uno (1:1:1:1), 2 µL de DTT 100 mM, 1 µL de inhibidor de nucleasas de RNA (20 U/ µL), 0.2 µL de transcriptasa inversa (SuperScript IIRT) (200 U/ µL) y H₂Omq hasta un volumen final de 20 µL. Finalmente las muestras se colocaron en un termociclador con el siguiente protocolo de temperaturas: 10 min a 25C, 1 h a 42C, 15 min a 70C. Las muestras se resuspendieron en un volumen final de 160 µL.

2.8. Análisis de expresión de genes mediante q-Real Time.

La amplificación se llevó a cabo con FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche) empleando 2 uL de la dilución de cADN por reacción. La amplificación se realizó utilizando el siguiente programa: 1 ciclo de 10 min a 95C, 40 ciclos de 15 seg a 95C + 1 min a T_m.

Dado que el SYBR Green produce fluorescencia al unirse a moléculas de ADN doble cadena, pero de manera inespecífica a la secuencia, parte de la fluorescencia emitida puede corresponder a productos de amplificación inespecífica, o a dimerizaciones entre cebadores. Para verificar que el total de la fluorescencia emitida corresponde al producto de amplificación esperado, luego de la amplificación se realizó una reacción de disociación, mediante la cual se obtiene el valor de la temperatura de disociación del amplicón. La reacción de disociación se llevó a cabo de la siguiente forma: 15 seg a 95C, 1min a T_m y 15 seg a 95 C.

La reacción de PCR y la cuantificación de la fluorescencia fueron realizadas con un equipo ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Para cada punto se midieron dos muestras independientes. De cada muestra se realizaron dos réplicas técnicas, y el promedio de estos dos valores se tomaron como una repetición. Los datos de expresión de los genes de cada muestra fueron relativizados al nivel de expresión del gen PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) y UBC2 (Czechowski et al., 2005). Los cebadores utilizados y las condiciones de la reacción de PCR y se enumeran en la Tabla 2.8.1.

Nombre	ATG	Fw	Rv
<i>ABI3</i>	AT3G24650	CCGCCAACCTCGCAGTATAATC	CCTCCTCTGTCTCGCCATCC
<i>ABI5</i>	AT2G36270	CAATCAACAACAAGCAGCAGCAG	CCACCACTAAAGACACCAACACC
<i>A-MAN</i>	AT3G26720	TTATCTGATTCTGGCGGCGATTG	CGTGTGAGTGAGGAACTAAGTGAAC
<i>CYP707A2</i>	AT2G29090	GAGAATGGGAGAGAAGAAGGAGGAC	GAGAAGCCAAGTTAAGACAGAAGCG
<i>DOG1</i>	AT5G45830	AGAGCTGATCTTGCTCACCGA	TAGCTAGCTGCTCCGCAC
<i>EXP1</i>	AT1G69530	ACCTTCTTGTTTATTGCTACCCTTGG	AATGTGGCGTGTGCGTTGAC
<i>EXP10</i>	AT1G26770	CCTGGCTCAATCGTTGTAACCG	AGCAAGGTCAAAGTGTTCAGAGG
<i>EXP2</i>	AT5G05290	ATCATCGTCTCGGCTACAACTTC	CGTAAACCTTATCCCTCCACCTTTC
<i>FUSCA3</i>	AT3G26790	ACAACAACAACAACAACAGCAACAG	GAGGTAAGAGCCGTCGTGTGCG
<i>GA20OX3</i>	AT5G07200	TTCTCCTAACCCTCACGCTTTC	TTCACCACCGCCCGATGC
<i>GA3OX1</i>	AT1G15550	CCGAAGGTTTCACCATCACT	CCCCAAAGGAATGCTACAGA
<i>GAI</i>	AT1G14920	AGCGTCATGAAACGTTGAGTCAGTG	TGCCAACCCAACATGAGACAGC
<i>GASA4</i>	AT5G15230	ATGTGAAGTGAGCCAGAAACG	GCAAGCCTTGTGGTACTGTGTC
<i>GASA6</i>	AT1G74670	AAATGCCTTTGTGTCCCTCCAG	GGTCCACCTTGTGAGTCTTCC
<i>HAT4</i>	AT4G16780	GAGGTAGACTGCGAGTTCTTACG	TGTAGCCGACGGTTCTCTTCC
<i>NCED9</i>	AT1G78390	ATGCTTATCTGGCTTTAACCGAACC	CTCCGTCTTCTTCTCCGTCACC
<i>PHYA</i>	AT1G09570	CTGCCACCGACATCCCTCAAG	ACACAAGGTAAGGTCAAAGGAAAGC
<i>PIL2</i>	AT3G62090	AACCCGTGAGCAGATGAAGTAAAC	ATGAAGAAGAAGACCGTGAATCCG
<i>PP2A</i>	AT1G13320	TAACGTGGCCAAAATGATGC	GTTCTCCACAACCGCTTGGT
<i>RGA</i>	AT2G01570	CGGCACATCTTGGGTCTAACG	TCTCCTCCACACGATAACCTTGG
<i>RGL2</i>	AT3G03450	ATCCGCCACCAAAACCACTAC	AGCCTTCTTCTTATCCGCCATTG

Nombre	ATG	Fw	Rv
<i>TF</i>	AT1G09250	CGGAGACGAATCGGATTAAGTTACC	CGGCAACCAGGAACCAAACG
<i>UBC</i>	AT5G25760	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	TTGTGCCATTGAATTGAACCC

Tabla. 2.8.1. Secuencia de cebadores para la evaluación de transcritos mediante q-Real Time.

2.9. Análisis de expresión de genes mediante microarreglos.

5 ug de ARN de cada muestra fueron procesados según el protocolo del Gene Chip Expression Analysis (Affymetrix) y utilizado para hibridar los microchips ATH1 (Affymetrix) que contienen oligonucleótidos de ADN que representan aproximadamente 24000 genes diferentes. Este procedimiento e hibridación fueron realizados por el servicio Affymetrix de IFEVA. Los chips se realizaron por duplicado (muestras biológicas independientes) para cada punto a muestrear.

Los datos de expresión fueron normalizados con la suma de cada microarreglo (Clarke y Zhu, 2006). El análisis de expresión fue restringido a aquellos genes que mostraban P (presencia en el software Affymetrix) en ambas repeticiones de al menos una de las condiciones experimentales. Con el propósito de identificar genes regulados diferencialmente por *phyA*, los valores de expresión de cada uno de los genes fue sometido a un ANOVA de dos vías y se seleccionaron aquellos que presentaron un valor de *p* menor a 0.01. Esta extensa información debió ser analizada cuidadosamente para reducir las probabilidades de considerar genes que se expresan significativamente cuando en realidad eso no sucede (falso positivo). Storey y Tibshirani (2003) proponen un método para el manejo de este tipo de información a través del cálculo de un valor “*q*” que permite conocer la probabilidad de ocurrencia de “falso positivos” dentro de un conjunto considerado como significativamente afectados. El valor “*q*” se obtuvo a partir de “*p*”. Se seleccionaron los genes que presentaron valores $q < 0.01$.

Las anotaciones de los genes fueron actualizadas utilizando los recursos disponibles en la página web del TAIR (www.arabidopsis.org).

Los agrupamientos de genes se realizaron mediante el programa DNA Chip Analyzer (www.dchip.com) desarrollado por Li y Wong (2003). Tanto el análisis de ontología génica como el diagrama de Venn se realizaron mediante herramientas proporcionadas por <http://bar.utoronto.ca/>. La significancia de solapamiento entre dos grupos de genes se obtuvo mediante el cálculo de RF, el cual representa el número de solapamiento dividido el valor de solapamiento esperado de dos grupos independientes de genes (http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html). Los factores de transcripción fueron evaluados mediante los métodos desarrollados en Palaniswamy et al. (2006) y la base de datos perteneciente a AGRIS (<http://Arabidopsis.med.ohio-state.edu/AtTFDB>). Finalmente, las secuencias promotoras fueron analizadas mediante Athena (www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/analysis_select.pl)

2.10. Cuantificación de ABA y GA.

100 mg de semillas fueron molidas e incubadas a 48C por 12 horas en 2ml de Isopropanol:Ácido acético (99:1). Luego de 5min de centrifugación a 13.000 G a 48C se removió el sobrenadante. El pellet fue sometido a 1ml de solución de extracción por 2 h y luego se lo mezcló nuevamente con el sobrenadante. El producto se secó y luego resuspendió en 50ml de Metanol.

Se utilizaron soluciones de 50 ng de d2-GA1, d2-GA4 y d6-ABA como estándares de cantidad. Para el análisis se inyectaron y analizaron 2ml de muestra mediante Cromatografía líquida (UPLC)-MS. (Dave et al., 2011).

Tanto ABA, GA1 como GA4 fueron cuantificados utilizando factores de calibración conseguidos a partir de estándares internos y de las fitohormonas evaluadas.

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS

SECCIÓN 3.1:

PROGRAMA TRANSCRIPCIONAL DE LA GERMINACIÓN MEDIADA POR PHYA¹

¹ Ibarra S.E., Auge G., Sánchez R.A. & Botto J.F. (2013). *Transcriptional programs related to phytochrome A function in Arabidopsis seed germination*. Mol Plant, 6(4):1261-73.

El momento en que una semilla germina constituye un evento crucial en el ciclo de vida de una planta (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Para las semillas, la luz representa una fuente fundamental de información que da cuenta de las cualidades ambientales teniendo gran relevancia para el ajuste de las plantas a su hábitat (Donohue, 2002). En *Arabidopsis*, tanto la salida de la dormición como la promoción de la germinación mediada por la luz, se encuentra a cargo exclusivamente de los fitocromos (Bae & Choi, 2008). Por su parte el fitocromo B (phyB), junto con otros fitocromos estables, percibe el Rojo (R) mediando respuestas del tipo LFR; mientras que el fitocromo A (phyA) es el principal responsable de las respuestas del tipo VLFR disparadas por cantidades muy bajas de Pfr, y frecuentemente se satura con valores menores aún que los establecidos por pulsos de RL (Rojo Lejano). La labranza del suelo es capaz de inducir la germinación de malezas presentes en el banco de semillas del terreno, ya que su perturbación puede exponerlas a cantidades de fotones suficientes como para establecer niveles de Pfr capaces de disparar respuestas del tipo VLFR (Botto et al., 1998; Botto et al., 2000; Scopel et al., 1991).

Si bien la salida de la dormición y la inducción de la germinación pueden medirse tanto por el phyA como por el phyB, los mecanismos moleculares involucrados no son idénticos. Mientras que la información acerca de las vías de acción del phyB durante la salida de la dormición y la inducción de la germinación es abundante (Penfield et al., 2005; Oh et al., 2006; Oh et al., 2007; Kim et al., 2008; Oh et al., 2009; Gabriele et al., 2010; Park et al., 2011), poco se conoce acerca del modo en que el phyA media dicho fenómeno. Un elemento central de las vías de acción del phyB es PIL5 que reprime la germinación de

forma directa o indirecta a través de las proteínas DELLA (RGA y GAI) y SOMNUS entre otros (Oh et al., 2007; Kim et al., 2008; Gabriele et al., 2010; Park et al., 2011).

El análisis global de expresión que tiene lugar durante la germinación disparada por R ha demostrado que en gran parte, si no es que en toda, la acción del Pfr de phyB sucede a través de Pil5 (Oh et al., 2009). De forma similar, el hecho de que el phyA presente la capacidad de unirse a PIL5 e inducir su degradación, permitió postular que la promoción de la germinación mediada por el phyA también se encuentre sujeta en gran medida a la acción de pil5 (Seo et al., 2009).

Sin embargo, se han reportado evidencias experimentales sugiriendo que factores independientes a PIL5 serían necesarios para inducir la germinación mediante la luz: el incremento en los niveles de germinación de *pil5* y *phyBpil5* en respuesta al RL abona la idea de la existencia de elementos alternativos involucrados en el proceso de germinación mediado por el phyA (Oh et al., 2004). Además, Penfield et al. (2010) han reportado que semillas *pil5* con bajos niveles de dormición responden de modo distinto frente al RL con respecto a su desempeño en oscuridad, reforzando la idea de que la germinación mediada por phyA sería, al menos en parte, independiente de PIL5. Sobre dicha evidencia fisiológica, y en el marco de esta tesis doctoral, se ha evaluado la posibilidad de que la germinación mediada por phyA involucre a elementos independientes a la acción de PIL5.

3.1.1. Identificación del patrón de expresión temporal de genes regulados por phyA.

Con el propósito de establecer un perfil de expresión transcripcional que respondiese a la inducción de la germinación por acción de la luz RL, se realizó un ensayo de microarreglos donde se evaluó la respuesta de semillas salvaje del ecotipo *Landsberg erecta* y mutantes nulas del phyA. Las semillas de ambos genotipos fueron incubadas en oscuridad por 24 h a temperatura constante de 25C y luego irradiadas con luz R ó RL para inducir la germinación. Alrededor del 50% de semillas salvajes germinaron en respuesta al pulso de luz RL y el 100% germinó con el pulso de R. En concordancia con lo esperado, las semillas deficientes en el phyA no germinaron en el tratamiento realizado con RL pero si lo hicieron en respuesta a la luz R. (Fig. 3.1.1.1)

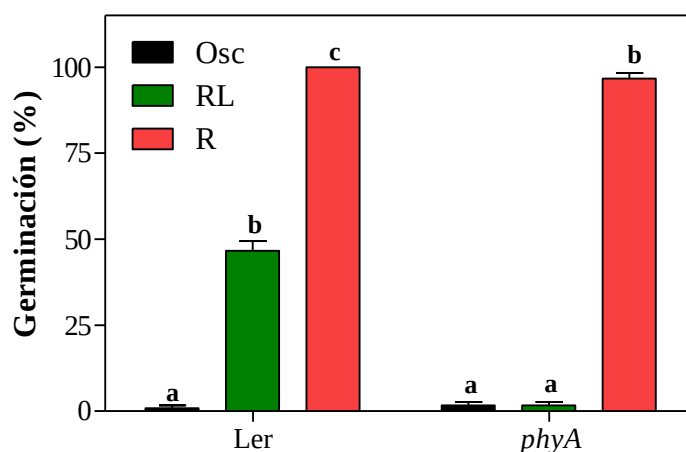


Fig. 3.1.1.1. Porcentaje de germinación de semillas incubadas por 24 h a 25C en respuesta a un pulso de luz. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos lumínicos dentro de cada genotipo. Fisher, p: 0.05.

Estas semillas fueron utilizadas para evaluar el perfil transcriptómico que tiene lugar en respuesta a la inducción de la germinación por acción de la luz RL y el

modo en que el *phyA* modula dicho proceso. Se llevó a cabo un análisis global de transcriptoma utilizando microarreglos ATH1 Affymetrix con muestras biológicas de Ler y *phyA* extraídas en tres tiempos diferentes: inmediatamente antes del pulso de luz, 0.5 y 5 h luego de finalizado el tratamiento lumínico (Fig. 3.1.1.2).

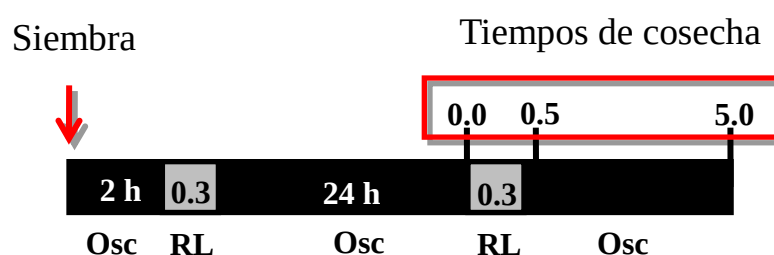


Fig. 3.1.1.2. Protocolo experimental para las extracciones de ARN utilizado en el análisis de microarreglos ATH1. Las muestras se extrajeron en tres tiempos: 0, 0.5 y 5 h luego del pulso de RL.

El primer criterio de selección utilizado fue considerar solamente aquellos oligonucleótidos detectados en todas las muestras técnicas en al menos un tratamiento. Fueron seleccionados 12745 oligonucleótidos de los 22746 presentes en los chips ATH1. A partir de esta base de datos, y mediante la realización de un ANVA, se identificaron 1388 genes (11% del total del genoma de *Arabidopsis thaliana*) con niveles de expresión significativamente distintos en al menos un tratamiento evaluado (Para el análisis estadístico, véase *materiales y métodos*). Estos genes se agruparon en función del efecto causado en sus niveles de expresión en respuesta al pulso de RL en presencia o ausencia del *phyA*. De este modo, se encontraron 1033 cuyos niveles incrementaron en respuesta al tratamiento lumínico mientras que 356 disminuyeron.

Se realizó una segunda clasificación (Fig. 3.1.1.3) donde se generaron cuatro agrupamientos en función del momento en que la expresión se vio modificada: genes regulados positiva o negativamente de forma temprana o tardía por el phyA.

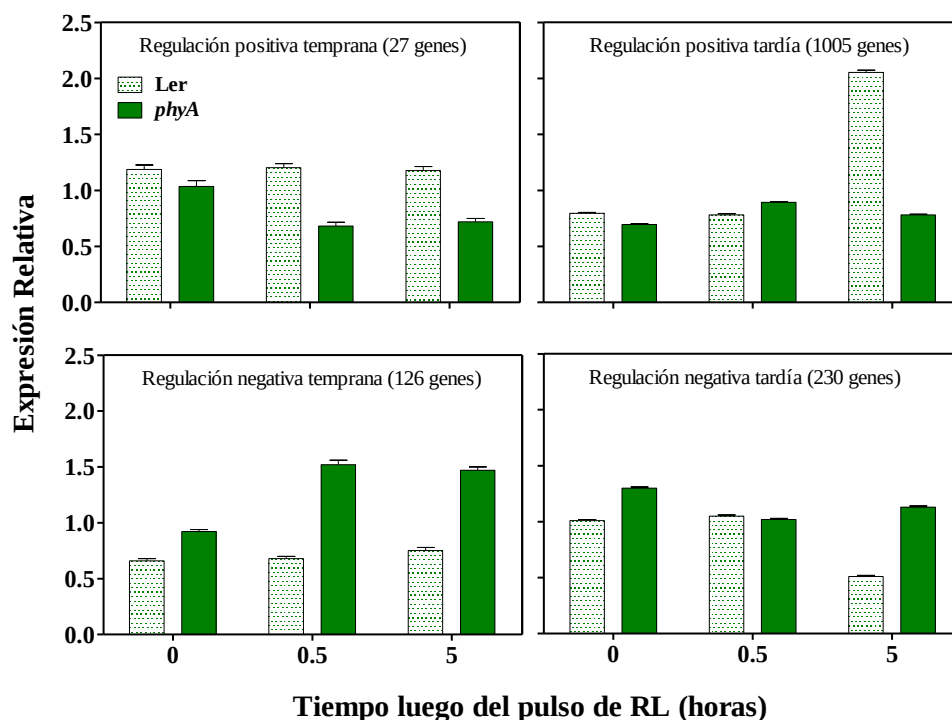


Fig. 3.1.1.3. Clasificación temporal de 1388 genes dependientes de phyA cuya expresión se vio afectada significativamente en análisis ANOVA ($p < 0.01$). Los cuatro agrupamientos se definieron como regulados positiva o negativamente cuya expresión se vio afectada de forma temprana o tardía luego de un pulso de RL (0.5 y 5 respectivamente).

153 genes mostraron diferencias significativas en sus niveles de expresión de forma temprana siendo en su mayoría (82%) regulados negativamente por el pulso de RL. Por otro lado, 1235 genes dependientes del phyA fueron regulados tardía y positivamente (81%) por el pulso de luz aplicado.

Mediante análisis de funcionalidad (EasyGO) fue posible establecer que dentro de los genes regulados negativamente se encuentran sobre representados genes

vinculados a la respuesta a estrés, regulación transcripcional y transduccional. Por otro lado, dentro de los grupos formados por genes regulados positivamente se encontraron algunos vinculados a metabolismo de ADN y ARN, biogénesis y elongación celular (Fig. 3.1.1.4).

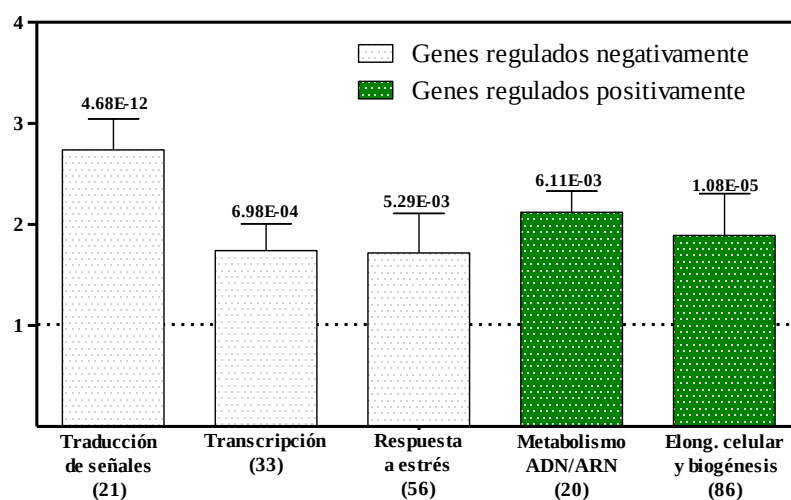


Fig. 3.1.1.4. Asignación de ontología génica para genes dependientes de phyA. Se graficaron las categorías funcionales de procesos biológicos sobre representados para los grupos de genes regulados positiva y negativamente con una tasa mayor a 1.5. Sobre cada categoría se adjunta el valor p.

3.1.2. PhyA como regulador transcripcional.

En lo que respecta a la función molecular, se evaluó si la lista de los genes modulados por el phyA se encontraba enriquecida por factores de transcripción. Se encontraron 101 genes (7.3% del transcriptoma dependiente de phyA) que codifican para este tipo de factores. Dicha proporción es mayor, aunque no de forma significativa, a la establecida para el genoma entero de *Arabidopsis thaliana* (Factor de representación 1.1; $p < 0.142$). De todas formas, un análisis exhaustivo demostró que el grupo de genes regulados de forma tardía se encuentra

enriquecido significativamente por factores de transcripción (FR: 1.9; $p < 5.462 \times 10^{-4}$)

Los factores sobre representados pertenecen a familias tales como CH3, ATHB, bHLH y GRAS entre otras. Específicamente se han encontrado genes vinculados a las respuestas a la luz como *PIL2*, *HFR1* y *HAT4*; dentro de los asociados a la señalización de ABA: *FUS3*, *ABI1* y *ABI4*; a señalización de brasinosteroides: *BEH1* y a señalización de citoquininas: *CRF1*, *CRF2* y *CRF3* y GAs *RGL1*, *RGL3*, *SCL 3*, *SCL4* y *SCL8*. (Tabla 3.1.2.1).

Interesante resulta el hecho que la lista de genes regulados negativamente por el *phyA* se encuentra enriquecida con los que tienen secuencias promotoras vinculadas a ABA (siete secuencias caracterizadas) y a la luz (una secuencia puntual). Estos resultados son coherentes con la idea que sostiene que *phyA* regula la expresión de factores de transcripción que, a su vez, modulan la expresión de otros genes ubicados en las porciones jerárquicas de las cadenas de señalización de respuesta a luz y hormonas durante la imbibición de semillas.

Hormona	Clase	AGI	Nombre	Ler/ <i>phyA</i>	Col/ <i>pil5</i>
ABA	Metabolismo	At1g30100	NCED5	2,82	Ausente
		At1g54100	ALDH7B4	-1,86	1,76
		At2g29090	CYP707A2	4,55	-2,2
		At3g51810	AT3/AtEM1	-3,25	3,54
		At5g45340	CYP707A3	-2,3	Ausente
	Señalización	At2g40220	ABI4	6,42	-3,1
		At3g05880	RCI2A	-3,27	Ausente
		At3g26790	FUS3	-3,67	Ausente
		At3g51920	ATCML9	-4,6	2,41
		At3g63210	MARD1	2,33	Ausente
		At4g01026	PYL7	-4	Ausente
		At4g26080	ABI1	1,98	-1,51
		At1g59870	ABCG36	-3,55	Ausente
Auxina	Metabolismo	At2g20610	SUR1	3,11	-2,64
		At3g44320	N IT3	-1,67	2,25
		At4g39950	CYP79B2	-2,63	Ausente
	Señalización	At1g05180	AXR1	1,5	Ausente
		At1g54990	RGR1/AXR4	1,77	Ausente
		At1g54990	AXR4	1,77	Ausente
		At3g07390	AIR12	5,66	Ausente
		At3g61830	ARF18	1,6	1,64
		At4g31500	RED1	1,97	Ausente
		At4g31500	CYP83B1	1,97	Ausente
		At5g54510	DFL1/GH3.6	4,21	-3,41
		At5g60890	AtMYB34	19,02	Ausente
	Transporte	At1g23080	PIN7	8,17	Ausente
		At1g73590	PIN1	4,49	-3,06
		At5g57090	PIN2	1,99	-3,07
BR	Metabolismo	At3g50660	CYP90B1	1,71	-3,32
	Señalización	At3g50750	BEH1	17,41	-2,83
Citoquinina	Metabolismo	At1g75450	CKX5/CKX6	4,38	Ausente
	Señalización	At4g11140	CRF1	4,93	-2,37
		At4g23750	CRF2	6,57	-3,18
		At5g53290	CRF3	5,25	-4,49
Etileno	Señalización	At1g17870	EGYP3	3,28	-1,61
		At5g61600	ERF104	-2,6	1,81
GA	Metabolismo	At5g07200	20OX3	-5,88	3,69
	Señalización	At1g03790	SOM	-1,98	2,93
		At1g07530	SCL14	-2,08	1,91
		At1g66350	RGL1	3,53	-2,84

Hormona	Clase	AGI	Nombre	Ler/phyA	Col/pil5
GA	Señalización	At1g74670	GASA6	11,92	Ausente
		At2g04240	XERICO	-8,4	5,37
		At3g05120	GID1A	-2,84	3,45
		At4g11140	CRF1	4,93	-2,37
		At4g23750	CRF2	6,57	-3,18
		At5g07200	GA20OX3	-5,88	3,69
		At5g14750	MYB66	5,42	Ausente
		At5g15230	GASA4	-7	Ausente
		At5g17490	RGL3	2,37	Ausente
		At5g52510	SCL8	2,34	Ausente
JA	Señalización	At3g17860	JAZ3	1,9	Ausente
		At5g20900	JAZ12	-2,92	2,03
		At5g46760	MYC3	-4,09	1,82
Luz	Señalización	At1g02340	HFR1	1,89	Ausente
		At1g09570	PHYA	1,54	2,2
		At3g62090	PIL2/PIF6	-3,47	34,53
		At4g16780	ATHB2/HAT4	-3,37	13,91

Tabla 3.1.2.1. Lista de transcriptos dependientes de phyA y PIL5 vinculados a metabolismo y señalización de hormonas.

Los valores expuestos corresponden a los cocientes Ler/phyA y Col/PIL5. Los genes dependientes de PIL5 fueron extraídos de Oh et al. (2009). Para el caso de phyA, valores positivos y negativos indican el sentido de la regulación. Para PIL5 corresponde el inverso.

3.1.3. Vías hormonales vinculadas a la acción de phyA.

3.1.3.1. Genes de señalización y metabolismo de las hormonas vinculados a la germinación mediada por el phyA.

A partir de los datos obtenidos, se ha establecido que la germinación mediada por phyA se encuentra vinculada con genes que regulan positivamente el metabolismo, señalización y transporte de Auxinas (Tabla 3.1.2.1) Transcurridas 5 h del pulso de RL, phyA regula positivamente la expresión de dos proteínas de resistencia (*AXR1* y *AXR4*), un factor de transcripción (*ATMYB34*), y tres proteínas de transporte asociados a dicha hormona (*PIN1*, *PIN2* and *PIN7*). A excepción de dos genes puntuales, *CYP79B2* (asociado a las vías del triptófano) y *NIT3* (cataliza la hidrólisis de indol-3-acetonitrilo IAN, a indol-3-acetato IAA), los genes vinculados a auxinas muestran un incremento en sus niveles de expresión sugiriendo que la promoción de la germinación mediada por luz involucra elementos propios de la señalización de dicha hormona.

Para el caso de genes vinculados a GA, *XERICO*, *SOMNUS*, un receptor de GA (*GID1A*), genes del tipo SCARECROW (*SCL14* and *SCL3*), un gen de respuesta a GA (*GASA4*) y un gen de metabolismo (*GA20ox3*) se ven afectados negativamente por la acción de phyA. Por el contrario, genes de señalización como *SCL8* y *GASA6*, se encuentran regulados positivamente (Tabla I). Además, la regulación positiva de dos de las cinco DELLAs (*RGL1* y *RGL3*) fue inesperada. Esto sugiere que la promoción de la germinación por acción de un pulso de RL es independiente a la regulación de la transcripción de algunas DELLAs.

La regulación de genes asociados a ABA mediante un pulso de RL indica que el phyA en su forma de Pfr bloquea la expresión de genes de señalización y metabolismo de ABA.

En lo que concierne al ABA, el fitocromo A modula los niveles de expresión de las vías de síntesis y metabolismo tanto positiva como negativamente. Por un lado, factores de transcripción (*FUS3*), receptores de ABA (*PYL7*), RARE-COLD INDUCIBLE 2A (*RCI2A*), y genes de las vías catabólicas (*CYP707A3*), son regulados negativamente por phyA. Mientras que, factores de transcripción como *ABI4*, genes de las vías catabólicas (*CYP707A2*) y anabólicas (*NCED5*), son regulados positivamente por el phyA (Tabla 3.1.2.1).

Se ha observado que brasinosteroides y etileno promueven la germinación de semillas (Kucera et al., 2005). Genes vinculados a ambas hormonas modifican significativamente sus niveles de expresión por acción del phyA. Por ejemplo, *BEH1* es regulado positivamente por phyA induciendo la expresión de genes de señalización y metabolismo de BR. *BEH1* es un factor de transcripción homólogo a *BES1*. Este último se ha caracterizado por su capacidad de reconocer y unirse a sitios promotores de genes vinculados a las vías de BR (Yin et al., 2005).

Con respecto a las vías vinculadas a etileno, el gen que codifica para el factor de transcripción *ERF104*, se encuentra regulado negativamente por acción del phyA mientras que *EGYP3* incrementa sus niveles de expresión en presencia de dicho fitocromo.

Se ha establecido que el ácido jasmónico (JA) inhibe la germinación (Kucera et al., 2005). En concordancia con ello, se han identificado dos genes regulados negativamente por acción del phyA (*JAZ12* y *MYC3*). Estos últimos se han

caracterizado como factores de transcripción que actúan en conjunto con *MYC2* y *MYC4* para activar la respuesta a JA (Fernandez-Calvo et al., 2011). Además, se ha observado que *JAZ3* se encuentra regulado positivamente luego del pulso de RL. Esto es coherente con la actividad represora sobre la señalización de JA caracterizada para *JAZ3* (Brose et al., 2009). Finalmente, genes que codifican para factores que regulan las vías de citoquininas, *CRF1*, *CRF2* y *CRF3* junto con un elemento propio de las rutas catabólicas de dicha hormona, *CKX5* se ven afectados positivamente por acción del phyA (Tabla 3.1.2.1).

3.1.3.2. Dentro de los genes sensibles a la actividad de phyA se encuentran sobre representados elementos pertenecientes a las vías de GA y Auxinas.

Con el propósito de evaluar el grado en que la actividad del phyA afecta vías hormonales durante la inducción de la germinación por RL, se realizó un análisis de sobre representación utilizando base de datos vinculadas a dormición y germinación publicadas con anterioridad (Ogawa et al., 2003 y Carrera et al., 2007).

En primer lugar se clasificó funcionalmente la base de datos de Carrera et al, mediante la herramienta ofrecida por TAGGIT. Luego, se enfrentó la lista de 1388 genes sensibles a la actividad del phyA con los datos vinculados a vías hormonales de TAGGIT. A partir de ello, se estableció que solamente genes asociados a Auxinas se encuentran sobre representados y que todos ellos corresponden al grupo de elementos regulados tardía y positivamente por el phyA (RF: 2.9, $p < 0.007$).

Con el propósito de conocer el modo en que las vías de GA se ven afectadas durante la inducción de la germinación mediada por el phyA, se compararon los datos de transcripción vinculados a la germinación inducida por RL y los publicados por Ogawa donde se analiza la actividad de GAs durante dicho proceso. Se observó una sobre representación de genes asociados a la actividad de GAs durante la germinación inducida por acción del phyA (RF: 2.2, $p < 3.75 \times 10^{-12}$). Este análisis indica que el transcriptoma vinculado a la acción de phyA se encuentra enriquecido por genes asociados a las vías hormonales de GAs y Auxinas sugiriendo que ambas hormonas estarían involucradas directa o indirectamente a la señalización del phyA.

3.1.4. Las vías de señalización activadas durante la germinación inducida por RL mediada por el phyA son parcialmente compartidas por las vías de acción de PIL5.

Se enfrentó el transcriptoma obtenido en respuesta a la inducción de la germinación por RL con una base de datos vinculada a la actividad de PIL5 publicada en 2009 por Oh et al. Los genes cuya expresión resultaron dependientes de phyA fueron comparados con 2555 genes cuya expresión se veía afectada por la actividad de PIL5. Se encontraron 618 genes comunes a ambas vías de acción y 770 genes específicos a la señalización medida por phyA (Fig. 3.1.4.1).

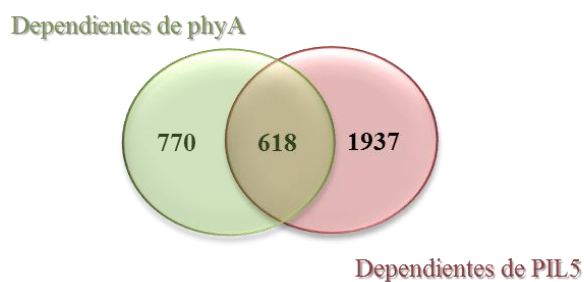
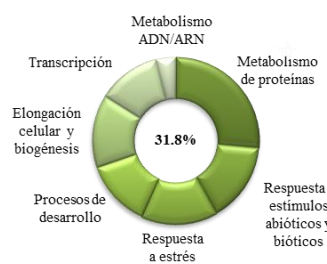


Fig. 3.1.4.1. Diagrama de Venn. Genes dependientes de phyA y PIL5.

Con el objeto de clasificar la funcionalidad de los genes agrupados según su especificidad, se realizó un análisis de ontología génica (GO) donde se evaluó la existencia de genes vinculados a procesos biológicos sobre representados en cada transcriptoma (Fig. 3.1.4.2). Algunas categorías como metabolismo de proteínas, procesos de desarrollo y respuesta a estímulos bióticos y abióticos se encontraron sobre representados en ambos transcriptomas. Por su parte, el metabolismo de material genético, organización celular, biogénesis solo se vieron sobre representadas en el transcriptoma vinculado a phyA. Finalmente, dentro de las categorías exclusivas a las vías vinculadas a PIL5 se encontraron traducción de señales y transporte.

Procesos biológicos asociados a phyA



Procesos biológicos asociados a PIL5

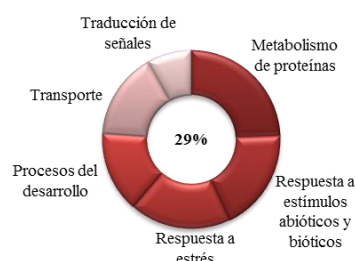


Fig. 3.1.4.2. Proporción de genes sobre representados agrupados según su funcionalidad biológica vinculados a phyA y PIL5. El número dentro de cada anillo representa el porcentaje de genes sobre representados de cada grupo.

Por otro lado, se estableció una positiva y, a su vez, débil correlación entre ambos transcriptomas (R^2 : 0.43, Fig. 3.1.4.3). Este resultado puede explicarse por grandes diferencias en los niveles de expresión de algunos genes puntuales: *EXP1*, *EXP2*, *EXP10* y *HAT4*. La remoción de dichos genes del análisis mejora sustancialmente la relación entre transcriptomas (R^2 : 0.65).

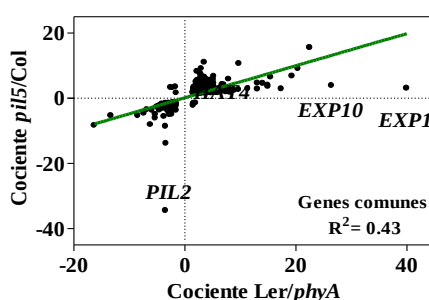


Fig. 3.1.4.3. Análisis de correlación entre genes comunes utilizando los cocientes Ler/phyA y PIL5/Col.

Estos resultados indican la existencia de una serie de transcriptos compartidos por la promoción de la germinación mediada por el phyA y la inhibición de dicho proceso a través de la actividad de PIL5. Un grupo de genes que codifica para enzimas vinculadas a la actividad en la pared celular se encuentra regulado positivamente por el phyA y negativamente por PIL5. Confirmando que el fotocontrol de la germinación, inducida tanto por R como por RL, involucra el control de la actividad de enzimas de pared (Fig. 3.1.4.4). *EXP2* resulta la excepción a dicha observación: su expresión resultó ser dependiente únicamente de la actividad de phyA. Inesperadamente, se identificaron siete genes regulados de la misma manera tanto por phyA como por PIL5. Dentro de ellos se encontraron: *PHYA*, *ARF18*, *SAG29* y una glicosil hidrolasa con actividad a-

manosidasa vinculada en la actividad metabólica que desarrolla durante la elongación de estructuras del embrión.

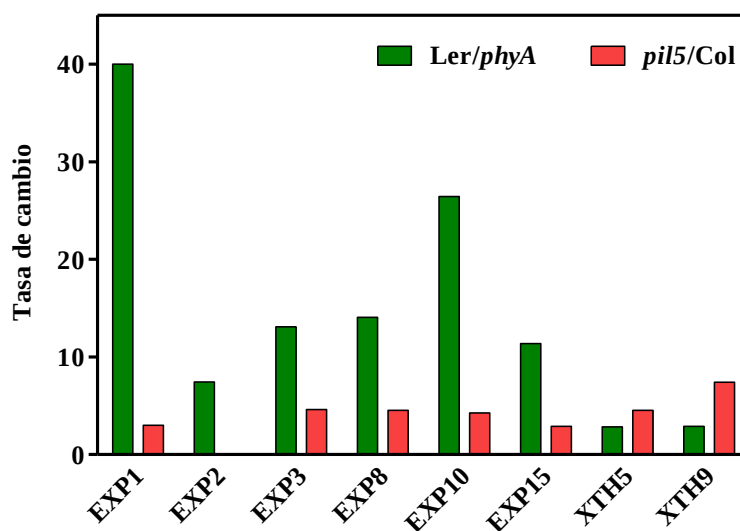


Fig. 3.1.4.4. Tasa de cambio de genes vinculados a pared promovidos por phyA o PIL5.

3.1.5. La evaluación de la germinación de semillas mutantes confirma la germinación dependiente del phyA.

Se ha confirmado la relevancia de genes clasificados como “phyA dependientes” mediante la utilización de mutantes nulas específicas en ensayos de germinación inducida por acción de luz RL (Fig. 3.1.5). En semillas salvaje, se observó un porcentaje de germinación de alrededor de 20% en oscuridad y superior a 75% en RL, indicando que el 60% de la población de semillas germinó mediante la acción de phyA. A su vez, otra porción de la población germinó a través de las vías reversibles de respuesta medidas por el phyB.

Semillas mutantes en MYB66, PIN7 y un elemento del tipo SAUR (At4g34750) no germinaron en respuesta a un pulso de RL pero si lo hicieron ante

la presencia de luz R. Estos resultados confirman la función positiva de dichas proteínas en la regulación de la germinación mediada por phyA. Si bien semillas de *pil2* y *gasa4* germinaron en respuesta al pulso de RL, sus niveles fueron significativamente menores a los obtenidos por semillas salvajes. Estos resultados resultan aparentemente contradictorios con los datos obtenidos durante el análisis de transcriptoma. Una posible explicación a dicha discrepancia radicaría en la diferencia existente entre los fondos genéticos utilizados en sendas experimentaciones (*Ler* para el caso del transcriptoma y *Col* para el análisis de mutantes). Además, alguna de las diferencias podría explicarse por mecanismos post transcripcionales documentados con anterioridad para el caso de *pil2*, por ejemplo (Penfield et al., 2010).

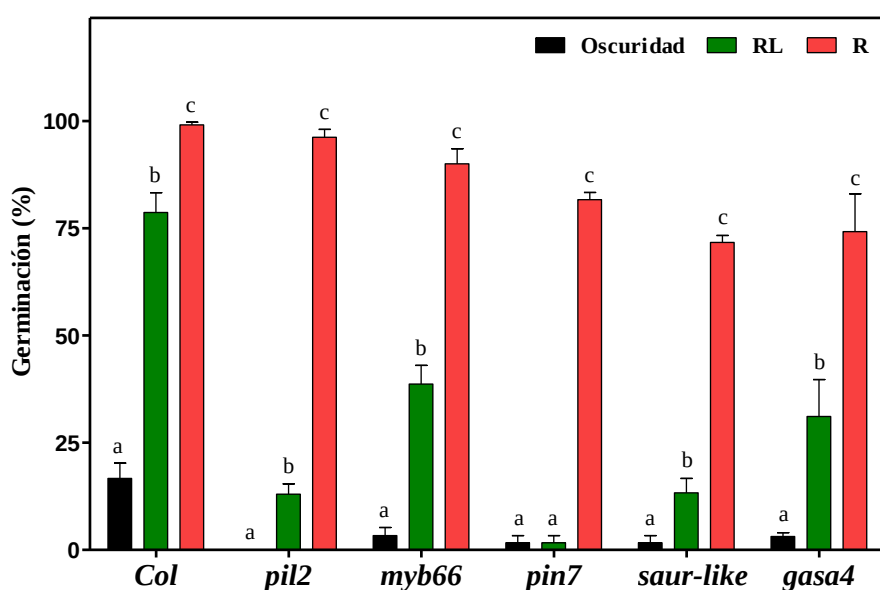


Fig. 3.1.5.1. Germinación inducida por luz en semillas mutantes mediante T-DNA. *Col* y semillas mutantes para algunos genes phyA dependientes fueron incubadas a 5° por 24 h y luego transferidas a 25° por otras 24 h y finalmente irradiadas con luz RL o R o mantenidas en oscuridad a modo de control. Se evaluó germinación 72 h luego del pulso de luz. Letras diferentes significan diferencias significativas entre tratamientos lumínicos dentro de cada genotipo ($p < 0.05$).

3.1.6. El *phyA* regula negativamente la expresión de *DELLAs*.

Si bien las *DELLAs* más representativas (*GAI*, *RGA* y *RGL2*) no presentaron diferencias significativas en el análisis de microarreglos, reportes previos acreditan la idea de las *DELLAs* como reguladores centrales de la germinación (Cao et al., 2006; Oh et al., 2006; Piskurewicz et al., 2007). Las *DELLAs* son componentes tempranos de la señalización de GA. Cuando los niveles de GA son bajos, las *DELLAs* bloquean la transcripción de genes regulados mediante GA a través de la interacción directa con sus promotores (Cao et al., 2006). *GAI* y *RGA* pueden actuar como integradores de señales lumínicas y GA mediante la acción de *phyB* (Oh et al., 2007). Considerando la importancia de las *DELLAs* en el control de la germinación, se evaluaron sus niveles de expresión mediante la técnica qRT-PCR luego de haber sometido a las semillas a un pulso de RL. En la Fig. 3.1.6.1. se describe el protocolo realizado sobre las muestras en las que se evaluaron los niveles de expresión de las *DELLAs*.

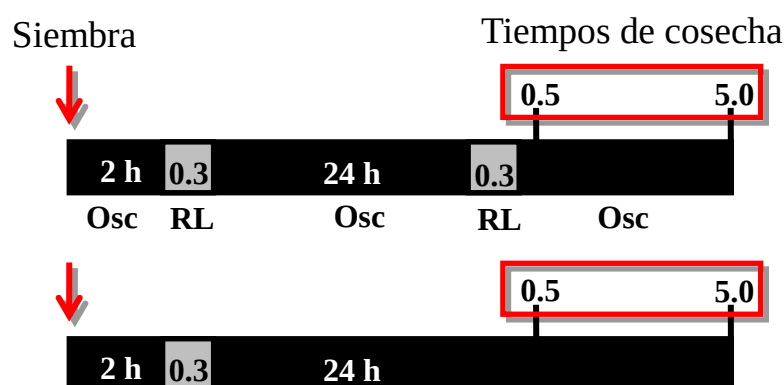


Fig. 3.1.6.1. Protocolo experimental para las extracciones de ARN utilizado en el análisis de q RT- PCR.

Se observó que *GAI*, *RGA* y *RGL2* fueron regulados negativamente por la acción del *phyA* pero en tiempos diferentes (Fig. 3.1.6.2. a y b). *RGL2* fue regulado negativamente de forma temprana (0.5 h luego del tratamiento con RL) y el efecto persistió transcurridas 5 h. Por su parte, *GAI* fue regulado negativamente de forma temprana y *RGA* disminuyó sus niveles de transcripto tardíamente. A partir de estos resultados es posible concluir que *phyA* reduce los niveles de transcriptos de DELLAs a modo de pre requisito para que la germinación sea promovida por el RL.

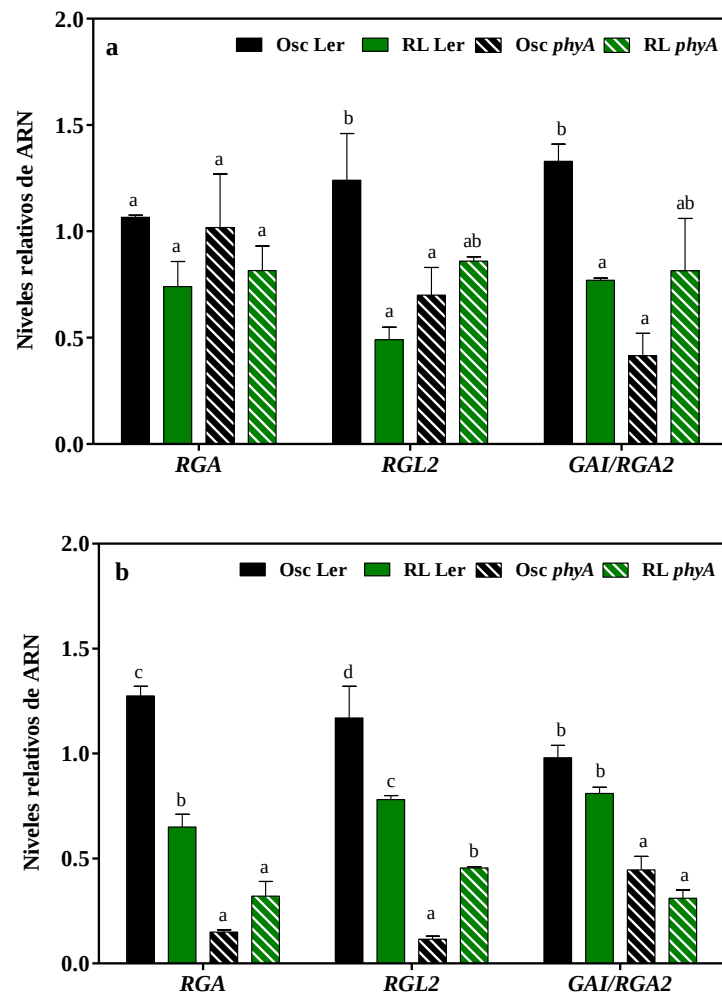


Fig. 3.1.6.2. Niveles relativos de expresión de transcritos DELLAs en respuesta a la luz RL de forma temprana y tardía. Se evaluaron dos genotipos: Ler y *phyA*. Letras distintas significan diferencias significativas entre genotipos dentro de cada transcrito evaluado. Fisher, p : 0.05.

Teniendo presente la relevancia de *RGL2* en las vías de acción de ABI5 durante la germinación (Piskurewicz et al., 2008) se evaluó la importancia de la interacción entre *RGL2* y ABI5 cuando la germinación es mediada por el *phyA*. Para ello se utilizaron construcciones transgénicas de promotores capaces de sobre expresar ABI5 (35S::HA-ABI5) en semillas salvaje y deficientes en *RGL2* (35S::HA-ABI5 en *rgl2*, Fig. 3.1.6.3). Se ha observado que la sobre expresión de ABI5 afecta los

niveles de germinación mediada por phyA solo en el caso en que RGL2 es funcional.

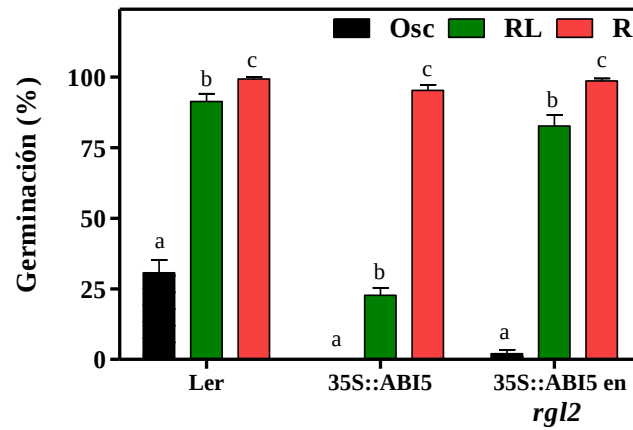


Fig. 3.1.6.3. Germinación de semillas sobre expresantes de ABI5 en presencia y ausencia de RGL2. Las semillas fueron incubadas durante 24 h a 25C previo al pulso de luz. Se evaluaron diferencias entre tratamientos lumínicos dentro de cada genotipo. Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, p: 0.05.

3.1.7. La expresión de genes asociados a ABA, GA y expansinas depende del fondo genético cuando la germinación es inducida por phyA.

Teniendo presente que la variación genética natural afecta el proceso de germinación (Laserna et al., 2008) se estudiaron los efectos del fondo genético en la expresión de genes asociados a las vías de ABA, GA y expansinas en la germinación mediada por el phyA.

Se evaluaron once genes en dos ecotipos de *Arabidopsis thaliana*: *Columbia* y *Landsberg erecta* (Col y Ler respectivamente) y en semillas mutantes *phyA* correspondientes a cada ecotipo. Los niveles de germinación en respuesta al RL de las semillas salvaje rondaron el 50% en ambos casos (Col y Ler), mientras que las mutantes no respondieron a dicho tratamiento lumínico.

Dentro de los genes asociados a la señalización de GA (Fig. 3.1.7.1), *GASA4* y *GASA6* fueron inhibidos por la acción de phyA en semillas Col mientras que solamente *GASA6* fue reprimido en semillas Ler. Con respecto a los genes vinculados al metabolismo, *GA20OX3* se vió inhibido por phyA en Col mientras que *GA3OX1* fue regulado positivamente por dicho fitocromo en ambos ecotipos.

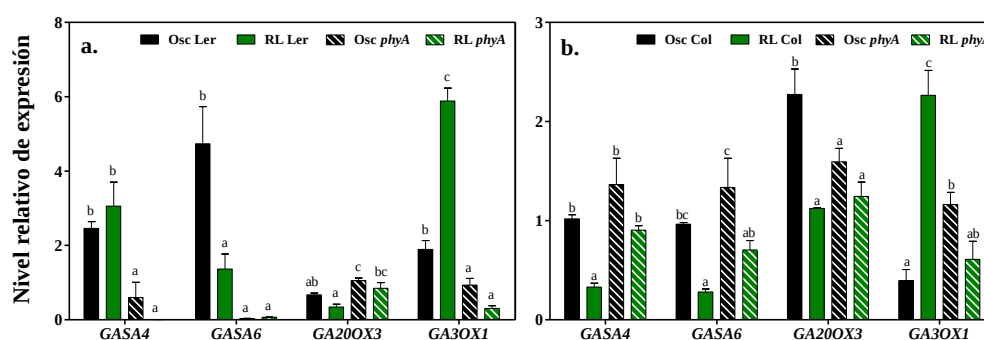


Fig. 3.1.7.1. Variación natural en los niveles de expresión de genes asociados a GA inducidas a germinar por RL. Los niveles de expresión fueron medidos mediante qRT-PCR 5 h luego del pulso de RL en Ler (a) y en Col (b). Los datos fueron normalizados utilizando UBC como gen de referencia. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada gen ($p < 0.05$).

Con respecto a los genes asociados a las vías de ABA (Fig. 3.1.7.2), se evaluó la expresión de *ABI5*, un elemento vinculado a las vías anabólicas (*NCED9*) y otro a las catabólicas (*CYP707A2*). Los niveles de *ABI5* disminuyeron en semillas Ler mientras que los genes metabólicos analizados (*NCED9* y *CYP707A2*) se vieron inhibidos por acción del *phyA* independientemente del fondo genético.

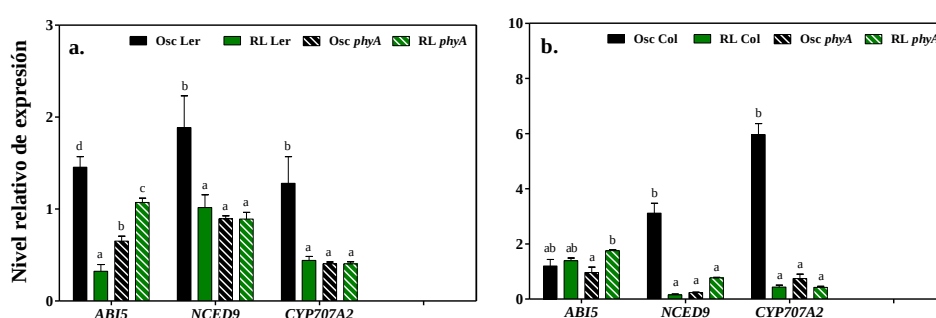


Fig. 3.1.7.2. Variación natural en los niveles de expresión de genes asociados a ABA en semillas inducidas a germinar por RL. Los niveles de expresión fueron medidos mediante qRT-PCR 5 h luego del pulso de RL en Ler (a) y en Col (b). Los datos fueron normalizados utilizando UBC como gen de referencia. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada gen ($p < 0.05$).

Finalmente, se evaluó la expresión de genes vinculados a procesos tardíos asociados con el fenómeno de germinación (Fig. 3.1.7.3). Se analizó el patrón de expresión de expansinas, reguladores centrales de la expansión celular que sucede durante la germinación inducida por luz (Li et al., 2003; Mella et al., 2004) y se observó que el RL induce fuertemente la expresión de *EXP1*, *EXP2* y *EXP10* en ambos fondos genéticos y que la ausencia de *phyA* bloquea la expresión de dichos genes. A su vez, un gen que codifica para una proteína con actividad de glicosyl hidrolasa involucrada en el metabolismo de manosas (at3g26720), mostró un incremento en sus niveles de expresión tanto en semillas *Col* como *Ler*.

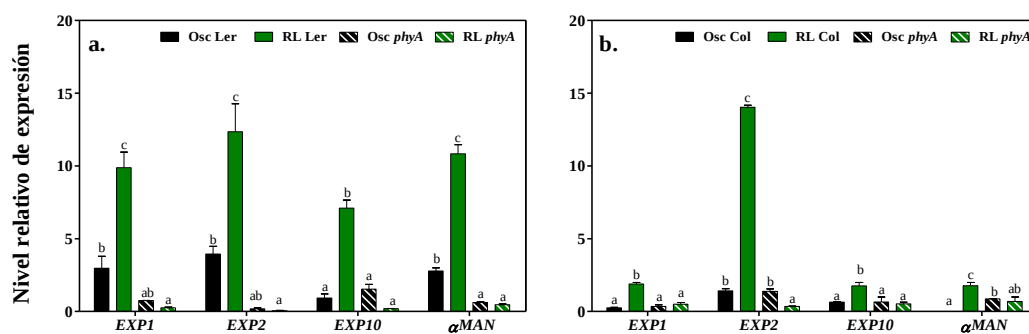


Fig. 3.1.7.3. Variación natural en los niveles de expresión de expansinas en semillas inducidas a germinar mediante un pulso de RL. Los niveles de expresión fueron medidos mediante qRT-PCR 5 h luego del pulso de RL en Ler (a) y en Col (b). Los datos fueron normalizados utilizando UBC como gen de referencia. Letras distintas significan diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada gen ($p < 0.05$).

3.1.8. Discusión.

La luz percibida por el phyA es una de las señales ambientales capaces de inducir la germinación en ambientes naturales luego de haber causado una disminución significativa en los niveles de dormición. Semillas de un gran número de especies germinan en respuesta a la perturbación del suelo ocasionado por el laboreo agrícola que causa la exposición de las mismas por fracciones de segundo a la luz solar (Scopel et al., 1991). El único fotorreceptor involucrado en dicho proceso es el phyA a través de una VLFR (Botto et al., 1996). Este tipo de respuesta fue observado en varias especies, dentro de las cuales se encuentra *A. thaliana*. Esta última manifiesta, a su vez, variaciones genéticas naturales entre poblaciones (Laserna et al., 2008) Se ha sugerido que las respuestas del tipo VLFR, junto con sus componentes asociados, jugarían roles más significativos que los previamente adjudicados permitiendo que las plantas optimicen su crecimiento vegetativo y el momento en que florecen (Kneissl et al., 2009)

Aquí se ha demostrado que la germinación promovida por el phyA a través de una respuesta del tipo VLFR ocasiona cambios en los niveles de expresión del 11% del genoma total de *Arabidopsis thaliana* en semillas *Landsberg erecta* (Fig. 3.1.1.3). El 90% de los genes que modifican su expresión en respuesta a un pulso de luz RL, lo hacen de forma tardía (5 h) e incrementado sus niveles, mientras que el resto modula negativamente su expresión tempranamente (0.5 h). Del mismo modo que para el caso en que la respuesta a la luz es accionada por phyB, la lista de genes dependientes de phyA incluye varios que codifican para proteínas propias a las vías de señalización de hormonas durante la germinación de las semillas. El análisis del transcriptoma asociado a la acción de phyA sugiere que semillas irradiadas con RL incrementan los niveles de phyA-Pfr en el núcleo

interaccionando con factores del tipo PIL/PIF (Leivar & Quail., 2010). Esta interacción promovería la expresión de genes asociados a la señalización hormonal, junto con la regulación indirecta sobre genes metabólicos, permitiendo la promoción de la germinación en forma armónica.

Interesante resulta el hecho de haber observado diferencias en los patrones de expresión de genes asociados a la señalización y metabolismo de GA y ABA al comparar distintos ecotipos durante la germinación de semillas en respuesta a un pulso de RL (Fig. 3.1.7.1 y Fig. 3.1.7.2). A su vez, los niveles de expresión de genes que codifican para elementos asociados a los últimos pasos de la emergencia radicular, como las expansinas, presentaron niveles homogéneos entre los ecotipos analizados (Fig. 3.1.7.3). Estos resultados sugieren que el proceso de transcripción resulta una fuente de variación entre semillas de orígenes diferentes durante la germinación inducida por luz.

Comparando los transcriptomas phyA-dependiente y PIL5-dependiente (Oh et al., 2009), se observó que algunos genes controlados por phyA se ven también influenciados por PIL5 (Fig. 3.1.4.1). Sin embargo, el 55% de los genes regulados por phyA no forman parte de la lista de aquellos modulados por PIL5. Algunas de estas diferencias podrían explicarse por la utilización de distintos genotipos al evaluar los transcriptomas phyA y PIL5 dependientes. Sin embargo, el hecho que mutantes nulas para la función de algunos elementos phyA-dependientes germinen defectuosamente en respuesta a un pulso de RL pero que lo hagan normalmente en presencia de luz R, refuerza la idea de que son independientes a la acción de PIL5 (Fig. 3.1.5.1). La existencia de vías alternativas a la acción de

PIL5 fue sugerida con anterioridad (Oh et al., 2004) y estos datos representan evidencia de que algunos de los genes evaluados formarían parte de dicha ruta.

Elementos asociados a las auxinas se encuentran sobre representados durante la germinación phyA-dependiente. Esto sugiere que las auxinas podrían estar involucradas en la promoción de la germinación mediada por phyA. Varios genes de transporte (*PIN1*, *PIN2* y *PIN7*), señalización (*RED1*, *AXR4*, *AXR1*, *Saur like*, *ARF18* y *GH3.6*) y de metabolismo (*NIT3*, *SUR1* y *CYP79B2*) presentan afectados sus niveles de expresión en respuesta a la presencia de phyA. Si bien la mayoría de ellos son regulados positivamente por dicho fitocromo, *NIT1* y *CYP79B2* disminuyen sus niveles en presencia de phyA (Tabla 3.1.2.1). Ogawa et al. (2003) encontró que varios genes de metabolismo y transporte de auxinas, incluido *CYP79B2*, son regulados positivamente de forma temprana luego de la imbibición de las semillas ante la presencia de GA. A su vez, el grupo de Lopez-Molina demostró que la presencia de ABA potencia la señalización de auxinas mediante la inhibición del crecimiento del eje embrionario luego de la emergencia radicular (Belin et al., 2009). Dicho proceso requiere de la acción de transportadores de entrada de las auxinas, *AUX1*, y de transportadores de salida como *PIN2*. Estas evidencias sugieren que las interacciones hormonales, entre otras, de las auxinas y GA, pueden ser relevantes en la regulación del proceso germinativo mediado por el phyA. Es necesario diseñar nuevos ensayos para poner a prueba hipótesis específicas asociadas con las interacciones hormonales en la germinación promovida por phyA.

Las DELLAs son un grupo importante de factores de transcripción vinculados a GA involucrados en el control de la germinación (Cao et al., 2005, 2006). En

semillas que promueven la germinación con una respuesta R/RL reversible, el pulso de RL inhibe la germinación. En estas condiciones los bajos niveles de GA permiten la acumulación de GAI, RGA y RGL2 que, bloquean la ruptura de la testa y promueven la acumulación de ABA (Piskurewicz et al., 2009). Mediante la utilización de semillas inducidas a germinar en respuesta a un pulso de RL, se ha demostrado que las DELLAs se encuentran reguladas negativamente por acción de phyA-Pfr (Fig. 3.1.6.2). A su vez, la sobre expresión de ABI5 inhibe la promoción de la germinación inducida por RL cuando se encuentra presente RGL2 (Fig. 3.1.6.3). Piskurewicz et al. (2008) ha demostrado que la inhibición de la germinación mediada por ABI5 requiere de la actividad de *RGL2*, quien es estabilizada por ABA mediante las vías de señalización que involucran a XERICO. Aquí se sugiere que el phyA-Pfr establecido por un pulso de RL inhibe la expresión de *RGL2* y reduce, a su vez, la represión que impone *ABI5* sobre la germinación.

phyA regula negativamente la expresión de *PIL2*. En concordancia con los resultados aquí expuestos, Oh et al. (2009) ha demostrado que *PIL2* es regulado positivamente durante la germinación dependiente de *PIL5*. *PIL2* se expresa 34 veces más en semillas Col que en *pil5* 12 h luego de haber irradiado semillas con luz R. La secuencia promotora de *PIL2* es blanco de acción de *PIL5*. En concordancia con estos resultados, se han documentado bajos niveles de germinación en semillas sometidas a regímenes de temperatura de entre 17° y 22° aunque dicha respuesta se pierde cuando la amplitud térmica se incrementa (Penfield et al., 2010). Se ha sugerido la existencia de splicing alternativo durante la actividad de *PIL2*, siendo la forma β de la proteína, y no la α , la responsable de

inducir la germinación cuando la dormición es débil (Penfield et al., 2010). Se precisa de mayor información acerca de los mecanismos de splicing alternativo involucrados en la actividad de PIL2 para conseguir vincular los datos de expresión con los resultados fisiológicos de las semillas mutantes.

Los fitocromos inducen distintos modos de acción (Casal et al., 1998b; Bae y Choi, 2008). Cuando las semillas se encuentran lo suficientemente sensibles a la luz, se requiere de una cantidad de fotones muy baja para inducir un respuesta del tipo VLFR a través de la acción de phyA (Botto et al., 1996), mientras que en semillas menos sensibles a la luz la cantidad de fotones requeridos incrementa y el tipo de respuesta disparado se conoce como LFR a cargo del phyB y seguido por phyD y phyE (Botto et al., 1995; Henning et al., 2002). Por otro lado, en semillas de varias especies pero no en *A. thaliana*, altas irradiancias disparan un tipo de respuesta conocido como HIR, la cual se encuentra a cargo del phyA (Shichijo et al., 2001; Auge et al., 2009). En semillas de *Datura ferox*, la HIR inhibe la expresión de *DfGA3OX*, un gen promovido por la respuesta del tipo VLFR (Arana et al., 2007). En semillas de tomate, otros genes asociados a las vías de acción de HIR fueron descritos. Auge et al. (2009) ha establecido que ELIP3 y GIGANTEA incrementan sus niveles de expresión cuando la germinación se ve inhibida por acción del RL continuo. El antagonismo observado entre los modos de acción VLFR y HIR indican que probablemente la asociación entre phyA-Pfr y PIL5 sería parte fundamental de los mecanismos que involucran a phyA en semillas.

Son necesarias nuevas investigaciones, no solo en *Arabidopsis thaliana* sino en otras especies, para comprender de forma acabada el modo en que phyA modula

cascadas de señalización y la manera en que interactúa con otros fitocromos ajustando la germinación a específicas condiciones ambientales.

SECCIÓN 3.2:
ENTRADA EN DORMICIÓN SECUNDARIA EN
SEMILLAS A. *THALIANA*.

3.2.1. Entrada en dormición secundaria por incubación en oscuridad a temperatura constante.

Las semillas enterradas en el suelo se encuentran expuestas a factores ambientales como la luz, temperatura y humedad capaces de modular el desempeño fisiológico de las mismas. Dichas señales afectan fuertemente los procesos de dormición y germinación. La dormición primaria se ha estudiado en profundidad y se han demostrado mecanismos y componentes moleculares que están fuertemente ligados a la regulación de dicho proceso (Bentsink & Koornneef, 2008). Por el contrario, poco se conoce acerca de los mecanismos que controlan la entrada en dormición secundaria. En particular desconocemos si las vías de acción hormonal y las vías de señalización molecular son comunes o distintas a las que regulan la dormición primaria en semillas de *Arabidopsis thaliana* (Hilhorst et al., 2010). Algunas de las cuestiones a dilucidar son los mecanismos que modulan la entrada en dormición secundaria y de qué forma las hormonas vinculadas a la dormición afectan la entrada en dormición secundaria.

En este capítulo, se evaluó el comportamiento de las semillas de *A. thaliana* cuando son embebidas en oscuridad a temperatura constante. Inicialmente, se evaluó la germinación de las semillas de la accesión *Columbia* en respuesta a la incubación en oscuridad a 25°C. Una vez sembradas, todas las semillas fueron expuestas a un pulso de 20 minutos de RL con el propósito de establecer niveles de Pfr mínimos e idénticos entre las semillas de los distintos genotipos. Luego del período de imbibición se expuso a las semillas a distintas calidades de luz: Rojo (R) ó Rojo lejano (RL) por un período de 20 min. Finalmente, se evaluaron los

porcentajes de germinación 72 h luego de finalizados los tratamientos lumínicos (Fig. 3.2.1.1).

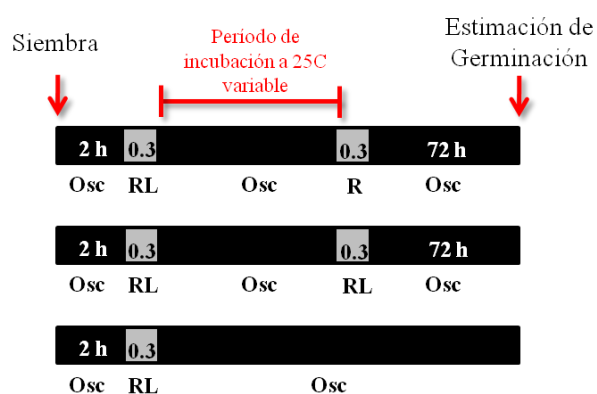


Fig. 3.2.1.1. Protocolo experimental utilizado para evaluar germinación en función de los días de incubación en oscuridad a 25°C. El período de incubación variable se extiende desde 1 d hasta 10 d.

La Fig. 3.2.1.2 presenta los porcentajes de germinación en función de los días de incubación a 25°C de las semillas en oscuridad. Los valores de porcentaje de germinación de cada tratamiento lumínico fueron transformados para la evaluación estadística. La comparación de medias se realizó mediante análisis de Fisher (p : 0.05). Se evaluaron diferencias entre días de incubación dentro de cada tratamiento lumínico. Distintas letras significan diferencias significativas.

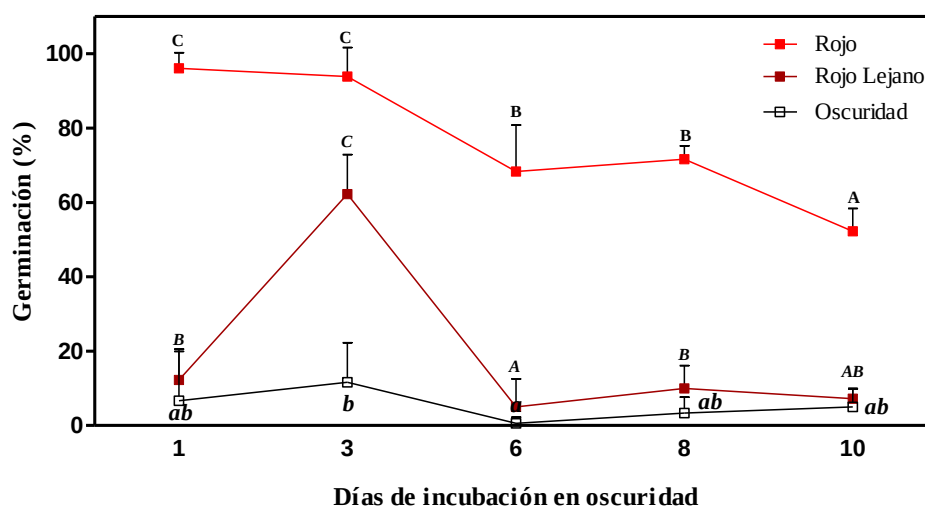


Fig. 3.2.1.2. Inducción de la germinación mediada por luz luego de la incubación de semillas Col en oscuridad a temperatura constante. Letras distintas representan diferencias significativas. p : 0.05. Las comparaciones fueron realizadas dentro de cada tratamiento lumínico.

Se observaron diferencias en los perfiles de respuesta según el tipo de luz utilizado para inducir la germinación: los porcentajes correspondientes a la inducción por luz RL fueron casi nulos excepto al tercer día de incubación en oscuridad a 25C cuando las semillas germinaron un 60%. Por otro lado, la respuesta a la luz R presentó índices máximos de germinación cercanos al 100% hasta el tercer día de incubación en oscuridad y luego los valores de germinación decrecieron paulatina y sostenidamente hasta 60% a los 10 días de incubación. Las semillas incubadas en oscuridad no germinaron. Los resultados de este experimento indican que la incubación prolongada en oscuridad a temperatura constante de 25C induce la dormición secundaria de las semillas de *Arabidopsis thaliana* cuando se hizo el diagnóstico con un pulso de luz R. La sensibilidad al pulso de luz RL solo fue significativa con 3 días de incubación de las semillas. Es probable que la incubación en oscuridad a 25C haya inducido la síntesis de de

phyA en una ventana reducida y luego la proteína se degrade en periodos más prolongados (Shinomura et al., 1997).

3.2.2. Acción de las Giberelinas en la entrada en dormición secundaria.

Las Giberelinas (GA) tienen un rol central en la regulación de la germinación (Sun et al., 2004). Para entender la función de las GA en el control de la dormición secundaria, se evaluó la respuesta germinativa de las semillas al agregado de GA durante la entrada en dormición secundaria en oscuridad. Se realizaron curvas de respuesta a GA₄ con semillas incubadas en agua o a dosis crecientes de GA (Fig. 3.2.2.1). Los niveles de germinación de las semillas se evaluaron en dos condiciones de incubación en oscuridad: 1 y 4 días a 25C. Al finalizar el tratamiento de incubación en oscuridad las semillas recibieron un pulso de luz R. Los tiempos de incubación seleccionados corresponden a semillas despiertas (1 día) y semillas con dormición secundaria (4 días), siendo la germinación de 90% y 10% respectivamente.

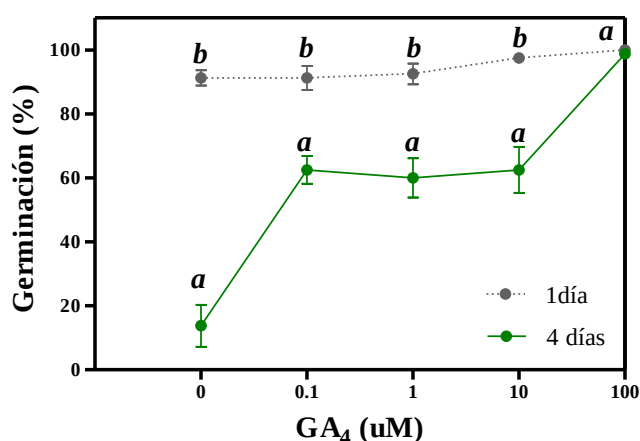


Fig. 3.2.2.1. Respuesta a Giberelinas de semillas Columbia en dos tiempos diferentes de incubación en oscuridad: 1 y 4 días. Las comparaciones se realizaron dentro de cada dosis evaluada. Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, $p : 0.05$.

En semillas despiertas, los niveles de germinación fueron cercanos al 100% independiente de la dosis de GA exógena. Para el caso de las semillas que entraron en dormición secundaria, se observó que los niveles de germinación fueron en aumento hasta que la dosis exógena de GA₄ fue de 0.1 uM donde se observó un 60% de semillas germinadas. Entre 0.1 y 10 uM de GA₄ las semillas mostraron un plateau de respuesta para luego alcanzar el 100% de germinación al incubar las semillas en una solución GA₄ 100 uM. Estos resultados sugieren que los niveles GA₄ en las semillas pueden estar afectando la entrada en dormición secundaria de las semillas.

Con el propósito de determinar si la sensibilidad a GA se vería afectada durante la entrada en dormición secundaria, se realizaron ensayos de respuesta a distintas dosis de GA₄ en presencia de Paclobutrazol (P), un inhibidor de la biosíntesis de GA, con el propósito de evitar posibles variaciones asociadas a la presencia de GA sintetizada en las semillas (Fig. 3.2.2.1). Previamente se realizó

una curva de respuesta a Paclobutrazol para identificar la concentración mínima necesaria para inhibir la acción de las GA sintetizadas de modo endógeno. La dosis de Paclobutrazol necesaria fue de 50uM (datos no mostrados). En semillas despiertas, el suplemento de GA₄ fue capaz de revertir el efecto de Paclobutrazol de forma paulatina a medida que las dosis de GA₄ incrementaron entre 0 y 1 uM (Fig. 3.2.2.2). Las semillas dormidas necesitaron dosis mayores a 1 uM de GA₄ para la salida de la dormición secundaria. Estos resultados demuestran que la entrada en dormición secundaria de las semillas requiere de una disminución en la sensibilidad a las GA.

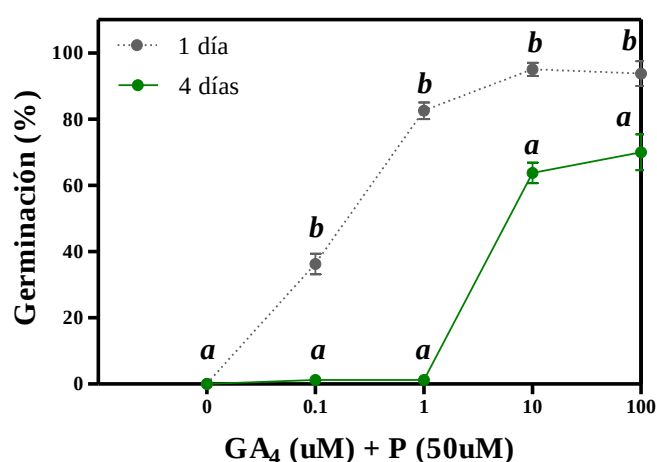


Fig. 3.2.2.2. Evaluación de la sensibilidad a GAs durante la entrada en dormición secundaria. Las semillas fueron incubadas en oscuridad a temperatura cte durante 1 y 4 días. Se analizaron diferencias (Fisher) dentro de cada dosis, letras distintas significan diferencias superiores al 5%.

3.2.3. Acción del Ácido Abscísico en la entrada en dormición secundaria.

Teniendo presente que el Ácido Abscísico (ABA) impone dormición en las semillas (Finkelstein *et al.*, 2002), se evaluó el efecto de concentraciones

crecientes de ABA durante la entrada en dormición secundaria. Se evaluó la germinación de semillas salvaje (*Col*) en presencia de concentraciones crecientes de ABA (Fig. 3.2.3.1).

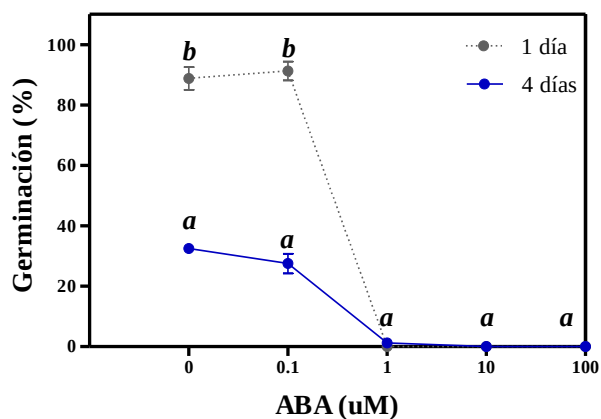


Fig. 3.2.3.1. Respuesta a ácido abscísico de semillas *Col* en dos tiempos diferentes de incubación en oscuridad: 1 y 4 días. Las comparaciones se realizaron dentro de cada dosis evaluada. Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, p : 0.05.

Se observó que el agregado de ABA en el medio de incubación en concentraciones del orden de 0.1uM no modificó los niveles de germinación de las semillas, consiguiéndose valores equivalentes a los obtenidos en los tratamientos control (H₂O en 1 y 4 días de incubación). Por su parte, dosis mayores a 0.1 uM de ABA indujeron el bloqueo de la germinación independientemente al período de incubación en oscuridad de las semillas (Fig.3.2.3.1).

La sensibilidad al ABA de las semillas fue evaluada con dosis crecientes de ABA en presencia de Fluridona (F, inhibidor de la síntesis de ABA. Bartels et al., 1978). La concentración de inhibidor utilizada (100 μ M) fue seleccionada a partir de una curva de respuesta a F, en la cual se observó que 100 μ M era la concentración mínima requerida para inducir completamente la germinación de las semillas inducidas a entrar en dormición secundaria por efecto de la incubación prolongada en oscuridad a 25C (datos no mostrados). La Fig. 3.2.3.2 muestra que la respuesta de germinación a distintas dosis de ABA + Fluridona resultaron independientes del nivel de dormición de las semillas sugiriendo que la entrada en dormición secundaria no afecta la sensibilidad de las semillas al ABA durante la incubación en oscuridad a 25C.

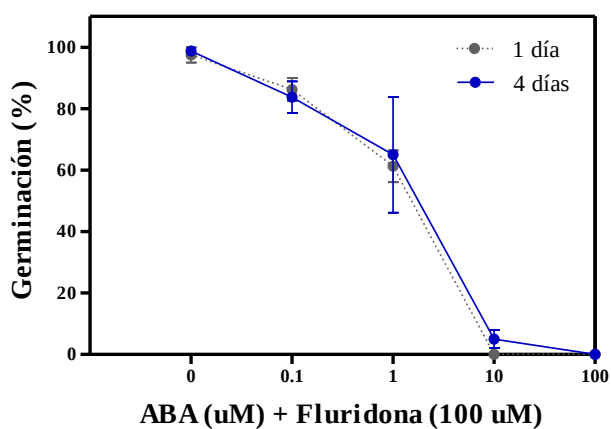


Fig. 3.2.3.2. Evaluación de la sensibilidad a ABA durante la entrada en dormición secundaria. Las semillas fueron incubadas en oscuridad a temperatura cte durante 1 y 4 días. Se analizaron diferencias (Fisher) dentro de cada dosis, letras distintas significan diferencias superiores al 5%.

3.2.4. Determinación de los niveles de ABA y GA en semillas despiertas y dormidas.

Debido al rol destacado de ABA y GA en los procesos de dormición y germinación, se evaluaron los niveles de hormonas presentes en semillas despiertas e inducidas a entrar en dormición secundaria por efecto de la incubación en oscuridad a temperatura constante (Fig. 3.2.4.1).

El porcentaje de germinación de las semillas fue cercano al 100% para semillas despiertas y al 40% para el caso de las semillas entradas en dormición secundaria por acción de la incubación en oscuridad a 25C (datos no mostrados). Se observó que los niveles de GA disminuyeron en respuesta a la incubación en oscuridad a 25C (i.e., 1 y 4 días) sin presentar diferencias significativas entre semillas expuestas o no a la luz (Fig. 3.2.4.1.a). Por su parte, los niveles de ABA se mantuvieron constantes entre semillas despiertas y dormidas (Fig. 3.2.4.1.b).

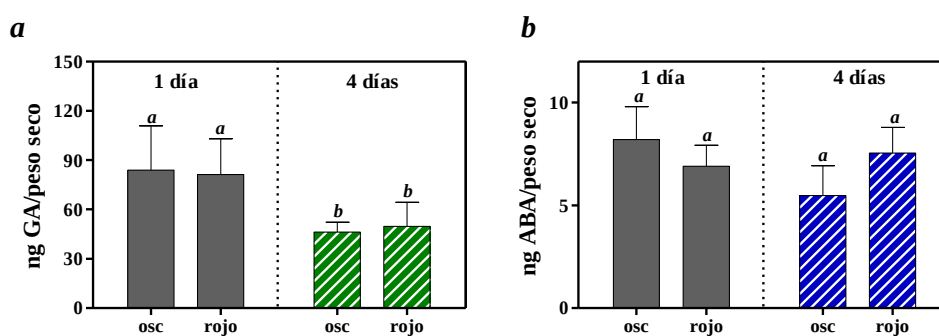


Fig. 3.2.4.1. Niveles de hormona en semillas inducidas a entrar en dormición secundaria en respuesta a la incubación en oscuridad a 25C. a) ng de GA y b) ng de ABA sobre mg de peso seco de semillas.

3.2.5. Expresión de genes vinculados a las vías hormonales de GA y ABA durante la entrada en dormición secundaria.

Con el objeto de tener una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la entrada en dormición secundaria, se analizó la expresión de genes vinculados a las vías de síntesis y señalización de las GA y ABA. Se extrajo ARN mensajero (ARNm) de semillas mantenidas en oscuridad a temperatura constante (25C) por 1 y 4 días y posteriormente irradiadas con un pulso de luz R. La cosecha del material se realizó 5 hs luego del pulso de luz. Con dicho material se realizó qRT-PCR. Algunos de los genes evaluados fueron los vinculados a las vías catabólicas y anabólicas de GA: *GA2OX2* y *GA3OX1*, respectivamente (Yamauchi et al., 2004). En la Fig. 3.2.5.1 *a* y *b*. se puede observar que ambos genes presentaron el mismo patrón de expresión. El pulso de luz R no afectó la expresión de *GA2OX2* y *GA3OX1* con respecto al control en oscuridad tanto en semillas dormidas como despiertas. Sin embargo, la entrada en dormición secundaria fue acompañada por una disminución significativa en los niveles de expresión de ambos transcritos. Esto sugiere que la maquinaria metabólica de las GA se encuentra mucho más activa en semillas despiertas que en semillas que entraron en dormición secundaria.

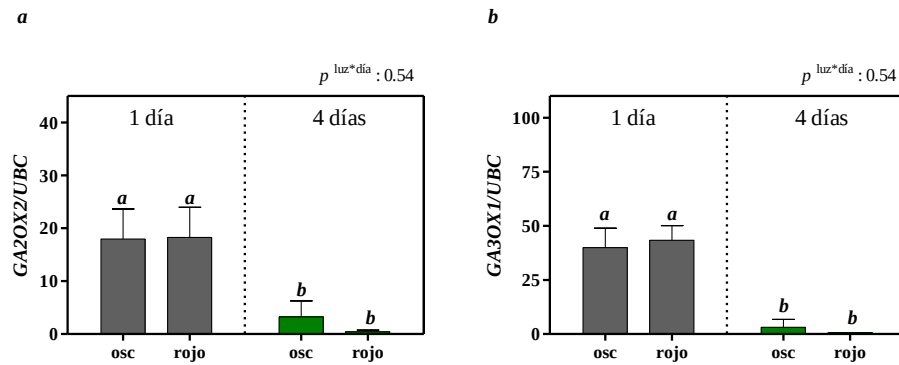


Fig. 3.2.5.1. Niveles relativos de expresión de componentes de las vías metabólicas de giberelinas. a) *Ga2OX2*: perteneciente a las rutas catabólicas y b) *GA3OX1*: perteneciente a las rutas anabólicas.

Dentro de las vías de transducción de señales de GA, se han identificado proteínas DELLAs caracterizadas como reguladores negativos de las vías de acción de las GA que, además representan un nexo fundamental entre las vías de GA y ABA y componentes de la pared celular (Piskurewicz et al., 2008). Bajo los tratamientos descritos con anterioridad fue evaluado el nivel de expresión de cuatro integrantes de esta familia: *RGL1*, *RGL2*, *RGA* y *GAI* (Fig. 3.2.5.2). Los niveles de expresión de *RGL1*, *RGA* y *GAI* se redujeron en respuesta al pulso de R en semillas despiertas, mientras que sólo la expresión de *GAI* se redujo en semillas dormidas previamente expuestas a un pulso de R (Fig. 3.2.5.2). En todos los casos, los valores de expresión fueron significativamente menores en semillas dormidas que en semillas despiertas.

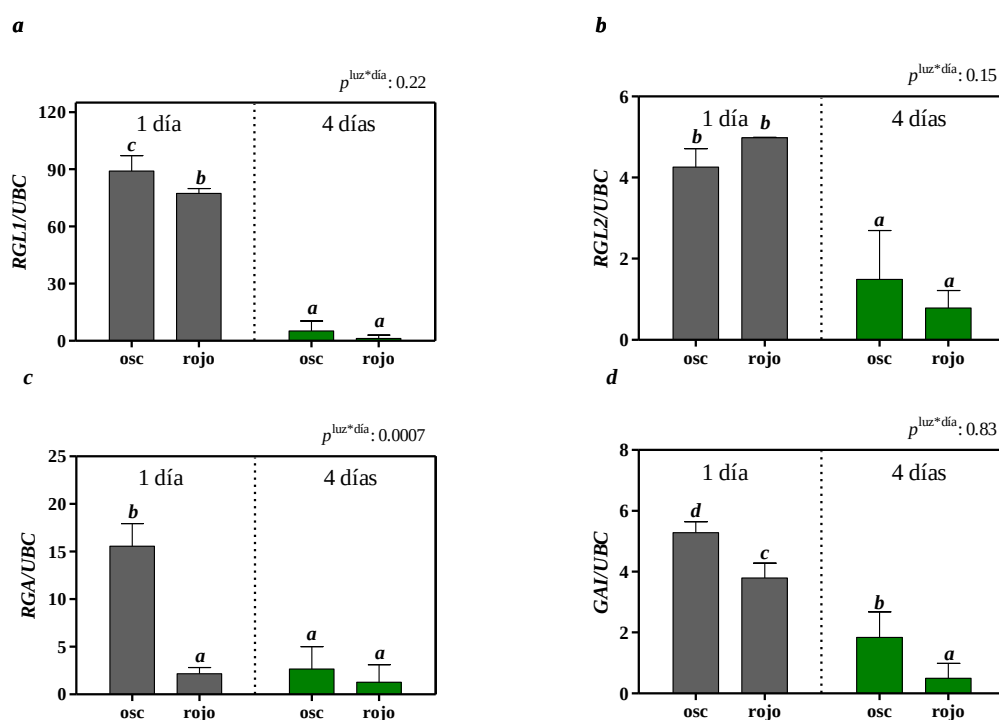


Fig. 3.2.5.2. Expresión relativa de DELLAs en respuesta a tratamientos de inducción a la entrada en dormición secundaria por incubación prolongada en oscuridad a 25°C. a) *RGL1*, b) *RGL2*, c) *RGA* y d) *GAI*.

Los genes asociados a las vías metabólicas de ABA evaluados fueron *CYP707A2* y *NCED9* (Lefebvre et al., 2006; Fig. 3.2.5.3). La expresión de *NCED9*, un gen necesario para sintetizar ABA activo en las semillas, está fuertemente reducida por la entrada en dormición secundaria pero no se ve afectada por la luz R en semillas dormidas ni despiertas (Fig.3.2.5.3a). *CYP707A2*, un gen involucrado en las vías catabólicas del ABA, incrementó significativamente su expresión con un pulso de luz R en semillas dormidas pero no en semillas despiertas (Fig. 3.2.5.3b).

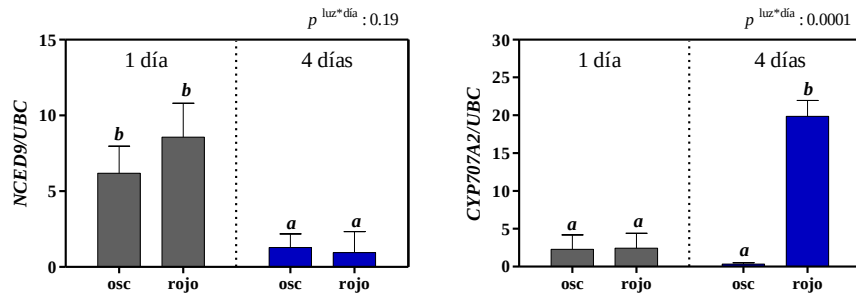


Fig 3.2.5.3. Niveles relativos de expresión de componentes de las vías metabólicas de ABA. a) *NCED9*: perteneciente a las rutas anabólicas y b) *CYP707A2*: perteneciente a las rutas catabólicas.

Entre los genes de señalización de ABA se evaluaron los niveles de expresión de tres factores de transcripción (*ABI3*, *ABI5* y *FUS3*. Fig. 3.2.5.4) que están involucrados en el desarrollo embrionario y en el establecimiento de la dormición primaria (Chiu et al., 2012).

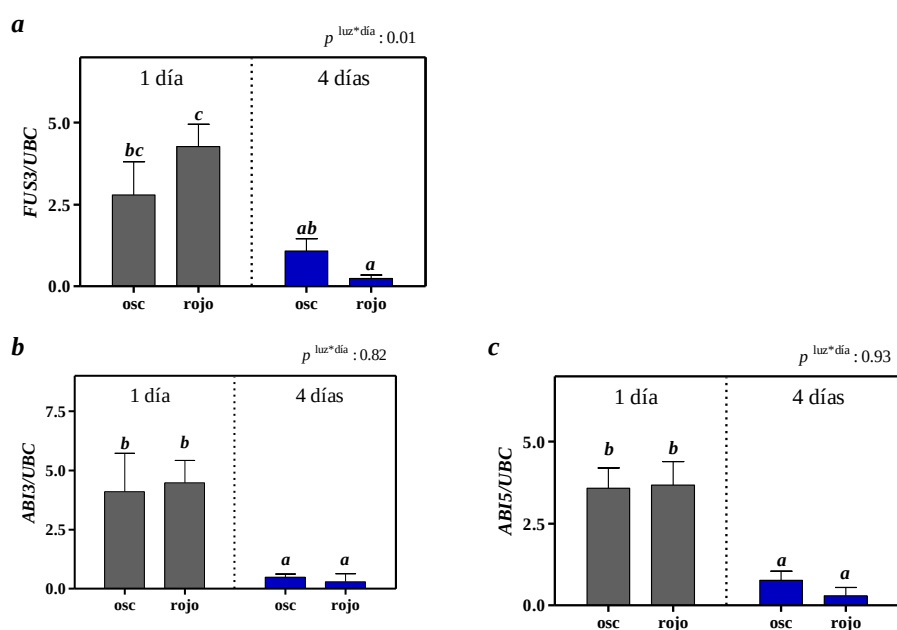


Fig. 3.2.5.4. Expresión relativa de factores de transcripción vinculados a vías de señalización de ABA en respuesta a tratamientos de inducción a la entrada en dormición secundaria por incubación prolongada en oscuridad a 25C. a) *FUS3*, b) *ABI3* y c) *ABI5*.

Los tres factores de transcripción evaluados presentaron un perfil de expresión similar. (a) Los niveles de transcripto disminuyeron significativamente en semillas con dormición secundaria con respecto a semillas despiertas y (b) la expresión de estos genes no es afectada por la luz en semillas despiertas o dormidas. Estos resultados de expresión de genes de señalización de ABA no parecen explicar el fenotipo de semillas con dormición secundaria confirmando que la sensibilidad al ABA de las semillas en este proceso no está alterada (Fig. 3.2.3.2).

En un estudio previo (Cadman et al., 2006) se evaluaron los perfiles de expresión en semillas de la accesión *Cabo Verde* (Cvi) cuyos niveles de dormición son mayores a los que presenta la accesión *Columbia*. Allí se evaluaron 13 estadíos distintos de dormición en las semillas. En esta tesis se utilizó dicha

información para analizar algunas similitudes y/o diferencias entre ambos trabajos. De los 13 estadíos evaluados por Cadman et al (2006) analizamos el transcriptoma correspondiente a dos de ellos (a) salida de dormición primaria por germinación inducida por luz (LIG) y (b) entrada en dormición secundaria por la incubación en oscuridad por 24 días a 20C (SD1). El 75% de los genes analizados (10181 genes) se expresaron significativamente en ambos grupos, y sólo 17% y 7% de los genes fueron específicos a los estadíos LIG y SD1, respectivamente. De los 11 genes cuya expresión fueron evaluados en esta tesis en la entrada en dormición secundaria, 7 genes estuvieron presentes en ambas condiciones (Tabla 3.2.5.1). Con respecto a los genes vinculados a las vías hormonales, se observó un aumento en los niveles de genes anabólicos de GA en las semillas LIG; mientras que la expresión de los genes metabólicos de ABA se incrementaron en las semillas SD1. Estos datos sugieren que (a) hay un grupo significativo de genes comunes que se expresan para el control de la dormición primaria y secundaria y (b) que la entrada en dormición secundaria involucra la expresión de genes asociados a la señalización por GA y las vías metabólicas de ABA mientras que la salida en dormición primaria involucra la expresión de genes asociados a la señalización por ABA.

NOMBRE	ATG	SD	LIG	SD/LIG
<i>ABI3</i>	AT3G24650	499,41	1242,28	0,4
<i>ABI5</i>	AT2G36270	441,36	662,65	0,67
<i>CYP707A2</i>	AT2G29090	321,78	130,94	2,46
<i>FUSCA3</i>	AT3G26790	--	--	ND
<i>GA2OX2</i>	AT1G30040	98	--	ND
<i>GA3OX1</i>	AT1G15550	--	--	ND
<i>GAI</i>	AT1G14920	892,35	663,66	1,34
<i>NCED9</i>	AT1G78390	53,39	3,23	16,53
<i>RGA</i>	AT2G01570	543,65	362,82	1,5
<i>RGL1</i>	AT1G66350	--	20,71	ND
<i>RGL2</i>	AT3G03450	398,62	322,83	1,23

Tabla 3.2.5.1. Análisis de niveles de expresión de genes asociados a la entrada en dormición secundaria en bases de datos publicados en Cadman et al., 2006.
ND: No determinado, --: Sin señal.

3.2.6. Rol de DOG1 y PIL5 en la entrada en dormición secundaria de las semillas.

Con el objeto de determinar si los procesos de entrada en dormición primaria y secundaria comparten similitudes a nivel molecular, se estudió la entrada en dormición secundaria en semillas salvajes y algunos mutantes conocidos por su relación con la dormición primaria como DOG1 y PIL5 (Bentsink et al., 2006; Shen et al., 2005).

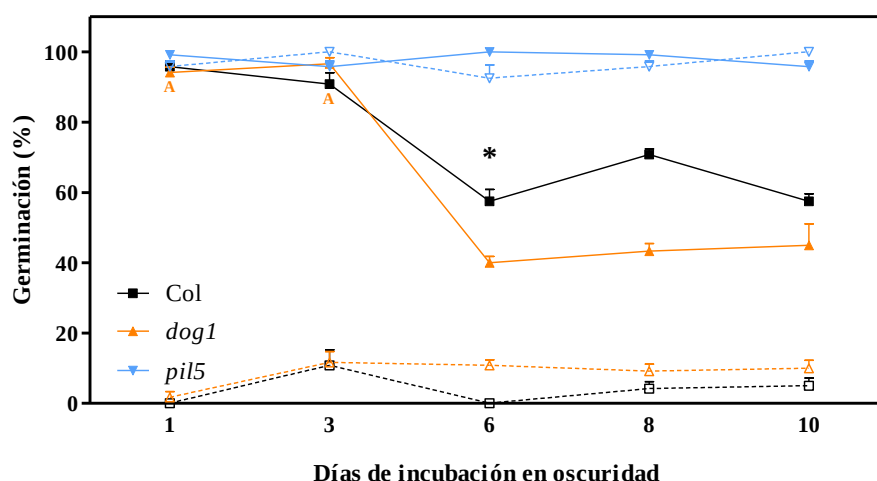


Fig. 3.2.6.1. Respuesta a la incubación prolongada en oscuridad de mutantes para reguladores de la entrada en dormición primaria. Las curvas punteadas representan la respuesta en oscuridad y las coloreadas la respuesta a R. * : Diferencia significativa entre Col y *dog1*.

Las semillas de salvajes *Col* germinaron alrededor del 80% en el primer día de incubación a 25C disminuyendo en los días siguientes siendo mínima a partir del sexto día de tratamiento de oscuridad a 25C. Por su parte, la ausencia de PIL5 afectó la germinación independiente al tiempo de incubación, y a la presencia o ausencia de luz siendo la germinación cercana al 100%. Esto indica que la ausencia de PIL5 impide la entrada en dormición secundaria de las semillas cuando son incubadas en oscuridad a 25C (Fig. 3.2.6.1). Las semillas *dog1* germinaron en forma idéntica a *Col* en oscuridad. Sin embargo, las semillas *dog1* expuestas a un pulso de luz R germinaron menos que las semillas salvajes a partir del sexto día de incubación en oscuridad, sugiriendo que DOG1 impide la entrada en dormición secundaria. Estos resultados sugieren que los efectos de DOG1 en dormición primaria y secundaria son antagónicos: mientras que DOG1 impone dormición primaria, su rol es impedir la entrada en semillas que entran en dormición secundaria.

La evaluación de los niveles de expresión de *DOG1* mediante qRT PCR en semillas salvajes despiertas y dormidas muestran que los niveles de transcritos de *DOG1* se reducen significativamente en semillas con dormición secundaria. Además, en semillas despiertas el pulso de R causó una disminución significativa en los niveles de expresión de *DOG1* (Fig. 3.2.6.2).

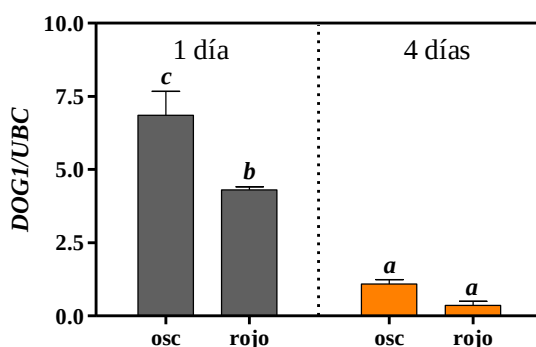


Fig. 3.2.6.2. Expresión relativa de *DOG1* en respuesta a tratamientos de inducción a la entrada en dormición secundaria por incubación prolongada en oscuridad a 25°C.

Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, $p < 0.05$." Para comprender la función de *DOG1* en la entrada en dormición secundaria, se estudió la germinación de semillas salvajes y *dog1* a distintas dosis de GA (Fig. 3.2.6.3). En semillas despiertas, ambos genotipos germinaron 100% y dosis crecientes de GA₄ no tuvo efectos sobre la respuesta. En semillas con dormición secundaria, *dog1* germinó peor que *Col* a concentraciones bajas de GA₄ hormona y sólo se igualaron los niveles de germinación de las semillas *Col* y *dog1* a 100 uM de GA₄. Estos resultados sugieren que las semillas de *dog1* tienen un mayor nivel de dormición secundaria probablemente porque tienen alteradas la respuesta a las GA. Para distinguir si las diferencias de respuesta de las semillas de *Col* y *dog1* son debidas a distintas sensibilidades a las GA, se diseñó un experimento con el

agregado de GA₄ en el medio de siembra junto a P. No se observaron diferencias significativas en la germinación entre las semillas de *Col* y *dog1* despiertas o dormidas (Fig 3.2.6.4). Estos resultados sugieren que DOG1 está impidiendo la entrada en dormición secundaria a través de efectos sobre la concentración de GA y no sobre la sensibilidad a dicha hormona.

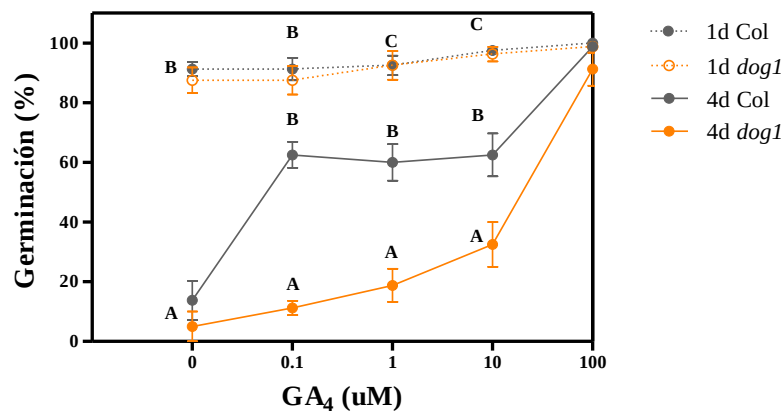


Fig. 3.2.6.3. Respuesta a Giberelinas de semillas *Col* y *dog1* en dos tiempos diferentes de incubación en oscuridad: 1 y 4 días. Las comparaciones se realizaron dentro de cada dosis evaluada. Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, p : 0.05.

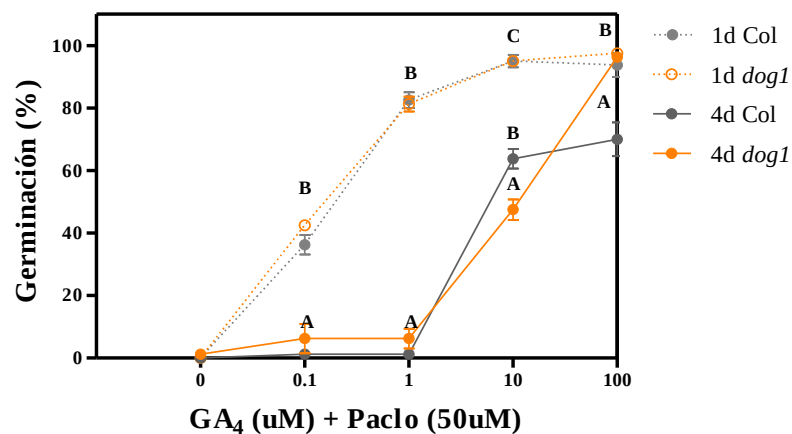


Fig. 3.2.6.4. Evaluación de la sensibilidad a GAs durante la entrada en dormición secundaria. Las semillas fueron incubadas en oscuridad a temperatura cte durante 1 y 4 días. Se analizaron diferencias (Fisher) dentro de cada dosis, letras distintas significan diferencias superiores al 5%.

Además, fueron evaluados los efectos del ABA en la entrada en dormición secundaria de las semillas comparando la germinación de las semillas de *Col* y *dog1*. En semillas despiertas, ambos genotipos germinaron alrededor de un 100% en agua y mostraron un patrón de inhibición similar a concentraciones crecientes de ABA. Por otro lado, si bien las semillas de *dog1* incubadas en agua por 4 días germinaron significativamente menos que *Col*, el agregado de ABA exógena no afectó diferencialmente la respuesta de germinación entre genotipos (Fig. 3.2.6.5). Con el propósito de evaluar los efectos de sensibilidad al ABA en las semillas se realizó un experimento adicionando ABA exógena y Fluoridona. En este ensayo se observó que las semillas *dog1* presentan mayor sensibilidad al ABA que las semillas *Col* independientemente a si están despiertas o dormidas (Fig. 3.2.6.6). Estos resultados indican que las semillas *dog1* son más sensibles al ABA facilitando la entrada en dormición secundaria de las semillas.

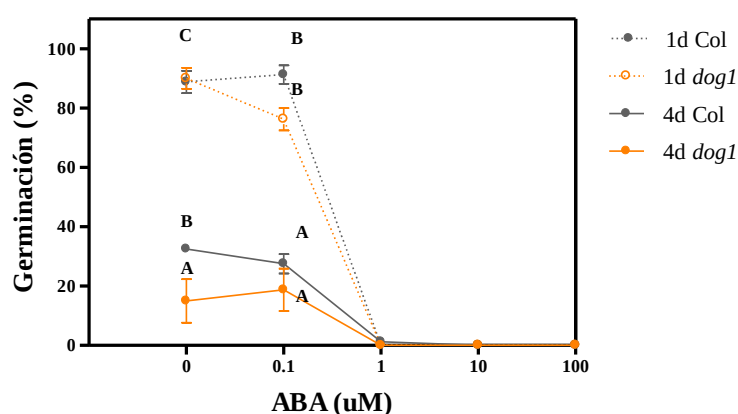


Fig. 3.2.6.5. Respuesta a ABA en dos tiempos diferentes de incubación en oscuridad: 1 y 4 días. Las comparaciones se realizaron dentro de cada dosis evaluada. Letras distintas significan diferencias significativas. Fisher, p : 0.05.

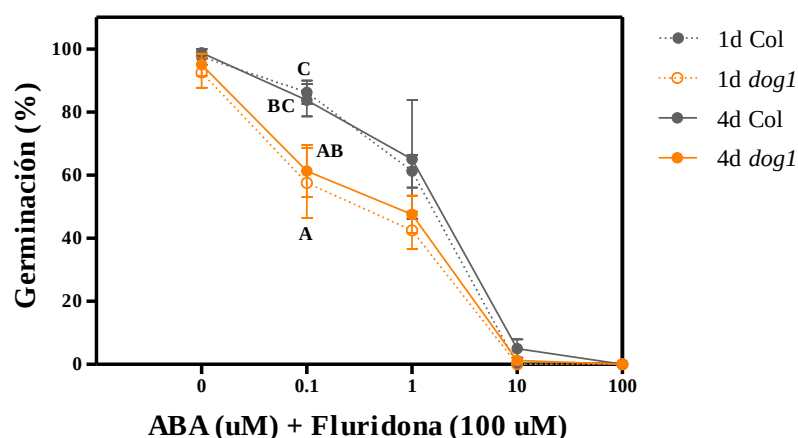


Fig. 3.2.6.6. Evaluación de la sensibilidad a ABA durante la entrada en dormición secundaria. Las semillas fueron incubadas en oscuridad a 25°C durante 1 y 4 días. Se analizaron diferencias (Fisher) dentro de cada dosis, letras distintas significan diferencias superiores al 5%.

Ya que *DOG1* es un gen que ha sido identificado previamente por tener variantes alélicas que afectan la dormición primaria de distinto modo, en esta tesis se evaluó la variación natural en la entrada en dormición secundaria de RILs que fueron clasificadas en función de sus niveles de sensibilidad para salir de dormición primaria (Bentsink et al., 2010).

Se evaluaron los niveles de germinación de semillas incubadas en oscuridad a temperatura constante de las accesiones *Kas 2*, *Fei-0*, *Cvi-0*, *Sha*, *Col* y *Ler*. Las semillas fueron incubadas por 1 ó 4 días y luego inducidas a germinar con un pulso de R. Los resultados se graficaron como el cociente entre los valores conseguidos al día sobre los 4 días de tratamiento en oscuridad (Fig. 3.2.6.7).

Se observó que aquellas accesiones sensibles a los tratamientos de ruptura de dormición primaria presentaron una sensibilidad equivalente a los tratamientos inductores de dormición secundaria. Resulta importante destacar que los valores

obtenidos para *Col* y *Ler* no fueron integrados al gráfico debido a que los niveles de dormición primaria no fueron publicados en conjunto con el resto de las accesiones analizadas por Bentsink et al. (2010).

Estos datos preliminares sugieren una vinculación directa entre los niveles de sensibilidad presentes en las semillas en los distintos estadios de dormición. Resultaría sumamente útil evaluar la salida de dormición primaria y la entrada en dormición secundaria de un número más elevado de accesiones con el propósito de confirmar, mediante técnicas que analizan la variación genética natural, estos resultados obtenidos.

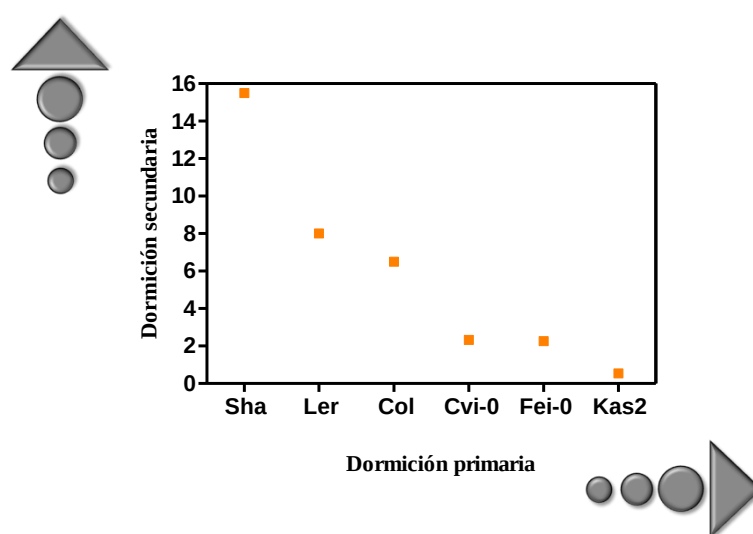


Fig. 3.2.6.7. Relación entre los niveles de dormición primaria y secundaria de distintas accesiones. Se graficaron los cocientes entre los porcentajes de germinación en respuesta a R de semillas incubadas por 1 ó 4 días a 25C en oscuridad. El orden de las accesiones según sus niveles de dormición primaria fue extraído de Bentsink et al. 2010.

3.2.7. Discusión.

La dormición de las semillas es un mecanismo de control del desarrollo que define el momento y espacio donde la futura planta va a crecer. Mientras que el establecimiento de la dormición primaria tiene lugar durante la maduración, la dormición secundaria ocurre en semillas despiertas que son embebidas en condiciones ambientales desfavorables para la germinación (Finkelstein et al., 2008). Entre algunos de los factores que regulan la entrada y salida de la dormición encontramos la temperatura y la luz (Bewley et al., 2013).

En este trabajo se demostró que la incubación en oscuridad a temperatura constante reduce los niveles de germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* despiertas (Fig. 3.2.1.2). La exposición de las semillas despiertas incubadas en oscuridad con un pulso de RL no indujo germinación a excepción de una ventana reducida de 3d cuando se observó una muy alta sensibilidad a la luz germinando aproximadamente 60% a través de la acción del phyA (Fig. 3.2.1.2; Botto et al., 1996). Durante períodos más extensos de incubación en oscuridad, el phyA es degradado aún en su forma inactiva como parte de un mecanismo que previene la acumulación excesiva de dicho fitocromo en el núcleo (Debrieux & Fankhauser, 2010). Por su parte, las semillas tratadas con un pulso de luz R presentaron un comportamiento diferente durante el proceso de entrada en dormición secundaria. Los niveles de germinación se mantuvieron cercanos al 100 % por un período de hasta 72 horas. La entrada en dormición secundaria fue lenta y paulatina reduciendo los niveles de germinación en al menos un 40% luego de 10 días de incubación en oscuridad (Fig. 3.2.1.2; Fig. 3.2.2.1 y Fig. 3.2.3.1). La acción de phyB y otros fitocromos estables que promueven la germinación en semillas expuestas a un pulso de luz R saturante se fue reduciendo a medida que

las semillas entraron en dormición secundaria (Botto et al., 1995; Shinomura et al., 1996).

La entrada en dormición secundaria está acompañada por la disminución tanto en los niveles endógenos de GA como en la sensibilidad a dicha hormona (Fig. 3.2.2.1 y Fig. 3.2.2.2). Por otro lado, los niveles de ABA en las semillas dormidas y despiertas no se modificaron (Fig. 3.2.3.1) ni tampoco se observaron cambios en la sensibilidad al ABA en las semillas (Fig. 3.2.3.2). Sin embargo, el agregado de fluridona, inhibidor de la síntesis de ABA endógeno, en el medio de cultivo permitió que las semillas con dormición secundaria germinaran a los mismos niveles que las semillas despiertas (Fig. 3.2.3.1). Estos datos sugieren que el ABA impone dormición secundaria pero que los niveles de la hormona activa y la sensibilidad al ABA en los tejidos no se ven afectados en la regulación de este proceso. Si bien las GA y ABA son las hormonas centrales que regulan la entrada en dormición secundaria no se puede descartar la intervención de otras hormonas en este proceso. Se ha comprobado que el etileno y las auxinas pueden inducir la germinación de semillas que salen de dormición primaria (Ghassemian et al., 2000; Carrera et al., 2007; Ibarra et al., 2013). En el futuro, sería interesante evaluar la posibilidad de la intervención de las auxinas y el etileno en la entrada en dormición secundaria de las semillas.

Con respecto a la expresión de genes durante la entrada en dormición secundaria, el patrón generalizado de los genes evaluados fue el de una fuerte reducción en los niveles de expresión con respecto a semillas despiertas independientemente de si las semillas fueron mantenidas en oscuridad o irradiadas con un pulso de luz R (Fig. 3.2.5.1, Fig. 3.2.5.2, Fig. 3.2.5.3 y Fig. 3.2.5.4). De los 11 genes analizados, sólo *CYP707A2*, involucrado en la desactivación del ABA

activo, mostró una expresión 10 veces mayor en semillas dormidas irradiadas con luz R con respecto a las semillas despiertas (Fig. 3.2.5.3b). La alta expresión de *CYP707A2* en semillas dormidas es difícil de explicar teniendo en cuenta la función del ABA en la imposición de dormición. Es probable que las semillas activen mecanismos de retrocontrol para mantener los niveles de ABA estables entre semillas despiertas y con dormición secundaria (Fig. 3.2.4.1). Estos mecanismos de retrocontrol de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de las hormonas ya han sido documentado en semillas que salen de la dormición primaria para el caso de *GA20ox3* (Cowling et al., 1998). Se observaron patrones de expresión similares en los datos publicados por Cadman et al. (2006). Allí, *CYP707A2* también incrementa sus niveles de expresión en semillas inducidas a entrar en dormición secundaria con respecto a semillas despiertas. La falta de correlación entre la respuesta de germinación de las semillas y la expresión de los genes evaluados sugiere que (a) las modificaciones post transcripcionales pueden ser importantes en la imposición de la dormición secundaria en las semillas, (b) el control de la dormición secundaria podría ser regulado a nivel proteico y/o (c) otros transcriptos no evaluados en el marco de esta tesis podrían determinar el nivel de dormición secundaria de las semillas.

La luz tuvo efectos sobre la expresión génica dependiendo del nivel de dormición secundaria (i.e., semillas despiertas vs. semillas dormidas). El análisis de ANOVA en la expresión génica de algunos de los genes evaluados demuestra que hay interacción significativa entre los factores “dormición” y “luz” (Fig. 3.2.5.1, Fig. 3.2.5.2, Fig. 3.2.5.3 y Fig. 3.2.5.4). De los cuatro grupos de genes analizados: Genes metabólicos de GA (*GA3OX1* y *GA20OX2*) y ABA (*NCED9* y *CYP707A2*); y genes de sensibilidad a la GA (DELLAS: *RGL1*, *RGA*, *GAI* y

RGL2) y ABA (*FUS3*, *ABI3* y *ABI5*), solo algunas DELLAS, junto con *CYP707A2*, fueron regulados por luz. La expresión de *RGL1*, *RGA* y *GAI* disminuyó cuando las semillas despiertas fueron expuestas a un pulso de R. Entre las DELLAs, sólo la expresión de *GAI* también redujo en semillas dormidas expuestas a un pulso de luz R (Fig. 3.2.5.2). Este patrón de expresión sugiere que distintas DELLAS modulan la entrada en dormición secundaria y que la sensibilidad a la luz de *GAI* es independiente al nivel de dormición de las semillas. El análisis transcripcional de la respuesta a la luz mediada por el phyA durante la salida de dormición primaria demostró que la dormición impone modificaciones en los niveles de expresión de *RGA*, *RGL2* y *GAI* respuesta a la luz (Fig. 3.1.6.2). Si bien *RGA* y *GAI* son regulados por luz en la salida de dormición primaria y entrada en dormición secundaria, *RGL1* participa solamente en la entrada en dormición secundaria sugiriendo que distintos componentes asociados a la señalización de las GA participan en ambos procesos.

La presencia de *DOG1* impide que las semillas de *Arabidopsis thaliana* entren en dormición secundaria (Fig. 3.2.6.1), sugiriendo funciones antagónicas para este factor de naturaleza molecular desconocida durante la salida de la dormición primaria y la entrada en dormición secundaria de las semillas. La acción de *DOG1* en la dormición secundaria es independiente de la vía del ABA ya que las semillas salvaje y *dog1* germinan en forma similar cuando se adiciona ABA al medio de cultivo (Fig. 3.2.6.5). Sin embargo, al igual que fuera descripto previamente, la sensibilidad al ABA de las semillas *dog1* es mayor comparado a las semillas salvajes (Fig. 3.2.6.6; Bentsink et al., 2006). Nakavashayi (2012) ha propuesto que existe una retroalimentación negativa entre los niveles proteicos de *DOG1* y la cantidad de ABA y que ambas vías actúan de modo independiente afectando

potenciales blancos comunes. DOG1 es un gen identificado a partir de estudios de variación natural entre las accesiones que tienen distintos alelos que imponen grados variables de dormición, el alelo débil Ler-DOG1 impone poca dormición primaria; mientras que el alelo fuerte CVI-DOG1 impone un alto nivel de dormición primaria que se diluye con el tiempo de postmaduración (Bentsink et al 2006). Por otra parte, la presencia de DOG1 reduce la sensibilidad de las semillas a la luz y esto es válido para un grupo importante de accesiones (Laserna et al., 2008). En esta tesis, se observó que semillas pertenecientes a accesiones con niveles bajos de dormición primaria entran en dormición secundaria con mayor velocidad que aquellas que tienen niveles más altos de dormición primaria (Fig. 3.2.6.7). Estos resultados apoyan la idea de que DOG1 está involucrado en la salida de dormición primaria y la entrada en dormición secundaria sugiriendo que DOG1 podría tener una función de modulador central de ambos estadios de las semillas controlando que proceso se ejecuta.

La ausencia de PIL5 inhibe la entrada en dormición secundaria (Fig. 3.2.6.1). PIL5 es un factor de transcripción del tipo bHLH capaz de reconocer y unirse a las regiones promotoras de genes asociados a las vías de señalización de ABA y GA (Oh et al., 2007). Se ha propuesto que el control de la germinación mediada por PIL5 regula en forma directa y negativa la expresión de los genes metabólicos de GA e indirectamente los del ABA a través de la acción de SOMNUS (Oh et al., 2007). En ausencia de PIL5, el balance hormonal de GA/ABA favorece la germinación de las semillas impidiendo la entrada en dormición secundaria de las mismas (Figura 3.2.6.1).

Las semillas han evolucionado integrando señales endógenas y ambientales para ajustar el momento y el lugar donde la futura planta va a crecer y

desarrollarse. En la última década, hemos aprendido mucho acerca del modo en que las semillas integran las señales en una red de señalización molecular. La flexibilidad en la regulación de los procesos como la dormición y germinación están asociados a la disponibilidad de puntos de regulación transcripcional y transduccional que modulan el metabolismo, la señalización y el transporte hormonal. En la Fig. 3.2.7.1 se propone un modelo simplificado de algunos de las componentes evaluados en el control de la dormición secundaria de las semillas en este capítulo.

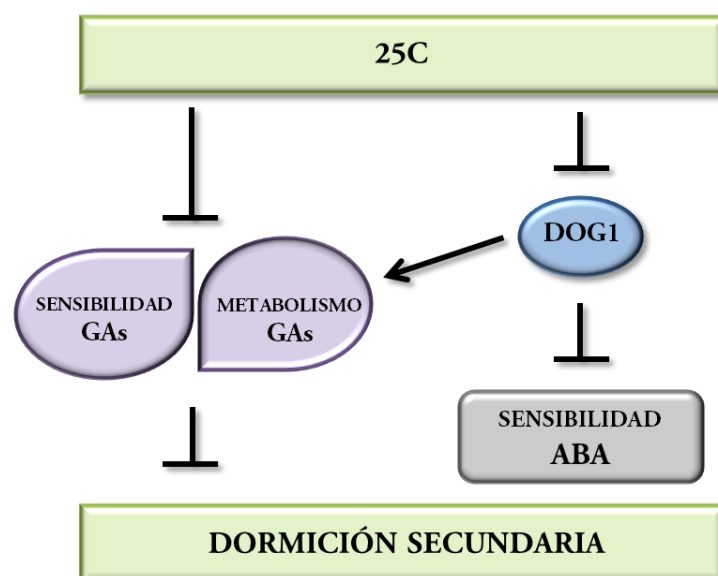


Fig.3.2.7.1. Mecanismo de regulación de la entrada en dormición secundaria de las semillas. Durante la entrada en dormición secundaria, los niveles de GAs disminuyen. DOG1 afecta negativamente la respuesta de las semillas a través de la modulación de la sensibilidad a GA mientras que los niveles de ABA no se modifican.

La entrada en dormición secundaria es un proceso regulado principalmente por GA, donde son sus niveles y sensibilidad quienes determinan el modo en que las semillas responden a las condiciones de incubación. Si bien el contenido de ABA afecta la dormición secundaria, sus efectos no se encuentran asociados a las vías

de señalización del ABA. Por otra parte, DOG1 actúa evitando que las semillas entren en dormición secundaria. Conocer el modo en que el proceso de dormición secundaria tiene lugar y los elementos moleculares centrales de su regulación, nos puede ayudar a manejar más eficientemente la germinación de las semillas de ciertas especies que entran en dormición secundaria y que tienen un alto valor agronómico.

CAPÍTULO 4:

CONCLUSIONES GENERALES

4.1. Conclusiones generales.

La dormición es un mecanismo que retrasa la germinación hasta que las condiciones del ambiente resulten favorables para el desarrollo futuro de la plántula (Finkelstein et al., 2008). Si bien los distintos tipos de dormición establecen una pausa entre la dispersión de las semillas y el momento en que ocurre la germinación, los mecanismos que los controlan pueden ser diferentes.

Mientras la dormición primaria se establece durante la maduración (aún vinculada a la planta madre), semillas embebidas expuestas a condiciones de temperatura desfavorables o a inadecuadas calidades de luz, pueden entrar en estado de dormición secundaria. Estudios moleculares muestran que la dormición correlaciona con cambios a nivel transcripcional, traduccional y hormonal en función de los distintos niveles y tipos de dormición (Toorop et al., 2005; Cadman et al., 2006). El balance hormonal establecido entre ABA y GA, junto con la sensibilidad a dichas hormonas representan los principales reguladores endógenos del proceso, mientras que la temperatura y luz, son los factores ambientales primordiales que afectan los niveles de dormición de las semillas (Benech-Arnold et al., 2000). En los últimos años se han realizado importantes avances en el conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales dichos factores ambientales afectan las vías metabólicas de ABA y GA (Holdsworth et al., 2008).

En la primer sección de resultados (3.1), la evaluación del perfil transcriptómico asociado a la actividad de phyA durante la salida de la dormición primaria y la germinación de las semillas en respuesta al RL, ha dejado en evidencia que el 11% del genoma de *A. thaliana* modifica sus niveles de expresión y que genes asociados tanto al metabolismo como a la señalización de ABA y GA se ven afectados durante la salida de dormición de las semillas. A su

vez, se ha demostrado que a nivel transcripcional, los mecanismos de la salida de dormición primaria que involucran a las vías de acción del phyB en respuesta al R, son parcialmente distintos a los que ocurren cuando la germinación es promovida por el phyA. Esto implica que, si bien la germinación en semillas de *Arabidopsis thaliana* puede inducirse por acción del phyA o phyB los mecanismos que desencadenan ambos fitocromos son, al menos en parte, específicos a cada uno de ellos. En el marco de estos hallazgos es posible pensar que de este modo, las semillas germinan en respuesta a un determinado ambiente lumínico por vías específicas que articularán con mecanismos y procesos necesarios para que las plántulas emergentes resulten aptas para el ambiente al que se encontrarán expuestas.

En la segunda sección de resultados (3.2), la atención se centró en los mecanismos involucrados en la regulación de la entrada en dormición secundaria de las semillas por acción de la incubación en oscuridad a temperatura constante. El nivel de dormición secundaria fue evaluado por la capacidad de las semillas para germinar en respuesta a un pulso de R.

Se demostró que durante la entrada en dormición secundaria tiene lugar la disminución significativa de los niveles y sensibilidad a GA mientras que los niveles y sensibilidad a ABA no se modifican.

Durante el establecimiento y la salida de la dormición primaria, tanto los niveles de GA como de ABA se ven afectados modificando de forma conjunta el balance hormonal que define, en gran medida, el modo en que la semilla ha de responder ante las condiciones ambientales que inducen o bloquean la dormición y germinación. Por lo tanto, el hecho de identificar en el marco de esta tesis que la entrada en dormición secundaria no involucra cambios en el metabolismo del

ABA, representa un avance en la empresa de caracterizar y conocer los mecanismos exclusivos asociados a la dormición secundaria de las semillas.

Los distintos tipos de dormición presentan características propias. Esto le confiere a las semillas la capacidad de responder a condiciones ambientales específicas según su situación fisiológica. Aquí se han obtenido las primeras evidencias experimentales a partir de las cuales podría postularse que las semillas presentan un nivel de sensibilidad que se mantiene aún en el traspaso de una clase de dormición a otra y que, probablemente, sea DOG1 uno de los elementos centrales en la regulación de dicho proceso ya que su rol se modifica durante la salida de dormición primaria y la entrada en dormición secundaria de las semillas, imponiendo e inhibiendo dormición, respectivamente. Posiblemente, las semillas lo suficientemente sensibles como para salir de dormición primaria mantengan dicha característica aún en condiciones desfavorables entrando en dormición secundaria más rápidamente que aquellas cuyos requisitos para salir de dormición primaria resulten más estrictos. Fig. 4.1.1.

En un futuro, resultaría pertinente evaluar el modo en que otros elementos caracterizados por regular la dormición primaria, como FUSCA3 o SOMNUS, intervienen en la entrada en dormición secundaria de las semillas.

Por otro lado, sería interesante poner a prueba el modo en que especies de interés agronómico como arroz colorado por ejemplo, el cual representa una maleza de difícil control debido a su comportamiento agresivo en el campo (Arias & Chaparro, 1976; Gianinetti & Vernieri, 2007), entra en dormición y la forma en que dicho proceso afecta los niveles de DOG1 y el balance entre ABA y GA en dicha especie.

El interés por resolver problemáticas propias de cultivos comerciales ha sido una de las causas de la vasta cantidad de información generada durante los últimos años acerca de los mecanismos que involucran a la dormición primaria. No ha sucedido lo mismo con la dormición secundaria: ésta representa una problemática interesante pero a su vez, poco explorada, posiblemente debido a que su manifestación depende fuertemente de una interacción con el ambiente y por ende su ocurrencia en la práctica agronómica es muy variable. Resultan necesarias nuevas investigaciones que permitan dilucidar en mayor detalle los mecanismos involucrados en el control de la dormición en función de las distintas condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas las semillas.

BIBLIOGRAFÍA

Arana M.V., Burgin M.J., de Miguel L.C. and Sánchez R.A. (2007). *The very-low-fluence and high-irradiance responses of the phytochromes have antagonistic effects on germination, mannan-degrading activities, and DfGA3ox transcript levels in Datura ferox seeds*. J Exp Bot. 58: 3997-4004.

Arias, C.; Chaparro, L. 1976. *Control Químico de Arroz Rojo y otras Malezas*. Mimeografiado. Sección de Semilla del INIA-Guárico. 18 p.

Auge G.A., Perelman S., Crocco C.D., Sánchez R.A. and Botto J.F. (2009). *Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds*. New Phytol. 183: 301-14.

Bae G. & Choi G. (2008). *Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins*. Annu Rev Plant Biol. 59: 281-311.

Ballaré C. 1999. *Keeping up with the neighbours: phytochrome sensing and other signalling mechanisms*. Trends in Plant Science 4: 97-102.

Barrôco R.M., Van Poucke K., Bergervoet, J.H.W., De Veylder L., Groot S.P.C., Inzé D. & Engler G. (2005). *The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development*. Plant Physiology. 137 (1), 127-140.

Bartels, P. G. & Watson C. W., 1978. *Inhibition of carotenoid synthesis by fluridone and norflurazon*. Weed Sci., 26, 198-203.

Baskin J.M. & Baskin C.C. (2004). *A classification system for seed dormancy*. Seed Science Research, 14 (1), 1-16.

Belin C., Megies C., Hauserová E. & Lopez-Molina L. (2009). *Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling*. Plant Cell 21: 82253-2268.

Benech-Arnold R.L., Sánchez R.A., Forcella F., Kruk B.C., & Ghera C.M. (2000). *Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil*. Field Crops Research, 67 (2), 105-122.

Bentsink L. & Koornneef M. (2008). *Seed Dormancy and Germination. Arabidopsis Book* 6:e0119. American Society of Plant Biologists.

Bentsink L., Soppe W., Koornneef M. (2007). *Dormancy and Germination*

in Seed Development. Bradford KJ, Nonogaki H (Blackwell, Oxford), pp 113–132.

Bentsink L., Jowett J., Hanhart C.J., & Koornneef M. (2006). *Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (45), 17042-17047.

Bentsink L., Hanson J., Hanhart C.J., Blankestijn-De Vries H., Coltrane C., Keizer P. & Koornneef M. (2010). *Natural variation for seed dormancy in arabidopsis is regulated by additive genetic and molecular pathways*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (9), 4264-4269.

Bewley J.D. (1997). *Seed germination and dormancy*. Plant Cell, 9 (7), 1055-1066.

Bewley J.D., Bradford K., Hilhorst H. & Nonogaki H. (2013). *Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer 3rd Edition.

Bewley, J. & Black, M. (1978). *Physiology and Biochemistry of Seeds*. Berlin, Heidelberg and New York: Springer-Verlag. pp. 306 and 375

Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H. & Toole, V.K. (1952). *A reversible photoreaction controlling seed germination*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 662–666.

Botto J.F., Ibarra S.E. & Jones A.M. (2009). *The heterotrimeric G-protein complex modulates light sensitivity in Arabidopsis thaliana seed germination*. Photochem and Photobiol. 85: 949–954.

Botto J.F., Sánchez R.A. & Casal J.J. (1995). *Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in Arabidopsis thaliana*. J Plant Physiol. 146: 307-312.

Botto J.F., Sánchez R.A. & Casal J.J. (1998). *Burial conditions affect the light responses of Datura ferox seeds*. Seed Sci Res. 8: 423-429.

Botto J.F., Sánchez R.A., Whitelam G.C. & Casal J.J. (1996). *Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and*

canopy shade light in Arabidopsis. Plant Physiol. 110: 439-444.

Botto J.F., Scopel A.L. & Sánchez R.A. (2000). *The photoinduction of weed seed germination during soil disturbance depends on soil water status after cultivation*. Aust J Plant Physiol. 27: 463-471.

Botto J.F., Scopel A.L., Ballaré C.L. & Sánchez R.A. (1998). *The effect of light during and after cultivation with different tillage implements on weed seedling emergence*. Weed Science 46: 351-357.

Brose J. (2009). *Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone*. Annu Rev Plant Biol. 60: 183-205.

Cadman C. S. C., Toorop P. E., Hilhorst H. W. M. & Finch-Savage W. E. (2006). *Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism*. Plant Journal, 46 (5), 805-822.

Cao D., Cheng H., Wu W., Soo H.M. & Peng J. (2006). *Gibberellin mobilizes distinct DELLA-Dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis*. Plant Physiol. 142: 509-525.

Cao D., Hussain A., Cheng H. & Peng J. (2005). *Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis*. Planta 223:105-13.

Carpita N.C., Sabulase D., Montezinos D. & Delmer D.P. (1979) *Determination of pore size of cell walls of living plant cells*. Science 205: 1141-1147.

Carrera E., Holman T., Medhurst A., Peer W., Schmuths H., Footitt S., Theodoulou F.L. & Holdsworth M.J. (2007). *Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination*. Plant Physiol. 143: 1669-79.

Casal J.J., Luccioni L., Oliverio K. & Boccalandro, H. (2003). *Light, Phytochrome Signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis*. Photochemical and Photobiological Sciences 2, 625-636.

Casal J.J. & Sánchez R.A. (1998). *Phytochromes and seed germination*.

Seed Science Research, 8:317-329.

Casal J.J. (1994). *Stem extension-growth responses to blue light require Pfr in tomato seedlings but are not reduced by the low phytochrome levels of the aurea mutant*. *Physiologia Plantarum*, 91:263-267.

Casal J.J., Cerdán P.D., Staneloni R.J. & Cattaneo L. (1998a). *Different phototransduction kinetics of phytochrome A and phytochrome B in Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116: 1533-8.

Casal J.J., Sánchez R.A. & Botto J.F. (1998b). *Modes of action of photochromes*. *Journal of Experimental Botany*, 49:127-138.

Casal J.J., Sanchez R.A., Di Benedetto A.H. & De Miguel L.C. (1991). *Light promotion of seed germination in datura ferox is mediated by a highly stable pool of phytochrome*. *Photochemistry and Photobiology*, 53 (2), 249-254.

Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y. & Liu D. (1999). *Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals*. *Science*, 284 (5415), 760-765.

Chiu R. S., Nahal H., Provart N. J. & Gazzarrini S. (2012). *The role of the Arabidopsis FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature*. *BMC Plant Biology*, 12:15.

Chory J. (1997). *Light modulation of vegetative development*. *Plant Cell*, 9 (7), 1225-1234.

Chory J., Peto C., Feinbaum R., Pratt L. & Ausubel F. (1989). *Arabidopsis thaliana mutant that develops as a light-grown plant in the absence of light*. *Cell*, 58 (5), 991-999.

Clarke J.D. & Zhu T. (2006). *Microarray analysis of the transcriptome as a stepping stone towards understanding biological systems: practical considerations and perspectives*. *Plant J.* 45:630-50.

Clerkx E.J.M., Blankestijn-De Vries H., Ruys G.J., Groot S.P.C. & Koornneef M. (2003). *Characterization of green seed, an enhancer of abi3-1 in arabidopsis that affects seed longevity*. *Plant Physiology*, 132 (2), 1077-1084.

Clough R.C. & Viestra R.D. (1997). *Phytochrome degradation*. *Plant Cell*

Environ, 20:713–721.

Cone J.W. & Kendrick R.E. (1985). *Fluence-response curves and action spectra for promotion and inhibition of seed germination in wildtype and long-hypocotyl mutants of Arabidopsis thaliana* L. Planta, 163 (1), 43-54.

Cone J.W. & Spruit C.J.P. (1983). *Imbibition conditions and seed dormancy of Arabidopsis thaliana*. Physiologia Plantarum, 59: 416–420.

Cosgrove D.J. (2000). *New genes and new biological roles for expansins*. Current Opinion in Plant Biology, 3 (1), 73-78.

Cowling R., Kamiya Y., Seto H., Harberd N.P. (1998). *Gibberellin dose-response regulation of GA4 gene transcript levels in Arabidopsis*. Plant Phys, 117(4): 1195-1203.

Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K. & Scheible W.R. (2005). *Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis*. Plant Physiol. 139: 5-17.

Dave A., Hernandez M.L., He Z.S., Andriotis V.M.E., Vaistij F.E., Larson T.R. & Graham I.A. (2011). *12-Oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis*. The Plant Cell 23, 583–599.

Debrieux D. & Fankhauser C. (2010). *Light-induced degradation of phyA is promoted by transfer of the photoreceptor into the nucleus*. Plant Molecular Biology, 73 (6), 687-695.

Deng X., Caspar T. & Quail P.H. (1991). *cop1: A regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in Arabidopsis*. Genes and Development, 5 (7), 1172-1182.

Deng X.W. & Quail P.H. (1999). *Signalling in light-controlled development*. Seminars in Cell and Developmental Biology, 10 (2), 121-129.

Devlin P.F., Patel S.R. & Whitelam G.C. (1998). *Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in Arabidopsis*. Plant Cell, 10 (9), 1479-1487.

Dill A., Thomas S.G., Hu J., Steber C.M. & Sun T. (2004). *The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation*. Plant Cell, 16 (6), 1392-1405.

Donohue K. (2002). *Germination timing influences natural selection on life-history characters in Arabidopsis thaliana*. Ecology 83: 1006–1016.

Donohue K. (2005). *Seeds and seasons: Interpreting germination timing in the field*. Seed Science Research, 15 (3), 175-187.

Drumm H. & Schopfer P. (1974). *Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (sinapis alba L.) seedlings - A reinvestigation*. Planta, 120 (1), 13-30.

Fernández-Calvo P., Chini A., Fernández-Barbero G., et al. (2011). *The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses*. Plant Cell 23: 701-715.

Finch-Savage W.E. & Leubner-Metzger G. (2006). *Seed dormancy and the control of germination*. New Phytologist, 171 (3), 501-523.

Finch-Savage W.E., Cadman C.S.C., Toorop P.E., Lynn J.R. & Hilhorst H. W.M. (2007). *Seed dormancy release in Arabidopsis cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative pattern of gene expression directed by environmentally specific sensing*. Plant Journal, 51 (1), 60-78.

Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T., & Steber C. (2008). *Molecular aspects of seed dormancy*. Annu Rev Plant Biol, 59, 387-415.

Finkelstein R.R., Gampala S.S.L. & Rock C.D. (2002). *Abscissic acid signaling in seeds and seedlings*. Plant Cell, 14(SUPPL.), S15-S45.

Franklin K., Praekelt U., Stoddart W., Billingham O., Halliday K. & Whitelam G. (2003). *Phytochromes B, D and E act redundantly to control multiple physiological responses in Arabidopsis*. Plant Physiology 131: 1340-1346.

Gabriele S., Rizza A., Martone J., Circelli P., Costantino P. & Vittorioso P. (2010). *The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by*

negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1. Plant J. 61: 312-23.

Ghassemian M., Nambara E., Cutler S., Kawaide H., Kamiya Y. & McCourt P. (2000). *Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in arabidopsis*. Plant Cell, 12 (7), 1117-1126.

Gianinetti A & Vernieri P. (2007). *On the role of abscisic acid in seed dormancy of red rice*. J Exp Bot. 58, 12: 3449-3462.

Groot S.P.C. & Karssen C.M. (1987) *Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants*. Planta 171:525–531.

Groot S.P.C., Van Yperen I.I. & Karssen C.M. (1991). *Strongly reduced levels of endogenous abscisic acid in developing seeds of tomato mutant sitiens do not influence in vivo accumulation of dry matter and storage proteins*. Physiologia Plantarum, 81: 73–78.

Hedden P. & Phillips A.L. (2000). *Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes*. Trends in Plant Science, 5 (12), 523-530.

Hedden P. (1997). *The oxidases of gibberellin biosynthesis: Their function and mechanism*. Physiologia Plantarum, 101 (4), 709-719.

Hedden P., & Graebe J. E. (1985). *Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of cucurbita maxima endosperm and malus pumila embryos*. Journal of Plant Growth Regulation, 4 (1-4), 111-122.

Hennig L., Stoddart W.M., Dieterle M., Whitelam G.C. & Schäfer E. (2002). *Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis*. Plant Physiol. 128: 194-200.

Hilhorst H.W.M., Finch-Savage W.E., Buitink J., Bolingue W. & Leubner-Metzger G. (2010). *Dormancy in plant seeds*. Topics in Current Genetics, 21, 43-67.

Hilhorst H.W. & Karssen C.M. (1988). *Dual Effect of Light on the Gibberellin- and Nitrate-Stimulated Seed Germination of Sisymbrium officinale and Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 86 (2):591-7.

Holdsworth M.J., Bentsink L., & Soppe W.J.J. (2008). *Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination*. New Phytologist, 179 (1), 33-54.

Ibarra S.E., Auge G., Sánchez R.A. & Botto J.F. (2013). *Transcriptional Programs Related to Phytochrome A Function in Arabidopsis Seed Germination*. Mol Plant, versión digital.

Jiao Y., Lau O.S. & Deng X.W. (2007). *Light-regulated transcriptional networks in higher plants*. Nat Rev Genet. 8: 217-230.

Kamiya Y. & García-Martínez J. (1999). *Regulation of gibberellin biosynthesis by light*. Curr. Opin. Plant Biol. 2, 398–403.

Kim W., Fujiwara S., Suh S., Kim J., Kim Y., Han L. & Somers D.E. (2007). *ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light*. Nature, 449 (7160), 356-360.

Kneissl J., Wachtler V., Chua N. H. & Bolle C. (2009). *OWL1: An Arabidopsis J-Domain Protein Involved in Perception of Very Low Light Fluences*. Plant Cell 21: 3212-3225.

Koornneef M., Rolff E. & Spruit C.J.P. (1980). *Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Z. Pflanzenphysiol.* 100, 147–160.

Kucera B., Cohn M.A. & Leubner-Metzger G. (2005). *Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination*. Seed Sci Res. 15: 281–307.

Laserna M.P., Sánchez R.A. & Botto J.F. (2008). *Light-related loci controlling seed germination in Ler x Cvi and Bay-0 x Sha recombinant inbred-line populations of Arabidopsis thaliana*. Ann Bot. 102: 631-42.

Lau O.S. & Deng X.W. (2010). *Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones*. Curr Opin Plant Biol, 13 (5):571-7.

Lefebvre V., North H., Frey A., Sotta B., Seo M., Okamoto M. & Marion-Poll, A. (2006). *Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed*

dormancy. Plant Journal, 45 (3), 309-319.

Leivar P. & Quail P.H. (2010). *PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub*. Trends Plant Sci. 16: 19-28.

Li C. & Wong W.H. (2003). *DNA Chip Analyzer (dChip) in the analysis of gene expression data: methods and software*. Edited by G. Parmigiani, E.S. Garrett, R. Irizarry & S.L. Zeger. Springer, New York. 120-141.

Li Y., Jones L & McQueen-Mason S. (2003). *Expansins and cell growth*. Curr Opin Plant Biol. 6: 603-610.

Lopez-Molina L. & Chua N. (2000). *A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 41 (5), 541-547.

Mancinelli A.L. (1994). *The physiology of phytochrome action*. Photomorphogenesis in Plants. pp 211-269.

McCarty D.R. (1995). *Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 46, 71-93.

McQueen-Mason S.J. & Cosgrove D.J. (1995). *Expansin mode of action on cell walls. analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding*. Plant Physiology, 107 (1), 87-100.

Mella R.A., Burgin M.J. & Sánchez R.A. (2004). *Expansin gene expression in Datura ferox L. seeds is regulated by the low fluence response but not by the high irradiance response of the phytochromes*. Seed Sci Res. 14: 61-72.

Nakabayashi K., Bartsch M., Xiang Y., Miatton E., Pellengahr S., Yano R., & Soppe W. J. J. (2012). *The time required for dormancy release in Arabidopsis is determined by DELAY OF GERMINATION1 protein levels in freshly harvested seeds*. Plant Cell, 24(7), 2826-2838.

Nambara E., & Marion-Poll A. (2005). *Absciscic acid biosynthesis and catabolism*. Annu Rev Plant Biol. 56: 165-85.

Neff M.M, Street I.H., Turk E.M. & Ward J.M. (2006). *Interaction of light*

and hormone signaling to mediate photomorphogenesis. *Photomorphogenesis in plants and bacteria*. Springer. pp 439-473.

Nonogaki H. (2008). *Repression of transcription factors by microRNA during seed germination and postgermination: Another level of molecular repression in seeds*. *Plant Signaling and Behavior*, 3 (1), 65-67.

Nonogaki H., Gee O.H. & Bradford K. J. (2000). *A germination-specific endo- β -mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds*. *Plant Physiology*, 123 (4), 1235-1245.

Ogawa M., Hanada A., Yamauchi Y., Kuwahara A., Kamiya Y. & Yamaguchi S. (2003). *Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination*. *Plant Cell* 15: 1591-604.

Oh E., Kang H., Yamaguchi S., Park J., Lee D., Kamiya Y. & Choi G. (2009). *Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 403-419.

Oh E., Kim J., Park E., Kim J.I., Kang C. & Choi G. (2004). *PIL5, a Phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 3045-3058.

Oh E., Yamaguchi S., Hu J., Utsuke J., Jung B., Paik I., Lee H.S., Sun T.P., Kamiya Y. & Choi G. (2007). *PIL5, a phytochrome-Interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds*. *Plant Cell* 19: 1192-1208.

Oh E., Yamaguchi S., Kamiya Y., Bae G., Chung W. & Choi G. (2006). *Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis*. *Plant J.* 47: 124-139.

Palaniswamy S.K., James S., Sun H., Lamb R.S., Davuluri R.V. & Grotewold E. (2006) *AGRIS and AtRegNet: A platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks*. *Plant Physiol.* 140: 818-29

Park J., Lee N., Kim W., Lim S. and Choi G. (2011). *ABI3 and PIL5*

collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed Arabidopsis seeds. Plant Cell 23: 1404-1415.

Penfield S., Josse E.M. & Halliday K.J. (2010). *A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy.* Plant Mol Biol. 73: 89-95.

Penfield S., Josse E.M., Kannangara R., Gilday A.D., Halliday K.J. & Graham I.A. (2005). *Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA.* Curr Biol. 15: 1998-2006.

Piskurewicz U., Jikumaru Y., Kinoshita N., Nambara E., Kamiya Y. & López-Molina L. (2008). *The Gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating Absciscic acid synthesis and ABI5 activity.* Plant Cell 20: 2729-2745.

Piskurewicz U., Tureckova V., Lacombe E. & Lopez-Molina L. (2009). *Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity.* EMBO J. 28: 2259-2271.

Qin M., Kuhn R., Moran S. & Quail P.H. (1997). *Overexpressed phytochrome C has similar photosensory specificity to phytochrome B but a distinctive capacity to enhance primary leaf expansion.* Plant Journal, 12 (5), 1163-1172.

Quail P.H. (1991). *Phytochrome: A light-activated molecular switch that regulates plant gene expression.* Annual Review of Genetics, 25, 389-409.

Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y. & Wagner D. (1995). *Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction.* Science, 268 (5211), 675-680.

Rodríguez-Gacio M.C., Matilla-Vázquez M.A. & Matilla A.J. (2009). *Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on.* Plant Signaling & Behavior, 4 (11), 1035-49.

Sánchez R.A., Sunell L., Labavitch J.M. & Bonner B.A. (1990). *Changes in the endosperm cell walls of two datura species before radicle protrusion.* Plant Physiology, 93 (1), 89-97.

Scopel A.L., Ballaré C.L. & Sánchez R.A. (1991). *Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations*. Plant Cell and Env. 14: 501-508.

Seo M., Nambara E., Choi G. & Yamaguchi S. (2009) *Interaction of light and hormone signals in germinating seeds*. Plant Mol Biol. 69: 463-472.

Shen H., Moon J., & Huq E. (2005). *PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis*. Plant Journal, 44(6), 1023-1035.

Shichijo C., Katada K., Tanaka O. & Hashimoto T. (2001). *Phytochrome A-mediated inhibition of seed in tomato*. Planta 213: 764-769.

Shinomura T. (1997). *Phytochrome regulation of seed germination*. Journal of Plant Research, 110 (1997), 151-161.

Shinomura T., Nagatani A., Chory J. & Furuya M. (1994). *The induction of seed germination in Arabidopsis thaliana is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A*. Plant Physiol. 104: 363-371.

Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M. & Furuya M. (1996). *Action spectra for phytochrome A- and phytochrome B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA. 93: 8129-8133.

Smith H. 2000. *Phytochromes and light signal perception by plants: an emerging synthesis*. Nature 407: 585-591.

Storey J. & Tibshirani R. (2003). *Statistical significance of genomewide studies*. Proc Natl Acad Sci USA. 100: 9440-9445.

Sun T. & Gubler F. (2004). *Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants*. Annu Rev Plant Biol. 55: 197-223.

Tepperman J.M., Zhu T., Chang H., Wang X. & Quail P.H. (2001). *Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98 (16), 9437-9442.

Toorop P.E., Barroco R.M., Engler G., Groot S.P.C., & Hilhorst H.W.M. (2005). *Differentially expressed genes associated with dormancy or germination of Arabidopsis thaliana seeds*. *Planta*, 221 (5), 637-647.

Tsai C.A., Hsueh H.M. & Chen J.J. (2003). *Estimation of false discovery rates in multiple testing: application to gene microarray data*. *Biometrics* 59: 1071-81.

Vanstraelen M. & Benkov E. (2012). *Hormonal interactions in the regulation of plant development*. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 28: 463-87.

Vaughan J.G. (1970). *The Structure and Utilisation of Oil Seeds*. Chapman and Hall Ltd., London.

Vázquez-Yanes C. & Smith H. (1982). *Phytochrome control of seed germination in the tropical rain forest pioneer trees Cecropia obtusifolia and Piper auritum and its ecological significance*. *New Phytol.* 92: 477–485.

Weiss D., & Ori N. (2007). *Mechanisms of cross talk between gibberellin and other hormones*. *Plant Physiology*, 144 (3), 1240-1246.

Whitelam G.C. & Devlin P.F. (1997). *Roles of different phytochromes in Arabidopsis photomorphogenesis*. *Plant, Cell and Environment*, 20 (6), 752-758.

Wilkinson M.D., McKibbin R.S., Bailey P.C., Flintham J.E., Gale M.D., Lenton J.R. & Holdsworth M.J. (2002). *Use of comparative molecular genetics to study pre harvest sprouting in wheat*. *Euphytica*, 126 (1), 27-33.

Yamaguchi S. & Kamiya Y. (2001). *Gibberellins and light-stimulated seed germination*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20 (4), 369-376.

Yamauchi Y., Ogawa M., Kuwahara A., Hanada A., Kamiya Y., & Yamaguchi S. (2004). *Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds*. *Plant Cell*, 16 (2), 367-378.

Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T. & Chory J. (2005). *A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis*. *Cell* 120: 249-59.

Zhao M., Han Y., Feng Y., Li F., & Wang W. (2012). *Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat*. Plant Cell Reports, 31 (4), 671-685.