



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Caracterización fisiológica y molecular de reguladores de *splicing*
alternativo y su rol en la germinación de las semillas de *Arabidopsis*
thaliana

Tesis de Licenciatura
Carla Milena Cartagena

Director: Ezequiel Petrillo

Co-directora: Rocío S. Tognacca

Tutora de Estudios: Gabriela Amodeo

Instituto de Fisiología Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE - CONICET - UBA)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 16 de junio de 2023

RESUMEN

Las señales ambientales como la luz y la temperatura modulan la expresión génica de la planta, afectando el transcriptoma. El *splicing* alternativo (SA) modula significativamente el transcriptoma, y hasta cierto punto el proteoma, durante el desarrollo y en respuesta a señales ambientales. La regulación del SA depende del nivel de expresión y la modificación postraducciona de proteínas ricas en serina/arginina (SR) y otros factores de *splicing*. Nuestro grupo de trabajo demostró que, cuando las semillas de *Arabidopsis thaliana* reciben un pulso de luz roja (Rp), se altera el patrón de SA de 226 genes asociados con el procesamiento del ARNm, el *splicing* del ARN y procesos metabólicos del ARNm. Entre los genes cuya expresión (y en particular su SA) es modulada por luz se encuentra el factor de *splicing* *At-RS31*. Interesantemente, la regulación de los eventos de SA no correlaciona con la intensidad de la respuesta de germinación, sino con la luz de manera más directa, lo que implica que el SA es regulado "río arriba" de la respuesta fisiológica. Esto nos permite hipotetizar que los cambios en SA podrían preceder a, y ser la base de, las respuestas fisiológicas de las semillas (i.e.: germinación). En esta tesis demostramos que la sobre-expresión de la isoforma codificante de *At-RS31* (*mRNA1*) promueve la germinación incluso en condiciones subóptimas de luz y en respuesta al ácido abscísico (ABA). Por otro lado, encontramos que cumple roles tanto en la dormición primaria como en la dormición secundaria. . También fuimos capaces de demostrar que cumple funciones durante otros estadios del ciclo de vida de la planta, como son el establecimiento temprano de las plántulas en condiciones de estrés abiótico y la floración. Tanto la apertura de cotiledones como la aparición de hojas verdaderas en plántulas son reguladas negativamente por la sobreexpresión de *mRNA1*. Además, tienen un tiempo a floración retrasado respecto al genotipo salvaje Col-0. Destacamos especialmente que durante la germinación, las semillas *mRNA10X* son insensibles a la luz, más precisamente, a respuestas de reversibilidad al R/RL, tanto a nivel fisiológico como molecular. A nivel del SA, observamos que esta isoforma anula los cambios en los patrones de *splicing* de algunos genes aquí evaluados (*At-RS31*, *At-S30*, *At-U2AF65A* y *At-HAB1*) en respuesta a un Rp y un RLp. Globalmente, concluimos que la modificación de los patrones de SA de genes SR como *At-RS31* tiene un impacto relevante en la vida de *Arabidopsis thaliana*. Estas evidencias experimentales sugieren que modular /manipular el *splicing* alternativo podría alterar caracteres fisiológicos clave del desarrollo de una planta.

Palabras clave: semillas, germinación, dormición, luz, temperatura, *splicing* alternativo, *Arabidopsis thaliana*, post-maduración.

Physiological and molecular characterization of alternative splicing factors and their role in *Arabidopsis thaliana* seed germination.

Carla M. Cartagena

ABSTRACT

Environmental signals such as light and temperature modulate the gene expression of plants, affecting the transcriptome. Alternative splicing (AS) significantly modulates the transcriptome, and to some extent the proteome, during development and in response to environmental signals. The regulation of AS depends on the expression level and post-translational modification of serine/arginine-rich (SR) proteins and other splicing factors. Our research group demonstrated that when *Arabidopsis thaliana* seeds receive a pulse of red light (Rp), the AS pattern of 226 genes associated with mRNA processing, RNA splicing, and mRNA metabolic processes is altered. Among the genes whose expression (particularly their AS) is modulated by light is the splicing factor *At-RS31*. Interestingly, the regulation of AS events does not correlate with the intensity of the germination response but rather with light in a more direct manner, implying that AS is regulated upstream of the physiological response. This allows us to hypothesize that changes in AS could precede and form the basis for seed physiological responses (i.e., germination). In this thesis, we demonstrate that the overexpression of the coding isoform of *At-RS31* (*mRNA1*) promotes germination even under suboptimal light conditions and in response to abscisic acid (ABA). On the other hand, we found that it plays roles in both primary and secondary dormancy. We were also able to show that it functions during other stages of the plant's life cycle, such as early establishment of seedlings under abiotic stress conditions and flowering. Both cotyledon opening and true leaf emergence in seedlings are negatively regulated by *mRNA1* overexpression. Additionally, they exhibit a delayed flowering time compared to the wild-type Col-0 genotype. It is noteworthy that during germination, mRNA1OX seeds are insensitive to light, specifically to reversibility responses to R/RL, both at the physiological and molecular levels. Regarding AS, we observed that this isoform cancels out changes in the splicing patterns of some genes evaluated here (*At-RS31*, *At-S30*, *At-U2AF65A* and *At-HAB1*) in response to Rp and RLp. Overall, we conclude that modifying the AS patterns of SR genes such as *At-RS31* has a significant impact on the life of *Arabidopsis thaliana*. These experimental findings suggest that modulating/manipulating alternative splicing could alter key physiological traits in plant development.

Keywords: seeds, germination, dormancy, light, temperature, alternative splicing, *Arabidopsis thaliana*, after-ripening.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, gracias a mis padres y mi hermana por el apoyo y creer en mí desde el primer día de mi vida. Especialmente gracias a mamá por haberme enseñado a ser una mujer libre, independiente , a permitirme soñar hasta lo más inalcanzable. También por transmitirme el amor por la Naturaleza desde pequeña. A Romi por ser la persona que más me entiende en este mundo y su hermandad incondicional. A Facu por auxiliarnos en momentos difíciles y por sus palabras de aliento. A papá por cuidarme tantas madrugadas mientras esperaba el 28 y llevarme a la parada para tener menos viaje. Por los cafés durante la cursada virtual. A Kuki por haberme recibido con su alegría perruna por tantos años al volver de cursar.

A mis amigas por acompañarme en las buenas y en las malas también. A Fiammi por su cariño desde el primer día de secundaria, y a su familia por tratarme como una hija más. A Ivi por demostrarme que la distancia no interfiere para estar incondicionalmente acompañándome en absolutamente todas. A Lu, Cami, Belu y Gise por tantos años cursando juntas. Sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta acá. También gracias por la amistad que forjamos más allá de nuestros intereses compartidos por la Ciencia. Por el aguante indescriptible durante estos casi 8 años. Por levantarme en cada crisis. Por festejar mis logros como si fueran suyos. A Lu por ser mi primer amiga de la facu y presentarme a Cami y Gise. También por salvarme de elba lazo durante la cursada virtual. Por nuestra pasión compartida por las plantitas y complementación de puntos de vista. Por sus apuntes completísimos. A Cami especialmente este último tiempo por el co-working y por tener las palabras justas para no desistir. Por presentarme a los Bitis que me dieron ánimos en momentos muy bajones. A Gise también particularmente gracias por esas juntadas fugaces para ayudarme a distender y seguir dándome fuerzas. A Belu por los incontables viajes compartidos en los bondis, de Ciudad Universitaria al Oeste donde está el agite. Por prender velitas para los últimos finales y la entrega de la tesis. Soy muy afortunada de que todes ustedes estén en mi vida.

A Dami, por su sensibilidad, paciencia y amor infinitos. Por inspirarme con su talento en el arte. Por la apreciación mutua de que el Arte es una Ciencia y que la Ciencia es Arte. Por el regocijo de vernos crecer personal y profesionalmente, y acompañarnos en el camino. Este último tiempo especialmente por su hombro para la lloradita semanal, comiditas ricas y cafecito pa'l alma. Por facilitarme la vida. También a su familia y amigas. A Voldi por ser mi amuleto gatuno de la suerte mientras hago home office.

A Antonella, por auxiliarme con su profesionalidad en aquel momento donde solo veía oscuridad. Por darme las herramientas y la certeza de que podía superar mis obstáculos. También a Xuan, Lili y Jaz por guiarme en mi camino interno. Por tener los consejos justos y brindarme un espacio de contención.

A Lucía Garro, por ser tan excelente profesora de Biología en la secundaria e inspirarme a elegir este camino. A Carina Passow y Susana Millán por su vocación docente y prepararme tan bien para el CBC. A la mamá de Gonzalo que me contó sobre esta carrera de la cual no tenía ni idea y resultó ser todo lo que quería.

A Juan y su familia por apoyarme por tantos años. A todas las personas que me ayudaron con mis emprendimientos para poder seguir estudiando. A les que me ayudaron en este camino, por más pequeño que haya podido ser su aporte.

A la educación pública argentina. A la Universidad de Buenos Aires por abrirle las puertas a una conurbana proveniente de una familia de clase obrera y dejarle cumplir su mayor sueño de ser científica. A Exactas por ser la facultad más hermosa de todas y regalarme los amaneceres más increíbles. También por todas las personas increíbles que conocí ahí. A Gabriela Amodeo por guiarme en mis primeras decisiones en la biología molecular de plantas. A les chiques de Tecno, por enseñarme que la interdisciplinariedad es maravillosa.

También hay muuuuchísimo por agradecer en relación a mi etapa de tesista en el grupo Petrillo. A Petry, por creer en mí cuando yo sentía que no valía nada. Por abrirme las puertas al mundo de la investigación. Por su excelencia humana y sensibilidad. Por ayudarme a construir mi autoestima intelectual. Por su rol de padre putativo en el grupo. A Ro, por enseñarme a ser metódica, rigurosa y detallista al momento de hacer ciencia. Por permitirme maravillarme del mundo poco explorado de las semillas. Por confiarme el mundo de las semillas. A ambos por guiarme y enseñarme a dar lo mejor de mí en toda situación. Por brindarme absolutamente todo su conocimiento que es muy valioso. Gracias a les Petrys por ser una familia más que simplemente un grupo de trabajo. Por hacerme crecer profesionalmente, pero personalmente también. Por bancarme en los incontables momentos de frustración y siempre empujarme a seguir optimistamente. Por su calidad humana. Por darme la oportunidad de aportar con mi visión en sus trabajos. Por todas las personas del ámbito que me hicieron conocer. Gracias a Luki por las charlas en momentos de crisis existencial y por darme respuestas que no sabía que existían. Por hacerme pensar out of the box. Gracias a Florchi por su energía y dulzura, por subirme el ánimo siempre y por la enorme ayuda durante los días que yo no podía ir al labo. A ambos por guiarme en mis primeros pasos en la mesada. Por los regalitos que traen al labo. Gracias a Petry, Flor y Luki por la calidez inolvidable de aquella primera

semana, a pesar de que no nos pudimos ni saludar por la distancia social (¡qué bajón esos tiempos!).

Gracias a todo el segundo piso del IFIBYNE por las risas, comidas y anécdotas compartidas. Sin dudas son mi motor de felicidad mientras trabajo. Agradecimiento especial a Florchi, Luki, Flor, Euge, Lucho, Giuli, Clari, Fede, Cris y Lore por ayudarme taaaaantas horas sembrando semillas todo este último tiempo.

A toda la comunidad IFIBYNE por hacerme sentir cómoda desde el primer día que estuve en la góndola 2.9. A todo el personal del instituto que hace posible llevar adelante nuestras tareas.

A Daniela Capiati, Berta Pozzi y Romina Sellaro por su excelente predisposición, dedicación y tiempo para evaluar mi tesis.

A mis privilegios dados por mi contexto histórico, geográfico, socio-cultural y económico. También a todo lo que aprendí a los golpes por no tener otros.

A todas las mujeres y disidencias que palearon el camino. Mi compromiso por hacer de este mundo un lugar con más igualdad, dentro y fuera de la ciencia, es firme.

A la pequeña Carli por soñar en grande con ser científica y nunca perder la curiosidad ni la sensibilidad en apreciar la Naturaleza, especialmente las plantitas. (¡Lo logramos! ♥)

*Porque después de todo he comprendido
que lo que el árbol tiene de florido
vive de lo que tiene sepultado.*

Si para recobrar lo recobrado - Francisco Luis Bernárdez

ABREVIATURAS

A. thaliana: *Arabidopsis thaliana*

ABA: ácido abscísico

ABI: ABA insensitive

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNsn: ARN pequeños nucleares

Col-0: ecotipo Columbia 0

ESE: potenciador exónico de *splicing*

ESS: silenciador exónico de *splicing*

GAs: giberelinas

IS: índice de *splicing*

ISE: potenciador intrónico de *splicing*

ISS: silenciador intrónico de *splicing*

mRNA1: isoforma codificante de At-RS31

NMD: degradación mediada por codones de terminación prematuros

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pfr: Forma activa de los fitocromos que absorbe eficientemente luz rojo lejano

Pfr/P: relación entre la forma activa de los fitocromos y la cantidad total de cromoproteína

phy: PHY: Fitocromo

PIF/PIL: factor que interactúa con los fitocromos

Pr: Forma inactiva de los fitocromos que absorbe eficientemente luz roja

qPCR: PCR cuantitativa

RL: luz rojo lejano

RLp: Pulso de Rojo Lejano

R: luz roja

RI: retención de intrón

Rp: Pulso de Rojo

RNPhn: ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares

RNPsn: ribonucleoproteínas pequeñas nucleares

RT: Retrotranscripción

SA: *Splicing* Alternativo

SR/RS: Proteínas ricas en serina y arginina

UTR: región no traducida

5'SS: sitio 5' de *splicing* con secuencia AG (donor)

3'SS: sitio 3' de *splicing* con secuencia GU (aceptor)

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
La planta modelo.....	9
La semilla.....	10
La importancia de las semillas.....	10
La germinación.....	11
La dormición.....	12
La post-maduración y la salida de la dormición.....	13
La luz y la salida de la dormición.....	14
La temperatura y la salida de la dormición.....	16
El control hormonal de la dormición y la germinación.....	17
Integración de señales: hormonas y luz.....	21
El transcriptoma de las semillas.....	22
Semillas en estado de dormición.....	22
Semillas maduras secas.....	23
Semillas embebidas.....	23
Semillas en proceso de germinación.....	24
El splicing.....	24
El mecanismo de splicing.....	25
El splicing alternativo.....	27
El splicing alternativo en <i>A. thaliana</i>	28
Las proteínas SR.....	29
Factores de splicing que presentan splicing alternativo: el caso <i>At-RS31</i>	31
El splicing alternativo en las semillas de <i>A. thaliana</i>	31
• Componentes de la vía de señalización del ABA.....	32
• Componentes involucrados en la dormición.....	32
• Componentes de la vía de señalización por luz.....	32
• Factores relacionados al proceso de splicing.....	32
OBJETIVOS.....	34
HIPÓTESIS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Material genético utilizado.....	35
Condiciones de crecimiento de las plantas.....	35
Ensayos de germinación.....	35
Ensayos de post-maduración.....	36
Ensayos de reversibilidad R/RL.....	36
Ensayos de dormición secundaria.....	37
Establecimiento temprano de la plántula en condiciones de estrés por ABA.....	37

Ensayo de floración.....	38
Extracción y cuantificación del ARN.....	38
Síntesis del ADN copia (ADNc) a partir del ARN obtenido.....	39
Análisis de eventos de splicing alternativo y cuantificación de abundancia relativa de isoformas mediante PCR semi-cuantitativa.....	40
Análisis estadístico.....	42
RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	43
Rol de <i>At-RS31</i> durante la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz.....	43
(A) Respuestas de reversibilidad al R/RL.....	43
(B) Post-maduración en seco y salida de la dormición por luz y frío.....	44
(C) Post-maduración en seco y salida de la dormición por luz a 21°C.....	46
Rol de <i>At-RS31</i> en la entrada en dormición secundaria por incubación en oscuridad a temperatura constante.....	48
Rol de <i>At-RS31</i> en otros estadios del ciclo de vida.....	50
• Establecimiento temprano de la plántula en condiciones de estrés por ABA.....	50
• Tiempo a floración.....	54
Rol de <i>At-RS31</i> en el SA frente a respuestas de reversibilidad R/RL durante la germinación.....	56
DISCUSIÓN.....	67
Rol de <i>At-RS31</i> durante la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz en semillas de <i>A. thaliana</i>	67
Rol de <i>At-RS31</i> en otros estadios del ciclo de vida de <i>A. thaliana</i>	69
Rol de <i>At-RS31</i> en el SA de genes de interés en respuestas R/RL durante la germinación.....	70
El genotipo mRNA10X en retrospectiva.....	72
Reflexión final.....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

INTRODUCCIÓN

La planta modelo

Arabidopsis thaliana es una pequeña planta herbácea utilizada ampliamente como organismo modelo en el estudio de biología molecular. Descrita como *Pilosella siliquosa* en 1577 por Johannes Tal, fue luego renombrada en 1753 por Linnaeus "*Arabidopsis*" (del griego "parecida a *Arabis*", la primera planta que él describió) "*thaliana*" (en honor a su descubridor). Pertenece a la familia *Brassicaceae* que incluye también especies de interés agroeconómico como la lechuga, el rabanito, el berro y la mostaza (Al-Shehbaz and O'Kane, 2002). *A. thaliana* no es de importancia agronómica, pero es de fundamental relevancia en la mayoría de las investigaciones científicas relativas a plantas debido a lo simple que es su cultivo, a su tamaño, a su corto ciclo de vida (3 meses aproximadamente), a la facilidad con que se la puede transformar, a la gran capacidad de proliferación (cada planta tiene la capacidad de producir por autofecundación hasta 10.000 semillas (Meyerowitz, 1989)), y a que su genoma, de unas 125 Megabases (Mb), fue totalmente secuenciado en el año 2000 (AGI, Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Bevan & Walsh, 2005). Gracias a todo esto hoy contamos con un extenso conocimiento sobre sus 5 cromosomas. Posee más de 25000 genes, con un 35% de los mismos que son únicos (exclusivos) del género. Su uso como organismo modelo es tan extenso que ha permitido la generación de un vasto repertorio de mutantes y líneas transgénicas de acceso público (NAASC; ABRC, sin fecha). Esta información se encuentra bien desarrollada, curada y depositada junto con herramientas bioinformáticas que permiten su análisis en sitios web como TAIR (www.arabidopsis.org) o ARAPORT (www.araport.org). Más importante aún, *A.thaliana* se encuentra muy emparentada con las especies a las cuales modela, ya que todas las angiospermas comparten rasgos, haciendo de *A. thaliana* un excelente organismo modelo. Debido a todas estas características y ventajas, elegimos utilizar a *A. thaliana* como sistema de estudio para esta tesis en particular.

A. thaliana posee una inflorescencia racimosa con 4 sépalos verdes libres y 4 pétalos blancos, cada flor posee un pedicelo que puede alcanzar 1 cm de longitud sobre el cual se desarrolla su fruto dehiscente, la silicua. La silicua de *A. thaliana* posee un replum (tabique que separa dos lóculos dentro de la silicua) con tabicación completa y contiene 15-80 semillas distribuidas en ambos compartimentos. La semilla presenta un alto contenido oleoso, con hasta un 40 % de su peso seco siendo proteínas y lípidos. Posee una testa, o cubierta seminal, que le brinda protección, así como la mantiene deshidratada. Durante el desarrollo de la semilla podemos identificar 3 claros estadios: embriogénesis, maduración y maduración tardía (deseccación). Luego de la doble fertilización comienza la morfogénesis temprana. Mediante una serie de divisiones celulares el embrión (2n) adquiere la estructura básica de la planta y el endosperma se desarrolla, para ser luego reabsorbido en la maduración, este proceso es llamado embriogénesis. En la segunda etapa, las células embrionarias entran en un período de expansión en conjunto con la acumulación de sustancias de reserva. Este paso incluye la síntesis de compuestos carbonados y nitrogenados. Finalmente, en la última etapa, el embrión se vuelve metabólicamente quiescente y tolerante a la desecación (Baud et al., 2002).

La semilla

La importancia de las semillas

Las semillas representan la fase inicial en el ciclo de vida de las plantas. Son estructuras biológicas formadas por una cubierta protectora, un embrión y reservas de nutrientes. La aparición de semillas durante la evolución de las plantas dio lugar a la estrategia más compleja y exitosa de reproducción sexual en plantas vasculares. La primera planta con semillas surgió en el Devónico, hace 370 millones de años, de un grupo parafilético denominado progimnospermas (Longo et al., 2021). Estas estructuras son de gran relevancia a nivel biológico, ecológico y agronómico, principalmente por cuatro razones:

- En primer lugar, las semillas permiten la supervivencia en el período comprendido entre la maduración de la semilla y el establecimiento de la plántula. Tienen la capacidad de sentir el ambiente e inhibir la germinación en condiciones desfavorables a través del mecanismo de dormición. De esta forma, la dormición garantiza que la germinación ocurra en el momento y lugar adecuados, evitando que las plántulas se desarrollen en condiciones adversas que podrían perjudicar su supervivencia. Esto las vuelve fundamentales para asegurar el desarrollo de la próxima generación.
- En segundo lugar, las semillas son esenciales para colonizar el ambiente circundante (Longo et al., 2021). También habilita a las plantas a extenderse más allá de la planta madre. Esto es especialmente relevante luego de disturbios naturales o antropogénicos, como incendios, tala de árboles o eventos climáticos extremos. En este sentido, las semillas pueden germinar y dar lugar a nuevas plantas, iniciando así el proceso de recuperación del ecosistema. De esta forma, cumplen un rol primordial en la regeneración de las comunidades vegetales y la sucesión ecológica.
- En tercer lugar, son elementos vitales para preservar y promover la biodiversidad. Cada semilla alberga una combinación única de genes que determina las características de la planta que crecerá a partir de ella. La conservación de diferentes variedades de semillas contribuye a mantener la diversidad genética de los cultivos, lo que resulta crucial en la adaptación de las plantas a los cambios ambientales, como el calentamiento global y la evolución de nuevas plagas y enfermedades. La biodiversidad de semillas también desempeña un papel vital en la seguridad alimentaria, ya que proporciona recursos genéticos valiosos para la mejora de cultivos y la creación de variedades más resistentes y productivas.
- En cuarto lugar, representan una de las principales fuentes de alimento para diversos animales, incluso para los humanos (Longo et al., 2021). Son el punto de partida para la producción de alimentos. Los agricultores dependen de semillas de calidad para obtener cosechas abundantes y nutritivas. La elección de las semillas adecuadas puede marcar la diferencia en términos de rendimiento, resistencia a enfermedades y plagas, adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas y calidad nutricional de los cultivos. La disponibilidad de semillas de alta calidad y variedades adaptadas a diferentes regiones y sistemas agrícolas es esencial para garantizar la seguridad alimentaria a nivel local y global.

Las semillas se pueden clasificar en ortodoxas y recalcitrantes, según su capacidad de supervivencia ante condiciones adversas de almacenamiento y resistencia a la desecación. Las semillas recalcitrantes tienen una baja tolerancia a la desecación y no pueden sobrevivir a períodos prolongados de sequía, como por ejemplo las de árboles tropicales y algunas especies

frutales. Las semillas ortodoxas tienen una alta capacidad de tolerancia a la desecación y pueden sobrevivir en condiciones de almacenamiento a largo plazo. Son capaces de perder la mayor parte de su contenido de agua y entrar en un estado de dormición reversible, lo que les permite resistir temperaturas frías y permanecer viables durante largos períodos. Son comunes en muchas especies, entre las que se encuentra *A. thaliana*.

La germinación

La germinación de semillas es un paso crítico en el ciclo de vida de las plantas. Las semillas están relativamente bien protegidas contra condiciones ambientales adversas, mientras que las plántulas que emergen son mucho más vulnerables (Bewley et al., 2012). Por lo tanto, el momento adecuado para inducir la germinación es un rasgo importante en los cultivos y crucial para la supervivencia de las plantas en entornos naturales. *Sensu stricto*, la germinación incorpora todos aquellos eventos que comienzan con la imbibición de la semilla y terminan con la emergencia de la radícula y la elongación del eje embrionario (Rajjou et al., 2004). 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). 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.

La germinación sucede luego de la incorporación de agua. Este fenómeno responde a una curva trifásica (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 (Bentsink & Koornneef, 2008). El proceso de germinación se divide en tres fases (revisado en Bewley et al., 2013). Durante la fase I, la rápida absorción de agua (imbibición) conduce a la rehidratación celular asociada a la expresión de genes implicados en la maduración de la semilla y la tolerancia a la desecación, como las *Late Embryogenesis Abundant* (LEA), las pequeñas proteínas de choque térmico (sm *Heat Shock Proteins*) y las oxidorreductasas. Durante la fase II, la absorción de agua se estabiliza y la semilla experimenta procesos esenciales, como la reparación del ADN, el inicio de la transcripción y la traducción, la reparación mitocondrial, la respiración, el inicio de la movilización de nutrientes almacenados, la síntesis de ADN y la expansión celular. La fase III comienza con el evento germinativo (germinación *per se*), definido por la emergencia de la raíz embrionaria. Esta fase también incluye eventos post-germinativos como la finalización de la movilización de nutrientes, la división celular y el crecimiento de las plántulas. En *A. thaliana*, 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. 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.

Para germinar en el momento adecuado, las semillas necesitan percibir e integrar diversas señales ambientales para predecir con precisión la información estacional (Bewley, 1997). La luz, la

temperatura y el nitrato son los factores ambientales más importantes que influyen en el potencial de germinación. Estas señales ambientales actúan como *inputs* percibidos por las plantas y se convierten en señales internas que activan la interacción entre las fitohormonas, que a su vez regulan los procesos fisiológicos en las semillas (Seo et al., 2009). Para más detalle, dirigirse a las secciones “El control hormonal de la dormición y la germinación” y “Integración de señales: hormonas y luz”.

La dormición

La dormición de las semillas desempeñó un papel crucial en la evolución de las plantas con flor (Longo et al., 2021) y permite cronometrar el momento de la germinación en el entorno adecuado (estacional). Se define como la incapacidad (temporal) de una semilla viable para germinar aún en condiciones favorables para la germinación (Benech-Arnold et al., 2000). La dormición, por lo tanto, no es simplemente una inhibición de la germinación, sino que además les permite a las semillas retener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, resistiendo a condiciones adversas en un estado quiescente (Baskin & Baskin, 1998). Otro rol de la dormición sería el de extender el período en que ocurre la germinación en una población de semillas, de modo que no todos los descendientes de una planta germinen al mismo tiempo y/o espacio, evitando la competencia entre sí (Bewley et al., 2013, Postma et al., 2016). Además, impide la viviparidad, mecanismo por el cual ocurre la germinación de las semillas mientras están aún adheridas a la fruta, independientemente de si la fruta está unida o no a la planta (Longo et. al, 2021)

La dormición se ve afectada por diversas señales del entorno, entre los factores ambientales que la pueden regular se pueden mencionar a la luz, tanto su calidad como su intensidad y duración (fotoperíodo), la temperatura, la humedad (agua), los nutrientes, las condiciones de crecimiento de la planta madre y, sobre todo en el laboratorio, la duración del almacenamiento en seco de la semilla (Bewley, 1997, Bewley et al., 2013). Para más detalle, dirigirse a las secciones “La luz y la salida de la dormición”, “La temperatura y la salida de la dormición” y “La post-maduración y la salida de la dormición”.

Desde el punto de vista de los mecanismos que la determinan, existen diferentes tipos de dormición, incluidas la dormición física, la dormición morfológica, la dormición fisiológica y la dormición combinada (Baskin & Baskin, 2004; Bewley et al., 2013; Finch-Savage & Leubner-Metzger; 2006, Nikolaeva, 1977). En ciertos tipos de dormición física, las semillas tienen una cubierta dura e impermeable que debe debilitarse primero (por ejemplo, por los ácidos que se encuentran en el tracto digestivo de un animal) antes de que puedan absorber el agua e iniciar la germinación. La dormición morfológica se origina en un embrión subdesarrollado, y el embrión requiere tiempo o un desencadenante para completar el desarrollo, después del cual puede ocurrir la germinación. En la llamada dormición fisiológica, la represión de la germinación de la semilla sobre la imbibición de la semilla es mantenida por tejidos vivos, es decir, el embrión y el tejido circundante, el endosperma. También puede ocurrir una combinación de estos diferentes tipos de dormición, por ejemplo, dormición morfofisiológica.

Nuestra planta modelo, *A. thaliana*, presenta dormición fisiológica (K. P. Lee et al., 2010), que puede ser primaria o secundaria. La dormición primaria se establece durante el desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre e implica la producción de ABA por el endosperma y

el embrión tras la imbibición de la semilla, mientras que el catabolismo del ABA se reduce y la sensibilidad a esta hormona aumenta, en comparación con las semillas dormidas (Ali-Rachedi et al., 2004; Chahtane et al., 2017; K. P. Lee et al., 2010; Millar et al., 2006; Nonogaki, 2019). El nivel de dormición primaria está determinado en gran medida por los antecedentes genéticos de la planta (Alonso-Blanco et al., 2003; Clerckx et al., 2004). También influyen aspectos metabólicos (estado hormonal de la semilla, flujo de hormonas desde la planta madre) y factores ambientales (factores edáficos, temperatura y luz; Bewley & Black, 1994). Estos dos últimos merecen sus propias secciones que se encuentran más adelante: “La luz y la salida de la dormición” y “La temperatura y la salida de la dormición”

La salida de la dormición depende de la interacción de factores endógenos (morfológicos, hormonales o metabólicos) y factores exógenos o ambientales (humedad, luz, temperatura, entre otros). La dormición puede ser culminada por factores promotores de la germinación como son la “post-maduración”, que se define como el almacenamiento en seco de las semillas (este concepto se detalla en la siguiente sección “La post-maduración y la salida de la dormición”), la luz y los tratamientos de frío (estratificación) (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bewley et al., 2013; Baskin & Baskin, 2014). El tratamiento con ciertos compuestos, como nitrato o karrikinas (presentes en el humo), también pueden disminuir la dormición. Estos tratamientos tienen en común que actúan sobre los niveles hormonales de giberelinas (GA, promueven la germinación) o ABA (impone dormición) o sus vías de señalización (Chahtane et al., 2017). Para más detalle, ir a la sección “El control hormonal de la dormición y la germinación”.

La dormición secundaria se define como la pérdida de la capacidad para germinar de una semilla viable cuya dormición primaria ha sido eliminada previamente. Se desarrolla en semillas maduras una vez dispersadas por una pérdida de la sensibilidad a los factores que rompen la dormición o que inducen la germinación (Footitt et al., 2011). Se caracteriza por una incapacidad de germinar debido a un entorno adverso, como puede suceder en ambientes deficientes en oxígeno (Côme & Thevenot, 1982), con temperaturas elevadas (Cone & Spruit, 1983; Derckx et al., 1993; Hilhorst, 1990), o bien como respuesta a diferentes situaciones de estrés (Bewley, 1997). Además, se sabe que los antecedentes genéticos de las semillas controlan la inducción de dormición secundaria (Penfield & Springthorpe, 2012; Postma et al., 2016). Los genotipos que desarrollan altos niveles de dormición primaria durante la maduración también desarrollan niveles de dormición secundaria más altos tras la reinducción de la dormición (Buijs et al., 2020). La represión de la germinación en semillas en estado de dormición secundaria es poco conocida, pero lo más probable es que implique la síntesis de ABA *de novo* en *A. thaliana* (Footitt et al., 2011). Sin embargo, podrían estar involucrados otros mecanismos específicos de detención de la germinación, ya que los procesos subyacentes a la dormición secundaria siguen sin estar claros.

La post-maduración y la salida de la dormición.

El nivel de dormición de las semillas aumenta durante la maduración de las mismas y alcanza un máximo en las semillas maduras cosechadas (Karssen et al., 1983; Ooms et al., 1993). La dormición fisiológica es abundante en el banco de semillas del suelo, y su salida se rige principalmente por la post-maduración. Este proceso ocurre cuando una semilla pierde gradualmente la dormición a través de un período de almacenamiento en seco. Por lo tanto, la post-maduración determina el grado de dormición y, en consecuencia, afecta el rendimiento del

cultivo en el campo (Buijs et al., 2020; Chahtane et al., 2017; Iglesias-Fernández & Matilla, 2009). La post-maduración también se puede considerar como una ampliación de la ventana de germinación, lo que permite que las semillas germinen en condiciones que inhiben la germinación de las semillas recién cosechadas (Finch-Savage & Leubner-Metzger 2006; Soppe & Bentsink, 2020). Está influenciada por las condiciones ambientales experimentadas por la planta madre durante el desarrollo de la semilla (Donohue et al., 2005). El tiempo de almacenamiento en seco requerido para la salida de la dormición es específica para cada especie e incluso para distintas accesiones. Para *A. thaliana*, en los ecotipos Col-0 y Cvi, varía de uno a seis meses, respectivamente (Schmuths et al., 2006).

Durante el desarrollo de la semilla de *A. thaliana*, los ARNm se acumulan progresivamente y algunos de ellos permanecen en el estado de semilla seca (ver sección “El transcriptoma de las semillas”), donde se traducen específicamente en respuesta a las condiciones ambientales (Finch-Savage et al., 2007; Galland et al., 2014; Sano et al., 2012). Los mecanismos moleculares que controlan la longevidad del ARNm almacenado y su traducción específica durante la imbibición de la semilla son desconocidos.

La luz y la salida de la dormición.

La luz es un factor ambiental clave que afecta múltiples aspectos de la vida de las plantas. Ellas pueden responder a la luz utilizando un conjunto único de proteínas llamadas fotorreceptores. *A. thaliana* posee los siguientes fotorreceptores: (1) el locus 8 de resistencia UV (UVR8) absorbe el ultravioleta B (Jenkins, 2014); (2) las fototropinas (Christie, 2007), los criptocromos (Yu et al., 2010) y los receptores tipo ZEITLUPE (Kim et al., 2007) son responsables de la percepción del azul/UV-A; y (3) los fitocromos (phy) absorben luz roja (R) y roja lejana (RL) (Bae & Choi, 2008; Franklin & Quail, 2010).

En esta planta modelo, la terminación de la dormición por luz es mediada por los fitocromos. Estos fotorreceptores son proteínas fotorreversibles que tienen la capacidad de interconvertirse en dos isómeros estables: la forma que absorbe eficientemente luz roja (R) $P_r = \lambda_{\text{máx}} 660 \text{ nm}$ y la que absorbe eficientemente luz roja lejana (RL) $P_{fr} = \lambda_{\text{máx}} 730 \text{ nm}$ (Fankhauser & Chory, 1997; Quail et al., 1995). Sin embargo, es importante notar que existe un solapamiento entre los espectros de absorción de ambas formas (Fig. 1). Esto implica que cuando un tejido vegetal es expuesto a la luz, se establece un fotoequilibrio dinámico entre P_{fr} y P_r . De esta forma, dependiendo de las condiciones de luz, se establece una determinada relación de P_{fr}/P (P = cantidad total de fitocromo). Entonces, en luz R la relación P_{fr}/R es alta, y en luz RL es baja. Los fitocromos son sintetizados en su forma P_r , mediante una reacción autocatalítica que se produce al unirse, en el citoplasma, la apoproteína y el grupo cromóforo (Lagarias & Lagarias, 1989). La forma P_r posee localización citoplásmica, y cuando absorbe luz y se convierte a la forma P_{fr} se transloca al núcleo (Nagy et al., 2001) donde interviene en la señalización por luz al interactuar con muchos factores de transcripción (Li et al., 2011). Incluso, pueden localizarse en estructuras específicas subnucleares llamadas *photobodies* (PBs) o *speckles* inducidos por luz (Kircher et al., 2002; Klose et al., 2015; Yamaguchi et al., 1999). El P_{fr} puede destruirse (Marmé et al., 1971) o convertirse en P_r mediante una reacción independiente de la luz (Kendrick et al., 1971), conocida como reversión en oscuridad o reversión térmica (Mancinelli, 1994; Rockwell and Lagarias, 2006). Además, P_{fr} se convierte rápidamente en P_r por la luz RL por medio del proceso de fotorreversión.

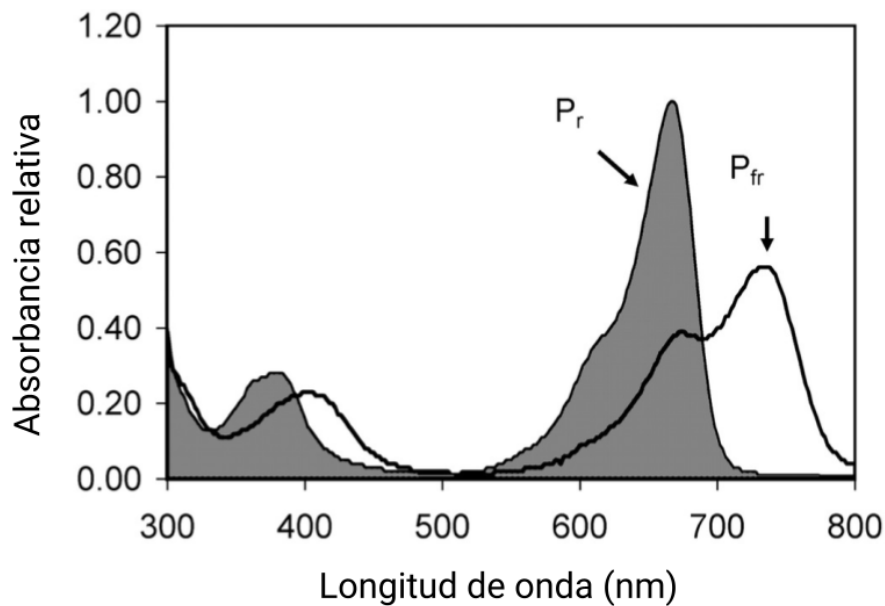


Figura 1: Espectro de absorción relativa de las formas Pr y Pfr del fitocromo para longitudes de onda comprendidas entre 300 a 800 nm. A pesar de que Pr tiene un $\lambda_{max} = 660$ nm y Pfr $\lambda_{max} = 730$ nm, hay un solapamiento significativo en los espectros relativos de absorbancia de ambos. Como resultado de las diferencias relativas en absorción y el subsecuente cambio conformacional entre Pr y Pfr, ambas formas están presentes en la planta. Adaptado de Stutte, 2009.

En *A. thaliana* existen 5 fitocromos, llamados phyA-phyE. phyB es el principal fotorreceptor que media las respuestas del tipo R/RL reversibles durante la germinación (Shinomura et al., 1994; Botto et al., 1995), mientras que phyE contribuye en esta regulación en semillas doble mutantes *phyAphyB* (Hennig et al., 2002) sugiriendo la existencia de una redundancia en las funciones de los fitocromos durante el control de la germinación por luz R. En algunas condiciones, el phyA es el principal fotorreceptor involucrado en la promoción de la germinación por luz RL (Botto et al., 1996; Shinomura et al., 1996), y phyE y phyD pueden contribuir a esta respuesta en ausencia de phyA (Arana et al., 2014; Hennig et al., 2002). Los distintos fitocromos pueden tener funciones discretas o solapadas en las semillas. Las respuestas a la luz de las semillas son mediadas por diferentes fitocromos. La acción de los fitocromos puede ser distinguida sobre la base de la cantidad, calidad y duración del tratamiento lumínico necesario para inducir la respuesta. La cantidad de luz puede ser referida como flujo de luz, el cual es definido como el número de fotones incidentes por unidad de superficie, usualmente cuantificado como micromoles de fotones por metro cuadrado ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$). En términos fotobiológicos, se han identificado tres modos de acción para los fitocromos. Las respuestas de baja fluencia (LFR, del inglés "Low Fluence Response") son respuestas reversibles R/RL típicas mediadas casi exclusivamente por phyB-E. Las respuestas de muy baja fluencia (VLFR, del inglés "Very Low Fluence Response") son provocadas por cantidades extremadamente bajas de luz, mediadas por phyA y no fotorreversibles, mientras que las respuestas de alta irradiancia (HIR, del inglés "High Irradiance Response") producidas por una exposición prolongada a luz de alta intensidad pueden ser mediadas por phyA o phyB (Casal & Sánchez, 1998; Nagy et al., 2001). Altas irradiancias disparan la HIR en semillas de varias especies pero no en *A. thaliana*. La respuesta al Rp moderado puede ser invertida con un pulso de rojo lejano (RLp) (Mancinelli, 1994). Esta es una respuesta R/RL reversible por lo que la magnitud de la reversión de respuesta del efecto del R disminuye a medida que aumenta el intervalo de tiempo entre el pulso de luz R y RL (Casal et al., 1998). Esta propiedad de interconversión de los

fitocromos permite que estos fotorreceptores funcionen como interruptores moleculares dependientes de R/RL.

La temperatura y la salida de la dormición.

Entre los factores ambientales que controlan la salida de la dormición, la temperatura tiene un rol muy importante (Probert, 1992). Las semillas son capaces de percibir las señales ambientales vinculadas a cambios estacionales lentos (principalmente la temperatura; Probert, 2000) lo que les permite determinar el tiempo del año y la profundidad del suelo a la que se encuentran (W. Finch-Savage & Footitt, 2017). Para comprender la influencia de la temperatura en la dormición y germinación de las semillas, primero es importante entender el ciclo de vida de *A. thaliana*. Generalmente presenta un ciclo de vida anual de invierno, germinando en otoño y floreciendo en primavera. Sin embargo, también se observaron germinaciones en primavera, incluso en poblaciones que parecen estar dominadas por plantas anuales de invierno (Donohue, 2009; Griffith et al., 2004). La floración que ocurre en otoño (Donohue, 2009; Thompson, 1994) puede contribuir a una historia de vida de ciclos rápidos. Por lo tanto, la floración puede ocurrir durante las condiciones frescas de finales de otoño o principios de primavera. O también durante las cálidas condiciones entre mediados y finales de primavera o principio de otoño. En muchos lugares a lo largo de su rango natural e introducido, *A. thaliana* experimenta sequías de verano y temperaturas altas. De todas formas, esto tiene efectos fuertemente deletéreos sobre la supervivencia (Donohue et al., 2005). Por lo tanto, si bien puede adaptarse a estas situaciones adversas, no se puede asegurar que la descendencia pueda perpetuarse en el tiempo con semillas de calidad.

Las condiciones de maduración de las semillas, determinadas por la época de floración y fructificación, influyen en el nivel de dormición primaria que se induce en las semillas (revisado en Gutterman, 1992; Donohue y Schmitt, 1998; Donohue, 2009). En *A. thaliana*, las bajas temperaturas durante la maduración de la semilla inducen una dormición primaria fuerte (Chiang et al., 2011; Donohue et al., 2007; Kendall & Penfield, 2012; Penfield & Springthorpe, 2012) y se pierde gradualmente durante la post-maduración. Como resultado, sus semillas no pueden germinar en condiciones efímeramente frías de primavera cuando las semillas se desprenden por primera vez, ni en temperaturas más cálidas. Para cuando llega el otoño, la post-maduración permite la germinación en temperaturas más frescas. Durante ese tiempo, la dormición impidió la germinación hasta después del riesgo de sequía estival. Esto es determinante para su *fitness*, ya que se demostró que el tiempo de germinación está bajo una selección natural extremadamente fuerte (revisado en Donohue et al., 2010). Como tal, la temperatura de maduración de la semilla brinda información sobre el momento estacional; las semillas maduras en condiciones frías pueden experimentar temperaturas frías antes del verano, mientras que las semillas que maduran bajo temperaturas más cálidas experimentarán temperaturas frías solo después de que haya pasado el verano (Auge et al., 2015).

Experimentalmente, la dormición primaria se puede romper mediante varios tratamientos en semillas embebidas. Un método común es la estratificación de semillas, donde las semillas embebidas se exponen a bajas temperaturas durante un período de tiempo antes de la incubación a temperaturas normales (por ejemplo, Buijs et al., 2018). No obstante, las semillas pueden ser inducidas a una dormición secundaria si experimentan condiciones o señales de condiciones desfavorables en el futuro, luego de que se rompe la dormición primaria. La dormición secundaria

puede ser inducida por factores ambientales específicos, como la humedad y la temperatura, que varían según la estación. En *A. thaliana*, la exposición a incubación húmeda a diferentes temperaturas en oscuridad puede inducir una dormición secundaria de sus semillas: puede ser inducida por imbibición a alta temperatura (Auge et al., 2015; Donohue et al., 2007; W. Finch-Savage & Footitt, 2017; Ibarra et al., 2016; Penfield & Springthorpe, 2012) o imbibición prolongada a bajas temperaturas (de Casas et al., 2012; Debieu et al., 2013; Penfield & Springthorpe, 2012). También se puede estudiar en experimentos a campo que imitan el ciclo natural de la dormición (Buijs et al., 2020; Footitt et al., 2011; Postma et al., 2016). Luego de la post-maduración, cuando las semillas pierden la dormición, se entierran en el campo, la dormición secundaria se induce durante el otoño y el invierno, y se rompe en primavera (Buijs et al., 2020; Footitt et al., 2011).

El control hormonal de la dormición y la germinación.

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 sustanciales modulados y coordinados por hormonas. En este marco, el estado endógeno de las semillas reflejado por su escenario hormonal, afecta sustancialmente el tipo de respuesta disparada por acción de la luz (Neff et al., 2006). Se han reportado varias hormonas capaces de regular la división y expansión celular que acompaña el crecimiento. Las hormonas son producidas por las células y ejercen sus funciones a muy bajas concentraciones. Hasta el momento se identificaron nueve tipos de fitohormonas, entre las cuales se encuentran las auxinas, las primeras descubiertas (Darwin and Darwin, 1880), el ácido salicílico (AS), el etileno (ET), las citoquininas (CKs), las giberelinas (GAs), los brasinoesteroides (BRs), el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA), y las estrigolactonas (SLs), las últimas fitohormonas descubiertas (Gomez-Roldan et al., 2008).

La dormición y la germinación de las semillas son dos procesos finamente regulados por varias fitohormonas. De hecho, aunque el ABA y las GAs desempeñan el papel principal, se ha demostrado que las siete restantes también contribuyen a estos procesos (Carrera-Castaño et al., 2020; Linkies & Leubner-Metzger, 2012; Liu et al., 2007; Longo et al., 2021; Miransari & Smith, 2014; Riefler et al., 2006; Shu et al., 2016) e interaccionan de manera compleja (Fig. 2).

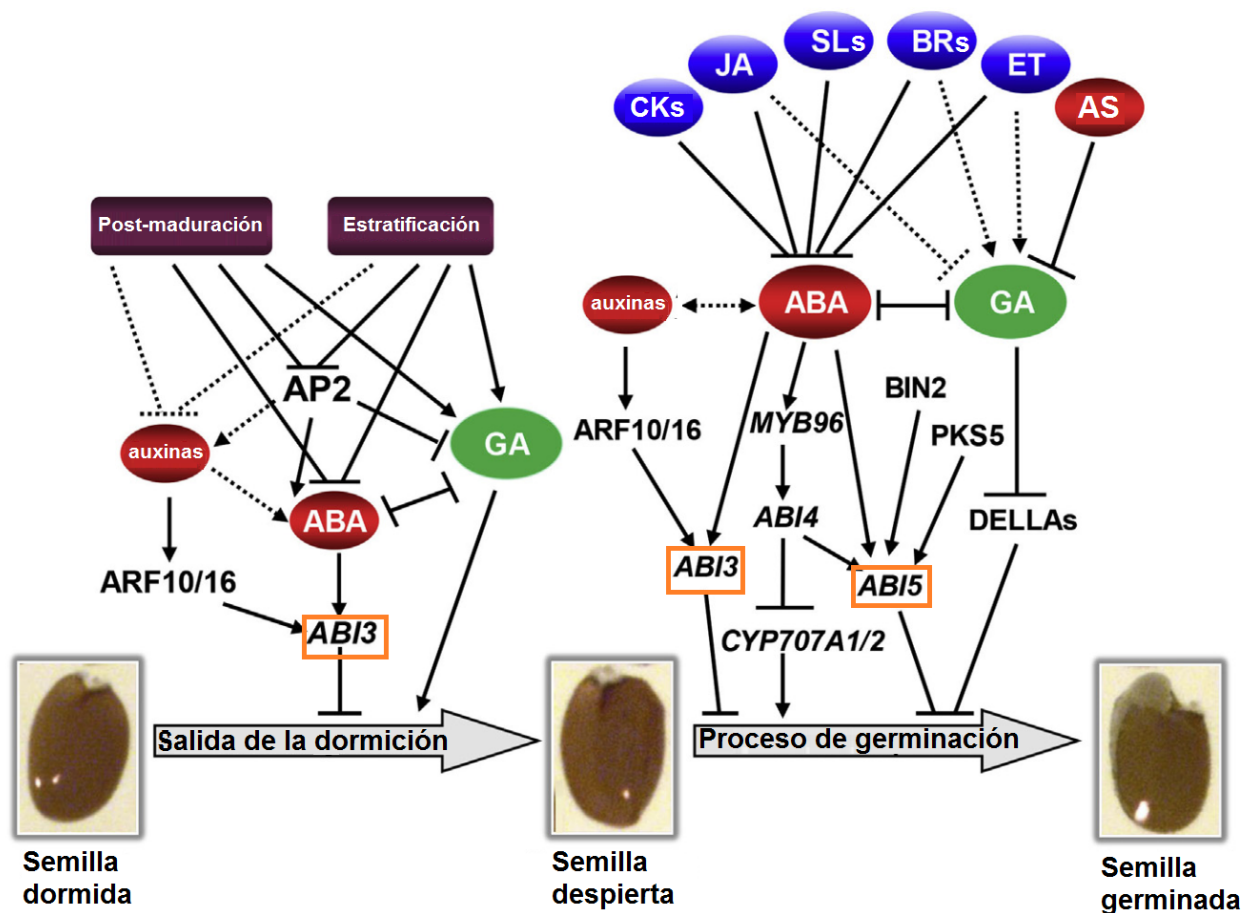


Figura 2. Red de interacciones entre las vías de las fitohormonas, en la dormición y la germinación de las semillas. Las líneas completas indican interacciones reportadas y las líneas punteadas indican sugerencias a partir de bibliografía. Las flechas indican regulación positiva y las barras indican regulación negativa. En este trabajo se hará énfasis en los componentes recuadrados. Modificado de Shu et al., 2016.

Las principales reguladoras

Se reconoce ampliamente que el ABA y las GA son las principales hormonas que regulan de forma antagónica la dormición y la germinación de las semillas (Finkelstein et al., 2008; Graeber et al., 2012; Gubler et al., 2005; H. G. Lee et al., 2015). Una alta concentración de ABA se asocia a la dormición y una alta concentración de GAs se asocia con la germinación, mientras que la transición entre los estadios se regula con el cambio de concentración para ambas hormonas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El correcto balance entre ambas es clave para que semillas como las de *A. thaliana* puedan germinar (Fig. 3).

(A) Ácido Abscísico.

Los niveles de ABA aumentan progresivamente desde la embriogénesis hasta la maduración del embrión (Karszen et al., 1983). Esta hormona vegetal restringe el potencial de crecimiento del embrión al inhibir la absorción de agua (imbibición) y, por lo tanto, el ablandamiento de la pared celular, que es un paso clave para iniciar la germinación (Gimeno-Gilles et al., 2009; Schopfer & Plachy, 1985). En contraste, antes del inicio del proceso de germinación, el nivel del ABA endógeno

en la semilla disminuye, mientras que el contenido de GAs se incrementa con los tratamientos de imbibición y estratificación (Shu et al., 2016).

El primer precursor de ABA es la zeaxantina, a partir de la cual se genera anteraxantina y trans-violaxantina, estos últimos son convertidos a su vez en compuestos de 40 carbonos que una vez cortados forman compuestos de 15 carbonos y 25 carbonos. 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) formándose 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. Normalmente el ABA es convertido en un compuesto hormonalmente inactivo e inestable mediante la intervención de ABA 8'-Hidroxilasa. Esta enzima pertenece a una familia de cuatro miembros, Las monooxigenasas CYP707A1-4 (Finkelstein, 2013; Nambara & Marion-Poll, 2005). Los genes *NCED6* y *NCED9* son esenciales para la síntesis de ABA tanto en el embrión como en el endosperma de las semillas de *A. thaliana*. La pérdida de función de ambos resulta en la reducción de la dormición (Lefebvre et al., 2006), mientras que la mutación del gen *CYP707A2* disminuye el potencial de germinación (Kushiro et al., 2004; Millar et al., 2006; Okamoto et al., 2006).

En la percepción y señalización temprana del ABA, hay involucrados tres componentes clave: los receptores del ABA denominados PYRABACTIN RESISTANCE (PYR)/PYR-LIKE (PYL)/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (RCAR), las proteínas kinasas SnRK2 (SNF1(SUCROSE NON-FERMENTING 1)-RELATED PROTEIN KINASE 2) que son reguladores positivos de la vía y las fosfatasas PP2Cs (TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES) como reguladores negativos. Los receptores unidos al ABA pueden unirse e inhibir las PP2C que, a su vez, permiten la fosforilación y activación de las SnRK2 (Cutler et al., 2010; Finkelstein, 2013; Hubbard et al., 2010; Raghavendra et al., 2010). Los SnRK2 activados fosforilan blancos que se encuentran río abajo en la vía de señalización, como ABA INSENSITIVE 5 (ABI5), para activar la respuesta ABA en las plantas (Finkelstein, 2013). Los factores de transcripción ABI3 (ABA INSENSITIVE 3) y ABI5 son altamente inducidos por ABA y modulan positivamente las respuestas de ABA para reprimir la germinación de semillas (Finkelstein, 1994; Lopez-Molina et al., 2001; Brocard et al., 2002; Finkelstein et al., 2005), sugiriendo que existen distintos mecanismos de promoción de la dormición e inhibición de la germinación mediada por ABA. Río arriba de ABI5 se encuentra ABI3, que es el principal regulador de la germinación y dormición en la vía del ABA (Bentsink & Koornneef, 2008) y es un regulador positivo de la expresión de ABI5 durante la germinación, lo que inhibe esta respuesta fisiológica (Bossi et al., 2009; Lopez-Molina et al., 2002). ABI3 y/o ABI5 interactúan físicamente con varios reguladores clave para integrar múltiples vías de señalización durante la germinación de semillas.

(B) Giberelinas.

GA es otra fitohormona clave que controla la germinación de las semillas, y es el antagonismo entre GA y ABA el factor decisivo en la regulación de la germinación de las semillas. La aplicación exógena de GAs puede ayudar a las semillas a romper la dormición, mientras que la aplicación del inhibidor de la síntesis de GA paclobutrazol (PAC) puede inhibir la germinación de las semillas (Shu et al., 2016). Las giberelinas estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que actúan en la región micropilar y atenúan las barreras que impiden el crecimiento del embrión (Bewley & Black, 1994; Holdsworth et al., 2008). Las semillas de líneas mutantes

deficientes en GAs, como *ga1* y *ga2*, muestran altos niveles de dormición y no son capaces de germinar sin agregado exógeno de GAs (S. Lee et al., 2002a; Shu et al., 2016).

La biosíntesis de giberelinas se inicia con la modificación enzimática del precursor Geranylgeranyl difosfato hasta conseguir GA₄ (forma biológicamente activa) (Hedden & Phillips, 2000), mediante reacciones catalizadas por oxidasas (Claeys et al., 2014; Vishal & Kumar, 2018). En particular, durante la germinación se destacan las oxidasas GA3ox1 y GA3ox2 en la biosíntesis y GA2ox2 en el catabolismo de GAs (Mitchum et al., 2006; Yamauchi et al., 2004, 2007). Los niveles endógenos de GA dependen de una auto-regulación transcripcional donde altos niveles de GA inhiben la expresión de genes que codifican para *GA200X* y *GA30X* y promueven, a su vez, la expresión de *GA20X* (Weiss et al., 2007). Las semillas de líneas mutantes deficientes en GA2ox's muestran bajos niveles de dormición (Yamauchi et al., 2007).

Dentro de las vías de transducción de señales de giberelinas, existen tres componentes principales involucrados: las proteínas GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), GID2 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2) y DELLA (aspartic acid (D)-glutamic acid(E)-leucine (L)-leucine (L)-alanine(A)). Los receptores de GAs GID1 y las proteínas F-box que participan en degradación por proteasoma, GID2, actúan como reguladores positivos de la vía de las GAs (Fu et al., 2004; McGinnis et al., 2003; Strader et al., 2004). En cambio, las DELLA son reguladores negativos debido a su interacción con varios reguladores transcripcionales (Davière & Achard, 2016; la Rosa et al., 2014; Locascio et al., 2013; Peng et al., 1997; Sarnowska et al., 2013; Silverstone et al., 1998; Yoshida & Ueguchi-Tanaka, 2014). La presencia de GAs gatilla la interacción de su receptor GID1 con las DELLAs mediante su dominio N-terminal (dominio DELLA) y la formación de un complejo de ubiquitinación vía interacción con GID2. Esta interacción induce la degradación mediada por proteasoma de las DELLAS (Davière & Achard, 2013, 2016; Nelson & Steber, 2016; Vera-Sirera et al., 2016). En *A. thaliana* hay 5 DELLAs, de las cuales RGL2 (REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)-LIKE2) tiene presencia preponderante en la regulación de la germinación, dado que la mutación en *RGL2* puede rescatar el fenotipo de no-germinación de *ga1* (S. Lee et al., 2002b; Tyler et al., 2004).

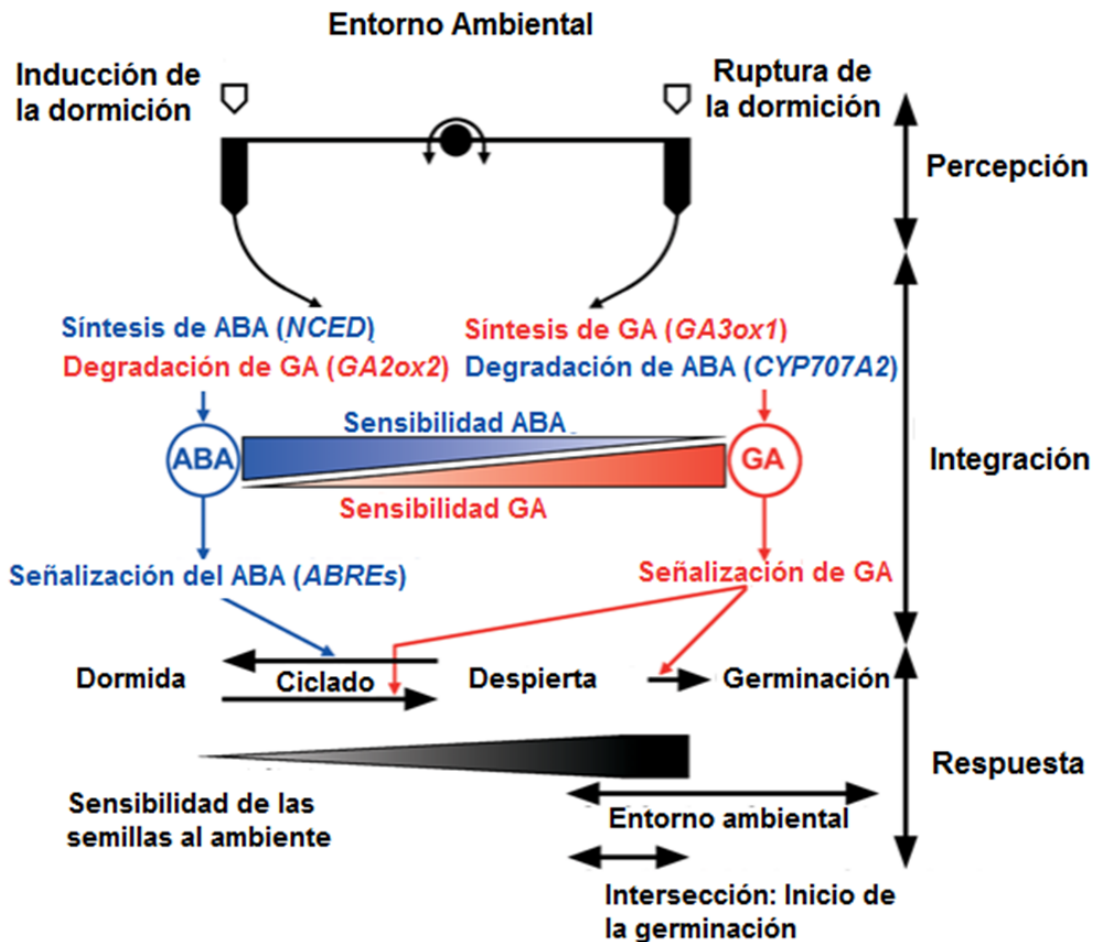


Figura 3: Modelo para la regulación de la dormición y la germinación mediante el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) en respuesta al entorno. Según este modelo, los factores ambientales circundantes (por ejemplo, la temperatura) afectan al equilibrio ABA/GAs y a la sensibilidad a estas hormonas. La síntesis y señalización del ABA (y el catabolismo de GAs) predominan en el estado de dormición, mientras que la síntesis y señalización de GAs (y el catabolismo de ABA) predominan en la transición a la germinación. La compleja interacción entre la síntesis, degradación y sensibilidad de las hormonas en respuesta a las condiciones ambientales puede dar lugar a ciclos de dormición. Los cambios en el nivel de dormición alteran los requisitos para la germinación (sensibilidad al entorno de germinación); cuando estos se superponen con cambios en las condiciones ambientales, la germinación se llevará a cabo por completo. Modificado de W. E. Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006

Integración de señales: hormonas y luz.

Como se mencionó previamente, 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 se han identificado los factores que conectan ambas vías. Estos integradores se han definido como PIFs (Phytochrome Interacting Factors). Los PIFs representan componentes centrales que regulan la respuesta a la luz mediante la acción de los fitocromos. La germinación

está regulada por PIF1/PIL5 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 1). En oscuridad, PIF1/PIL5 y una plétora de factores de transcripción reprimen la germinación de la semilla al reducir el contenido de GAs y promover la acumulación del ABA en semillas embebidas (Oh et al., 2006, 2007). En luz, las formas activas Pfr de phyA y phyB se translocan al núcleo y degradan la proteína PIF1 a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Oh et al., 2004), iniciando una gran alteración en el patrón de expresión génica y, directa o indirectamente, afectando la respuesta al ABA y las GAs. Los bajos niveles de PIF1/PIL5 reducen los niveles de GAI y RGA y aumentan los niveles de GA y disminuyen los de ABA. Como resultado se inician varios procesos fisiológicos, entre ellos, la movilización de moléculas de almacenamiento y la hidrólisis de la pared celular, por lo que las semillas eventualmente germinarán (Xu et al., 2020)

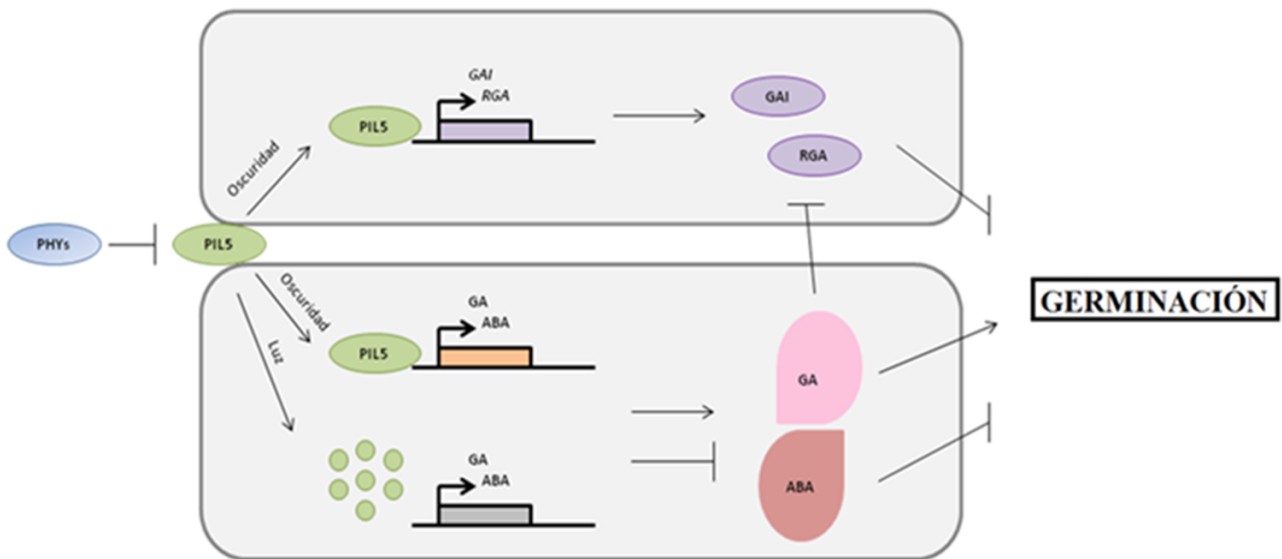


Figura 4. Modelo de los eventos que conducen a la germinación en semillas de *A. thaliana*. En oscuridad, PIF1/PIL5 activa la expresión de varios genes, entre ellos *GAI* y *RGA*, uniéndose directamente a sus promotores por medio de los G-box. Esto resulta en niveles elevados de sus proteínas. La disminución de los niveles de GA estabiliza a las DELLAs, lo que suprime las respuestas de las GAs. A la luz, los fitocromos inducen la degradación de PIF1/PIL5, resultando en niveles proteicos reducidos de *GAI*, *RGA* y ABA. Como resultado se inician varios procesos fisiológicos, entre ellos, la movilización de moléculas de almacenamiento y la hidrólisis de la pared celular, por lo que las semillas eventualmente germinarán. Modificado de Tesis Doctoral de Rocío Tognacca, 2018.

El transcriptoma de las semillas.

Semillas en estado de dormición

La semilla es una estructura autónoma en la que un embrión completamente desarrollado se dispersa en el ambiente, permitiendo el establecimiento de un organismo autótrofo, la nueva planta. En *A. thaliana*, el desarrollo de la semilla se divide en dos fases principales: el desarrollo del embrión y del endosperma (o morfogénesis), y la maduración (West & Harada, 1993). Una vez que se completa la embriogénesis, las semillas entran en la fase de maduración. Los ARNm se

acumulan progresivamente y algunos de ellos permanecen en el estado de semilla seca, donde se traducen específicamente según las condiciones ambientales (Finch-Savage et al., 2007; Galland et al., 2014). Un estudio de Cadman et al., 2006 comparó los cambios del transcriptoma durante la dormición primaria, la ruptura de la dormición primaria y la inducción de la dormición secundaria, y encontró que los estados de dormición primaria y secundaria tenían una sobrerrepresentación de genes sensibles al ABA. Esto es coherente con el hecho de que el ABA promueve la dormición e inhibe la germinación.

Semillas maduras secas

Luego de que se acumulan los compuestos de almacenamiento y los ARNm, las semillas se vuelven tolerantes a la desecación (Maia et al., 2011, 2014). La presencia de ARNm almacenados en semillas secas se descubrió hace 50 años (Dure & Waters, 1965), y hasta el momento se han detectado en un gran número de especies de semillas, entre las cuales se encuentra *A. thaliana* (Bazin et al., 2011; Kimura & Nambara, 2010; Nakabayashi et al., 2005). En las semillas secas de *A. thaliana*, los ARNm almacenados se transcriben durante la maduración de la semilla y se traducen en la germinación temprana, asociados a un único ribosoma (monosomas) (Buijs et al., 2020). Un análisis de perfiles de expresión génica usando Affymetrix mostró que las semillas secas maduras de *A. thaliana* contienen más de 12.000 ARNm diferentes almacenados (Nakabayashi et al., 2005) [98,101] y se estima que no todos estos ARNm almacenados son necesarios para la germinación de semillas y que un gran número de éstos podrían ser genes de expresión ubicua (de mantenimiento o *house-keeping genes*). Dado que el ABA y las GAs controlan la dormición y la germinación de manera antagónica no es de extrañar que, entre los ARNm almacenados en semillas secas más representados, se encuentren transcritos de genes relacionados con ABA, que tienen motivos regulados por ABA o elementos de respuesta a ABA (ABRE, del inglés "*ABA-responsive elements*") (Nakabayashi et al., 2005). Entre los transcritos requeridos específicamente para la germinación de semillas, se encuentran ARNm relacionados con la maquinaria de traducción, así como con el sistema de ubiquitina y proteasoma, lo que corrobora la importancia de la síntesis de proteínas y sugiere que debe haber una regulación dinámica y una proteólisis selectiva durante la germinación temprana de semillas (Nakabayashi et al., 2005). Un estudio más reciente de Bai et al., 2020 estableció que la mitad de los ARNm almacenados (50 %) en semillas secas están asociados con complejos de proteínas ribonucleicas, lo que garantiza la supervivencia de los ARNm durante el almacenamiento de la semilla (Bai et al., 2020). Una parte de estos transcritos se asocia con monosomas y se transcribe activamente. Otra parte se incluye en la fracción asociada a polisomas y contiene transcritos clasificados por ontología de genes en las categorías "desarrollo embrionario que termina en la dormición de semillas", "desarrollo de polen", "desarrollo floral" y "germinación de polen", lo cual nuevamente sugiere que no todos los ARNm acumulados son esenciales para la germinación de las semillas como en Nakabayashi et al., 2005. De hecho, un gran número de estos ARNm presentan una disminución en su expresión durante la fase de hidratación.

Semillas embebidas

Las semillas embebidas presentan un patrón de expresión génica específico (Carrera et al., 2008; Dekkers et al., 2016; Nakabayashi et al., 2005). Tanto en semillas dormidas como en período de post-maduración, una gran proporción de los transcritos cambian de forma similar. Sin embargo, la expresión diferencial comienza en las etapas tempranas del comienzo de la imbibición, por lo

que la post-maduración induce cambios génicos relacionados con la rápida detección y respuesta a la rehidratación. Y, por su parte, el endosperma de las semillas dormidas, presenta una alta expresión de genes asociados a estrés. Esto sugiere un rol protector para el endosperma contra el estrés biótico y abiótico, promoviendo la persistencia de la semilla dormida en su entorno (Dekkers et al., 2016)

Semillas en proceso de germinación

Una vez que se rompe la dormición y las condiciones ambientales son permisivas, las semillas pueden germinar. Este paso representa una transición programada de un estado inactivo a un estado metabólicamente activo. La germinación puede desencadenarse aún en presencia del inhibidor de la transcripción α -amanitina, pero no en presencia de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Esto indica que la germinación de las semillas no depende estrictamente de la transcripción de ARNm recién sintetizados, aunque sí requiere la síntesis de proteínas *de novo* (He et al., 2011; Jendrisak, 1980; Liu et al., 2016; Rajjou et al., 2004; Sano et al., 2012, 2019; Schultz & Small, 1991). Un análisis sobre perfilado de polisomas de semillas de *A. thaliana* transicionando de estado seco a germinadas identificó claramente dos pasos en los que la proporción de ARNm asociados con polisomas con respecto al total cambió y donde ocurrieron los cambios de traducción más significativos: las fases de hidratación y germinación, denominadas HTS y GTS (del inglés, "*Hydration Translational Shift*" y "*Germination Translational Shift*"). A su vez, se pueden correlacionar con las fases fisiológicas de imbibición temprana y protrusión radicular, respectivamente (Bai et al., 2017). Grupos de transcritos distintos y no superpuestos se asociaron con estos cambios de traducción y se identificaron secuencias asociadas con diferentes cambios de traducción como el número de μ ORF, la longitud del ARNm, el contenido de GC y la estructura secundaria que se correlacionan principalmente con una regulación positiva de la traducción. Curiosamente, los μ ORF en el 5' UTR estaban significativamente sobrerrepresentados en el grupo de genes de la HTS con expresión disminuída, mientras que estaban significativamente poco representados en el conjunto de genes de la GTS con expresión disminuida (Bai et al., 2017), lo que sugiere que el control de la traducción de la transición de semilla a plántula involucra múltiples factores y diferentes mecanismos moleculares.

El *splicing*

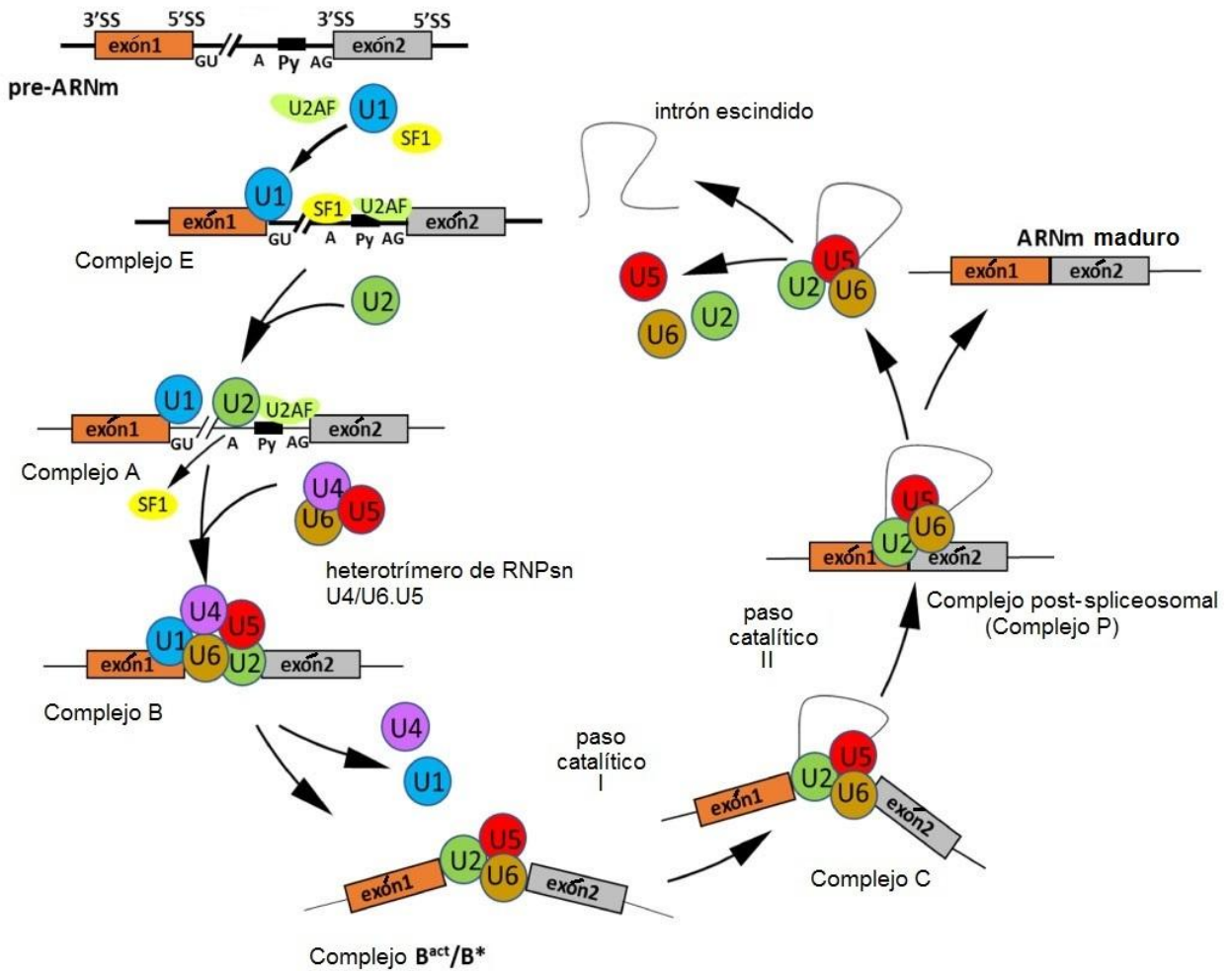
Si bien la iniciación de la transcripción es una de las etapas regulatorias más estudiadas en la expresión de los genes (Core et al., 2012; Leff et al., 1986); el procesamiento de los transcritos y su estabilidad son también mecanismos capaces de modular la cantidad y, más aún, la calidad de producto(s) de un gen. El proceso de *splicing* es una parte esencial de la expresión de los genes en eucariotas. Brevemente, este proceso llevado a cabo por el spliceosoma en los núcleos de las células, consiste en eliminar ciertas regiones (intrones) en los ARNs que fueron -o están siendo- transcritos y unir las partes restantes (exones) para formar los mensajeros maduros (ARNm). Éstos saldrán posteriormente del núcleo para ser traducidos a proteínas en el citoplasma.

El mecanismo de *splicing*

El proceso de *splicing* ocurre en el núcleo durante la transcripción y es catalizado por el spliceosoma. Hasta el momento, se han descrito dos tipos de spliceosomas (A. Reddy et al., 2012; Simpson & Brown, 2008; Will & Lührmann, 2011). Los spliceosomas U2 que están compuestos por cinco ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (RNPsn; U1, U2, U4, U5 y U6) representan el tipo principal (A. Reddy et al., 2012; Simpson & Brown, 2008; Will & Lührmann, 2011). Estas RNPsn funcionan individualmente (U1 y U2), en heterodímeros (U4/U6) y en heterotrímeros (U4/U6.U5) (Gehring & Roignant, 2021). El tipo de spliceosoma menos frecuente, spliceosoma U12, también consta de cinco RNPsn incluyendo U11, U12, U4atac, U5 y U6atac (Simpson & Brown, 2008). Para el ensamblado de ambos tipos de spliceosoma se requiere: un sitio 5' de *splicing* (dador) con una secuencia conservada GT al principio del intrón, un sitio 3' de *splicing* (aceptor) con una secuencia AG conservada al final del intrón, un nucleótido de adenina (A) (sitio de *branch*) ubicado entre 18 y 40 nucleótidos río arriba del sitio 3' de *splicing* y el tracto de polipirimidinas luego del sitio de *branch* (A. S. N. Reddy et al., 2013). Específicamente en el caso del spliceosoma U2, en la primera etapa del *splicing*, el complejo E se ensambla (Fig. 5 A). El factor de *splicing* U1 se pega al sitio 5' de *splicing*. A la vez, SPLICING FACTOR 1 (SF1) reconoce la secuencia del sitio de *branch* y el factor auxiliar U2 (U2AF) en el tracto de polipirimidinas. En la siguiente etapa, se forma el complejo A (pre-spliceosomal), cuando U2 desplaza a SF1 y ocupa su lugar. Luego, el heterotrímero U4/U6.U5 se combina con el complejo A para formar un complejo B inactivo. El spliceosoma cambia de conformación con gasto de ATP. Esto genera que U1 y U4 pierdan afinidad y se despeguen, promoviendo la activación catalítica del spliceosoma y la activación del complejo B (B* o Bact). La escisión del intrón es catalizada en dos transesterificaciones consecutivas. La primera ocurre en el complejo C y la segunda en el complejo C*. En el complejo C* los exones se unen y como resultado, se forma un complejo post-spliceosomal (complejo P) con exones unidos. El proceso de *splicing* se completa cuando el intrón queda como un lazo y se escinde; los exones se unen para formar el ARNm maduro, mientras que las RNPsn son recicladas (Gehring & Roignant, 2021; Sybilska & Daszkowska-Golec, 2023).

Además de las RNPsn, también existen reguladores en *cis* y *trans* que regulan la actividad del spliceosoma para un *splicing* eficiente (Fig. 5 B). Las secuencias regulatorias en *cis* incluyen potenciadores de *splicing* intrónico (ISEs, del inglés "*intronic splice enhancers*") y silenciadores (ISSs, del inglés "*intronic splice silencers*"), potenciadores de *splicing* exónico (ESEs, del inglés "*exonic splice enhancers*") y silenciadores (ESSs, del inglés "*exonic splice silencers*"). A estas secuencias se unen proteínas con dominio de unión a ARN (RBPs, del inglés "*RNA binding proteins*") que actúan en *trans*, promoviendo o inhibiendo el ensamblado de la maquinaria del spliceosoma. Las proteínas ricas en serina y arginina (SR) son activadores en *trans* del *splicing* que se unen a ISEs/ESEs y promueven la unión de exones a través del reclutamiento de U1 al sitio 5' de *splicing* y de U2 al sitio de *branch*. Por el contrario, las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (RNPhn's) actúan como inhibidores de *splicing*, uniéndose a ISSs/ESSs y reprimen el reconocimiento de los sitios de *splicing* (Konarska et al., 2006; Gehring & Roignant, 2021; Sybilska & Daszkowska-Golec, 2023).

A



B

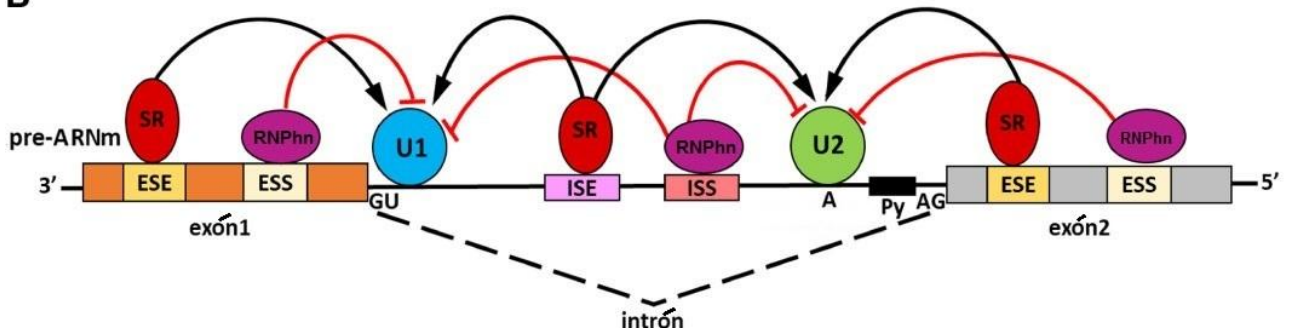


Figura 5. Esquema representando el proceso de *splicing* y su regulación. (A) Mecanismo molecular del procesamiento durante el *splicing* del pre-ARNm hasta obtener un ARNm maduro. (B) Rol de secuencias regulatorias en *cis* y reguladores de *splicing* que actúan en *trans* en la actividad del spliceosoma. 3'SS, sitio 3' de *splicing* con secuencia GU (aceptor). 5'SS, sitio 5' de *splicing* con secuencia AG. Py, tracto de polipirimidinas. A, sitio de *branch*. RNPsn, ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (U1-U6). SF1, SPLICING FACTOR 1. U2AF, factor auxiliar RNPsn U2. ISE, potenciadores de *splicing* intrónico. ISS, silenciadores de *splicing* intrónico. ESE, potenciadores de *splicing* exónico. ESS, silenciadores de *splicing* exónico. SR, proteínas ricas en serina y arginina. RNPPhn, ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares. Modificado de Sybilska & Daszkowska-Golec, 2023.

Si bien es un mecanismo altamente conservado en organismos eucariotas (Ling et al., 2019; McGuire et al., 2008; A. S. N. Reddy, 2007), existen algunas diferencias respecto a las plantas. Los genes de las plantas tienen intrones de tamaño promedio menor que los animales (Chang et al., 2017). Incluso, este número varía entre diferentes especies vegetales. Otra característica distintiva de los intrones de las plantas es su alta composición en secuencias UA (Syed et al., 2012). Además, la secuencia blanco de SF1 al sitio de branch en plantas no está conservada comparada con otros eucariotas (Lorković et al., 2000). Consistentemente, SF1 podría tener un mecanismo diferente de reconocimiento del sitio 3' de *splicing* dado que sus homólogos contienen un motivo de reconocimiento de ARN diferente (Park et al., 2019; Worden et al., 2009).

El *splicing* alternativo

El *splicing* alternativo (SA) se descubrió al mismo tiempo que el *splicing* y contribuye a generar diversidad del transcriptoma. Es un proceso que genera múltiples ARNm maduros, llamados isoformas, a partir del mismo precursor de ARNm por medio de la selección variable de sitios de *splicing* (Kornblihtt et al., 2013; Shang et al., 2017). Además de generar diferentes isoformas que pueden ser traducidas en diferentes proteínas, este proceso puede dar lugar también a variantes no codificantes, modulando así los niveles de proteína que se generará (Kalyna et al., 2012; Brown et al., 2015; Cyrek et al., 2016). El mecanismo más habitual que regula la abundancia de transcritos es el NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), un sistema citoplasmático de degradación del ARN. Por estas razones, el SA es capaz de regular de manera significativa y precisa la expresión de los genes respecto de los estadios del desarrollo, en diferentes tejidos y en respuesta a diversas señales ambientales (James et al., 2012; Staiger et al., 2013).

El proceso requiere una regulación precisa para poder garantizar plasticidad mientras muestra especificidad y fidelidad. Por un lado, las interacciones entre RBPs son parte de los factores que lo regulan. Dado que la mayoría de las decisiones de *splicing* ocurren simultáneamente con la transcripción, la interacción de las RBP con los pre-ARNm puede verse afectada por la estructura de la cromatina, los factores de transcripción y las modificaciones del ARN (Fu & Ares, 2014; Lee & Rio, 2015). Por otro lado, las diferentes secuencias regulatorias en los intrones, como el sitio 5'SS, el sitio de *branch*, el tracto de polipirimidinas y el sitio 3'SS deben ser reconocidas por RNPsn y proteínas accesorias, en un mecanismo altamente regulado que lleva al ensamblado del spliceosoma activo. Se ha acumulado evidencia que muestra los efectos de secuencias regulatorias en *cis* y su reconocimiento por factores de *splicing* como son las proteínas SR (ver subsección "Las proteínas SR") y las RNPhns (ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares), en la habilidad del spliceosoma de reconocer ciertos sitios de *splicing* (Busch & Hertel, 2012). Otros mecanismos regulatorios tienen que ver con la actividad/concentración de factores centrales de *splicing*, o de reguladores del ensamblado del spliceosoma, que pueden afectar la cinética de las reacciones modulando los patrones de SA (Saltzman et al., 2011).

Existen diferentes tipos de SA (Fig. 6) y los más comunes son:

- I. salteado de exón: un exón se omite alternativamente y da como resultado un ARNm maduro más corto,
- II. sitios alternativos 5' de *splicing*, 5'SS: el spliceosoma puede reconocer un 5' ss alternativo, para producir una variante más corta o más larga,

reguladas por NMD (Kalyna et al., 2012), lo que respalda la idea de que el SA media la proporción de isoformas de un gen. Sin embargo, en varias publicaciones se postula que estas isoformas también pueden pasar por alto esta vía y codificar proteínas truncadas, que regulan funciones clave bajo estrés y/o controlan la abundancia de sus contrapartes de largo completo (Drechsel et al., 2013; Filichkin et al., 2015; Filichkin & Mockler, 2012; Kalyna et al., 2012).

Las proteínas SR

Las proteínas SR son una familia de importantes proteínas de unión a ARN, que se conservan en eucariotas superiores y funcionan como factores esenciales para el *splicing* constitutivo y alternativo. Contienen uno o dos dominios de unión al ARN en su N-terminal (RRMs, del inglés “*RNA recognition motifs*”) y un dominio rico en arginina/serina (RS) en el C-terminal para la interacción con otras proteínas (Day et al., 2012; Graveley et al., 2001; Manley & Tacke, 1996; Reddy, 2004; Wu & Maniatis, 1993). Los genes SR de las plantas se agrupan en seis subfamilias (SR, SC, RSZ, SCL, RS2Z y RS), y tres de estas subfamilias (SR, SC y RSZ) son específicas de las plantas (Barta et al., 2010; Fig. 7). Aunque hay controversia, también consideramos a la subfamilia SR45 en la que se incluyen SR45 y SR45.a. SR45 es una proteína altamente conservada en el reino vegetal y que parece haber aparecido más tarde en la evolución en las plantas con flores (Ali et al., 2007). Aún debe dilucidarse si la arquitectura de los intrones/exones y elementos *cis* específicos de plantas involucrados en el *splicing* sean la razón de esta diferencia entre plantas y animales, o si es debido a las duplicaciones segmentarias y del genoma completo, que es una característica común en las plantas (Gu et al., 2020). Un análisis comparativo de genes SR reveló que el número de genes SR difiere de organismo a organismo, incluso dentro de las plantas. *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Glycine max* y *Sorghum bicolor* tienen 18, 22, 21, 18 y 25 genes SR, respectivamente (Barta et al., 2010). En *A. thaliana*, el peso molecular de las 18 proteínas SR ronda entre los 21 y los 45 kDa (Lorković & Barta, 2002). Los miembros de las diferentes subfamilias se localizan en distintas poblaciones de *speckles* nucleares, sin necesariamente co-localizar entre ellas (Reddy & Shad Ali, 2011). Esta distribución sugiere que existe un reclutamiento más específico a los sitios de *splicing*, dependiendo del tipo celular y la etapa de desarrollo (Lorković et al., 2008).

Las proteínas SR juegan un rol importante en la regulación de la selección del sitio de *splicing*. Son importantes para reconocer los sitios de *splicing* o los potenciadores exónicos de *splicing* (ESEs) y facilitan el ensamblaje del spliceosoma (Kalyna et al., 2006). En consecuencia, las proteínas SR son uno de los determinantes del patrón de empalme presente en diferentes células y en etapas de desarrollo o condiciones específicas. La actividad o las isoformas de algunas proteínas SR pueden estar reguladas por miembros de la familia A/B de las RNPhn y por otras SR, o inclusive por ellas mismas. También se unen a proteínas específicas de etapas de desarrollo o en respuesta a estrés (de la Fuente van Bentem et al., 2008; Lorković et al., 2004; van Bentem et al., 2006; Yan et al., 2017). Su actividad o localización puede ser afectada por fosforilación (Stamm, 2002, 2008; Stamm et al., 2005) y se identificaron proteínas kinasa que fosforilan SRs (Savaldi-Goldstein et al., 2003; van Bentem et al., 2006). A su vez, la regulación de proteínas SR es dependiente de la concentración. Por lo tanto, no es sorprendente que la sobre-expresión de proteínas SR y líneas *knock-out* muestren fenotipos en el crecimiento y desarrollo, demostrando su relevancia biológica (Barta et al., 2008). Además, la expresión de proteínas SR cambia el *splicing* de sus propios

pre-ARNm y otros genes SR (Barta et al., 2008; Gao et al., 2004; Isshiki et al., 2006; Kalyna et al., 2003, 2006; Kalyna & Barta, 2004; Lopato et al., 1999; Palusa et al., 2007). El SA de muchos genes SR en *A. thaliana* es regulado por la temperatura, luz, salinidad, hormonas, etc. (Duque, 2011; Jiang et al., 2017; Ling et al., 2021; Palusa et al., 2007; Tanabe et al., 2007; Tognacca et al., 2019), entre los que podemos destacar a *At-SR30* y *At-RS31*. Este último merece su propia subsección “Factores de *splicing* que presentan *splicing* alternativo: el caso *At-RS31*”.

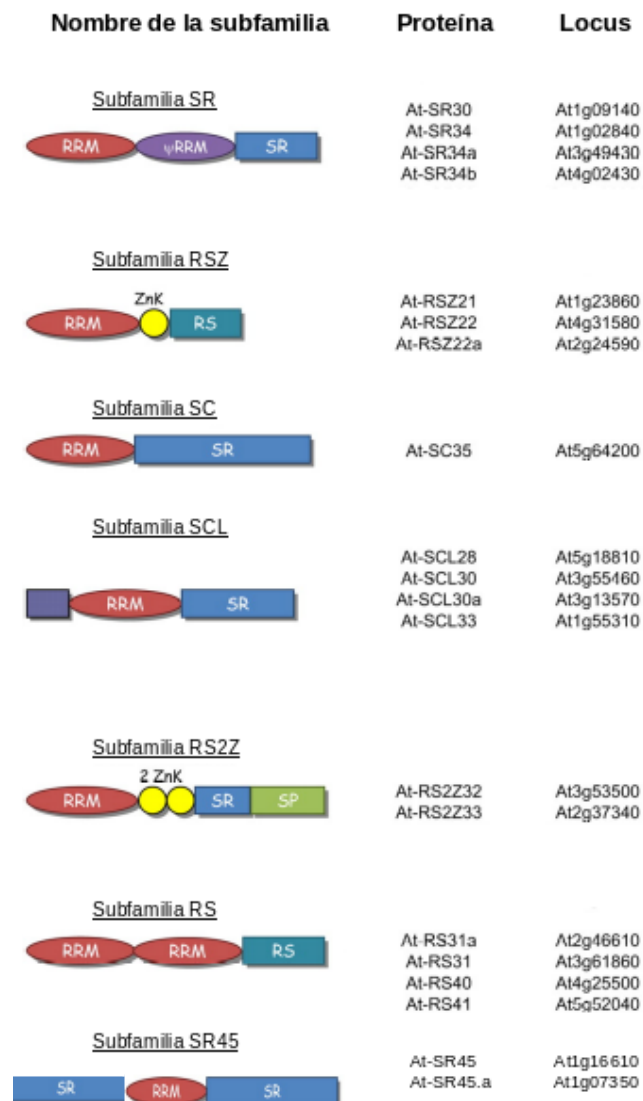


Figura 7: Arquitectura del dominio de las subfamilias de proteínas SR de *A. thaliana*. RRM: dominio de unión al ARN; RS/SR: dominio rico en serina/arginina; SP: dominio rico en serina/prolina; ZnK: motivo dedos de zinc. Modificado de Barta et al., 2010. Actualmente la subfamilia SR45 es considerada como “SR-like”.

Factores de *splicing* que presentan *splicing* alternativo: el caso *At-RS31*

At-RS31 es una proteína SR y como tal es importante en la selección de sitios de *splicing*, el ensamblado de los ARNs (del inglés “*small nuclear RNA*”, ARN pequeños nucleares) y la estabilización de los mismos (Lopato et al., 1996). Los eventos de *splicing* alternativo de este gen dan lugar a tres isoformas, llamadas *mRNA1*, *mRNA2* y *mRNA3* (Fig. 8). *mRNA1* es la única isoforma que codifica la proteína y que no contiene el exón alternativo. *mRNA2* es la isoforma que surge del reconocimiento de un 3'SS y 5'SS alternativo a ambos lados del exón alternativo, sería la isoforma de inclusión, y se degrada por NMD (Petrillo et al., 2014; Riegler et al., 2021). *mRNA3* es la isoforma que surge del reconocimiento del 3'SS alternativo, y tenemos evidencia de que tiene localización nuclear (Petrillo et al., 2014). Nuestro grupo en conjunto con colaboradores, encontró que la luz puede regular el patrón de SA de *At-RS31* a través de señales retrógradas que emergen de los cloroplastos, y probó que en raíces está regulado por azúcares pero no directamente por la luz (Petrillo et al., 2014; Riegler et al., 2021).

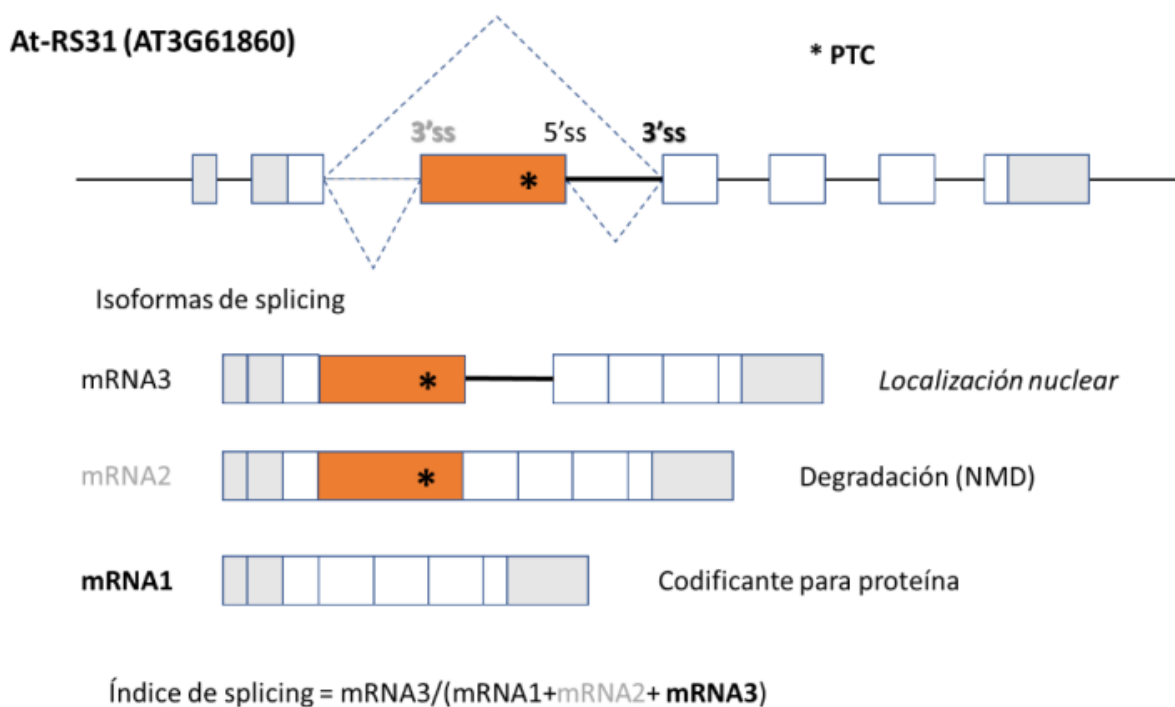


Figura 8: Esquema del gen *At-RS31* y sus isoformas. Los exones se muestran como cajas (blanco codificante, gris no codificante), los intrones se muestran como líneas. Se indican los sitios de *splicing* (ss) 5' o 3' y el exón naranja que actúa como alternativo para algunas de las isoformas mostradas. PTC, codón STOP prematuro. NMD, *nonsense mediated mRNA decay*.

El *splicing* alternativo en las semillas de *A. thaliana*.

Si bien el conocimiento que tenemos sobre la regulación de la germinación inducida por la luz a nivel de inicio de transcripción es muy abundante (Penfield et al., 2005; Oh et al., 2006, 2007, 2009; Park et al., 2012; Ibarra et al., 2013), todavía se desconoce cómo influye esta señal sobre el *splicing* alternativo en las semillas. Narsai et al. (2017) analizaron las dinámicas de la expresión génica durante la germinación inducida en condiciones de luz blanca/oscuridad, generando la primera red de transcripción dinámica durante la germinación de semillas. Encontraron que 620 genes se ven afectados por SA y que su expresión es temporal- y tejido-específica.

Algunos de ellos se describen a continuación.

- Componentes de la vía de señalización del ABA.

HYPERSENSITIVE TO ABA1 (HAB1) es un gen que codifica para una PP2C ampliamente expresada en varios tejidos y órganos en presencia de ABA (Saez et al., 2004). Existen dos isoformas (*At-HAB1.1* y *At-HAB1.2*). Por un lado, *At-HAB1.1* es la isoforma de largo completo, que contiene en total seis exones, cuatro de los cuales se mantienen en el ARNm maduro y da lugar a una proteína que interactúa con SnRK2.6, inhibiendo su actividad y apagando la señalización del ABA. Por otro lado, *At-HAB1.2* retiene el cuarto intrón y codifica una proteína más pequeña debido a un codón prematuro de terminación, que resulta en una traducción detenida de forma prematura y pérdida de la actividad fosfatasa (Wang et al., 2015; Xue et al., 2018). Las proteínas codificadas por las dos isoformas, cumplen roles antagonistas en la regulación de la germinación. Mientras que *At-HAB1.1* promueve la germinación de la semilla, *At-HAB1.2* es un regulador positivo de la señalización por ABA, reprimiendo este proceso (Wang et al., 2015).

ABA INSENSITIVE 3 (ABI3) es un factor de transcripción central en la germinación y dormición en la vía del ABA. *At-ABI3* presenta dos variantes de *splicing* diferentes: *At-ABI3- α* (presenta secuencia codificante completa y por tanto codifica para la proteína completa) y *At-ABI3- β* (contiene un intrón críptico en el primer exón que causa un cambio en el marco de lectura y por tanto codifica para una proteína trunca) (Sugliani et al., 2010). El *splicing* de *At-ABI3* es regulado durante el desarrollo, con una acumulación de *At-ABI3- β* solo durante la etapa final de maduración de la semilla. Esto probablemente contribuya a una rápida regulación negativa de la proteína ABI3 en semillas maduras, lo cual es necesario para inhibir el programa de maduración de las semillas mientras están germinando (Sugliani et al., 2010).

- Componentes involucrados en la dormición.

At-DRM1 (DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1) es un gen relacionado con la dormición y respuestas al estrés. Presenta varias isoformas, entre las cuales se destaca *At-DRM1.6* por regular su expresión en respuesta al estrés salino (Rae et al., 2014)

- Componentes de la vía de señalización por luz.

El factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 2 (PIF2/PIF6) se expresa durante el desarrollo de la semilla. Existen cuatro isoformas, entre ellas, *At-PIF6- α* presenta todos sus exones en el ARNm maduro mientras que *At-PIF6- β* saltea un exón dando lugar a un codón stop prematuro; por ende, codifica una proteína trunca caracterizada por la ausencia del dominio de unión al ADN (Narsai et al., 2017; Penfield et al., 2010). *At-PIF6- α* predomina antes de la imbibición de la semilla y *At-PIF6- β* es dominante frente a estratificación en oscuridad entre 12 a 48 horas (Narsai et al., 2017). A pesar de que la isoforma *At-PIF6- α* no presenta una función evidente durante la germinación, la sobre-expresión de la isoforma *At-PIF6- β* reduce la dormición de las semillas comparada con el genotipo salvaje. Esto implicaría que tiene un rol activo en este proceso (Penfield et al., 2010).

- Factores relacionados al proceso de *splicing*.

Nuestro grupo de trabajo demostró mediante una secuenciación masiva de ARNs (RNA-seq) que 226 genes muestran cambios en sus patrones de SA en semillas salvajes Col-0 frente a tratamientos de Rp vs. Rlp. Al clasificarlos por su función, la mayoría de estos genes codifican

factores relacionados con el procesamiento de los ARNs, en particular, con el proceso de *splicing* (i.e. *At-SR30*, *At-RS31a*, *At-RS31*, y *At-U2AF65A*) y genes asociados a la señalización por luz y dormición (i.e. *At-PIF6* y *At-DRM1*) (Tognacca et al., 2019). Además, *phyB* es responsable de los cambios en los patrones de SA de *At-U2AF65A* y *At-PIF6*, mientras que los otros eventos de *splicing* son independientes de dicho fitocromo (Tognacca et al., 2019).

También obtuvimos datos preliminares que sugieren que *At-RS31* es un regulador positivo de la germinación mediada por la luz, ya que las semillas que sobre-expresan la isoforma codificante (*mRNA10X*) presentan mayores niveles de germinación, incluso en condiciones subóptimas de luz, comparado con el genotipo salvaje Col-0 (Tesis de licenciatura de L. Servi, 2019).

Por lo tanto, el punto de partida de la presente Tesis de licenciatura es ampliar el conocimiento que tenemos acerca del rol de *At-RS31* en la regulación de la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz en semillas de *A. thaliana*.

OBJETIVOS

- Llevar a cabo una breve investigación sobre un tema específico realizando técnicas de biología molecular y fisiología vegetal.
- Conocer los mecanismos básicos del *splicing* alternativo y familiarizarme con las técnicas y herramientas que permiten su estudio.
- Caracterizar el rol del factor de *splicing* *At-RS31* durante la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz en semillas de *A. thaliana*.
- Evaluar la función de *At-RS31* en otros estadios del ciclo de vida como son la floración y el desarrollo temprano de la plántula.
- Analizar los cambios en los patrones de *splicing* alternativo de genes asociados al metabolismo del ARNm como así también de genes involucrados en las vías de señalización por luz o en la regulación de la germinación.

HIPÓTESIS

El *splicing* alternativo es un mecanismo fisiológicamente relevante en las semillas que confiere una fina regulación de la expresión génica permitiéndoles responder y adaptarse a los cambios en las condiciones de su entorno, como es la luz incidente, lo que determina decisiones fisiológicamente relevantes como la salida de la dormición y la germinación. Más específicamente, el factor de *splicing* *At-RS31*, tiene un rol relevante en la inducción de la germinación por luz en semillas de *A. thaliana*, por medio de la modulación de su patrón de *splicing*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético utilizado.

Se utilizaron semillas del genotipo salvaje Col-0, como así también mutantes (*rs31*, mutante por inserción de ADN-T en el exón 5 de *At-RS31*, Salk_021332) y diferentes líneas transgénicas (*mRNA10X* y *RS31genOX*) del gen *At-RS31*. La línea transgénica *mRNA10X* sobre-expresa el cDNA de la isoforma *mRNA1*, la única codificante, bajo el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (*CaMV*). La línea transgénica *RS31genOX* sobre-expresa el gen completo, exones e intrones sin el 3'UTR, para dar una proteína de fusión a la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor endógeno (3 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción).

Condiciones de crecimiento de las plantas.

Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en macetas con sustrato (Growmix® Multipro™, Terrafertil) en condiciones de día largo [16 hs. luz/8 hs. oscuridad, PAR= 117 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$] con una temperatura promedio de $21\pm 2^\circ\text{C}$ hasta el momento de la cosecha. Las plantas se cultivaron en simultáneo y sus semillas se cosecharon cuando al menos dos tercios de los frutos se encontraban maduros y secos. Las semillas de cada genotipo se cosecharon *poolando* al menos cinco plantas. Luego se almacenaron en tubos con pequeños orificios dentro de una caja cerrada con sílica gel a temperatura ambiente y oscuridad por 48 hs. Posteriormente se mantuvieron en oscuridad a -80°C (para mantener el estado de dormición primaria) hasta que se realizaron los experimentos.

Para los ensayos de germinación se trabajó con semillas que se encontraban en estados fisiológicos idénticos. Es importante trabajar con semillas que hayan sido reproducidas de plantas madre cultivadas en idénticas condiciones, para evitar así efectos interferentes producto de la influencia del ambiente materno sobre la germinación (Donohue et al., 2005).

Ensayos de germinación.

Se sembraron tres réplicas biológicas de 20-30 semillas, cada una en cajas de plástico transparente (40 x 33 x 15 mm) conteniendo 5 mL de agar al 0,8% (p/V) en agua destilada (Fig. 9).

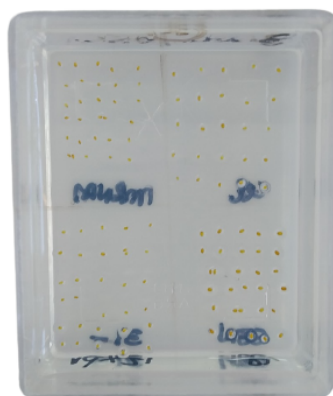


Figura 9: caja plástica transparente conteniendo agar al 0,8% (p/V) con las semillas ya sembradas de los genotipos Col-0, *mRNA10X*, *RS31genOX* y *rs31*.

Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas se embebieron durante 2 horas en oscuridad y luego se irradiaron con un pulso saturante de RL (RLp, 20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Luego, las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron en oscuridad en dos condiciones de temperatura durante uno y tres días (d): 1) estratificación a 5°C. A estos tratamientos los denominamos 1dx5°C y 3dx5°C, y 2) incubación a 21°C. A estos tratamientos los denominamos 1dx21°C y 3dx21°C.

Luego de este período se irradiaron las semillas con un pulso saturante R (Rp) o RL durante 20 minutos, manteniendo un control en oscuridad. Después de los tratamientos de luz, las cajas se envolvieron nuevamente con bolsas de plástico negras y se incubaron a 21°C durante 3 días antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la emergencia de la radícula a simple vista (Fig. 10).

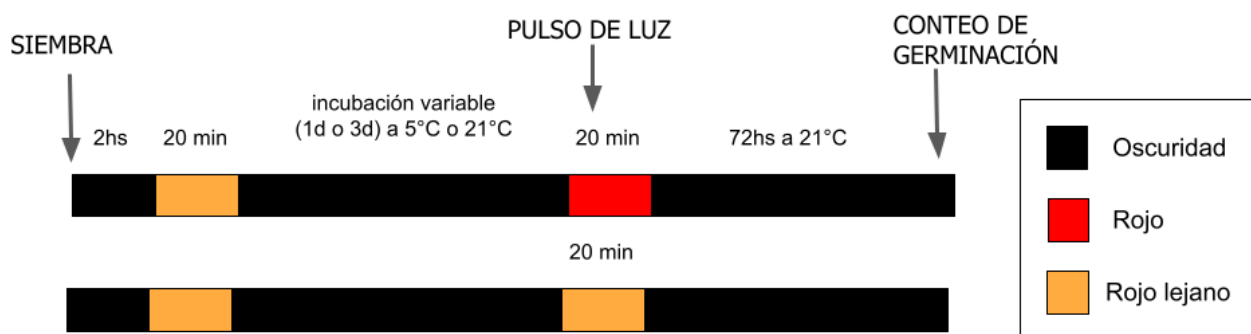


Figura 10: protocolo experimental utilizado para los experimentos de germinación.

Ensayos de post-maduración.

Los experimentos de post-maduración se realizaron a los 0, 8, 14, 21, 28 y 35 días posteriores a la cosecha. Para el día 0 se utilizaron semillas frescas recién cosechadas y para el resto de los días se utilizaron las semillas de la misma cosecha que fueron almacenadas con sílica gel a temperatura ambiente en oscuridad durante el tiempo que duró el experimento (post-maduración en seco). Se siguió el protocolo de germinación descrito en "Ensayos de germinación".

Ensayos de reversibilidad R/RL.

Se estratificaron las semillas durante 3 días a 5°C en oscuridad y luego se irradiaron durante 20 minutos de la siguiente forma: Rp, RLp, Rp+RLp, RLp+Rp. Luego se incubaron las semillas durante 3 días a 21°C, momento en el que se contó la germinación (Fig. 11).

Ensayo de floración.

El tiempo a floración se evaluó tanto en condiciones de día largo (16 hs. luz/8 hs. oscuridad) como de día corto (8 hs. luz/16 hs. oscuridad, PAR = 117 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y temperatura promedio de $21\pm 2^\circ\text{C}$. A cada planta se le contó el número total de hojas principales en la roseta hasta el momento de aparición del botón floral, es decir, el momento en el que se produce la transición de desarrollo vegetativo a desarrollo reproductivo, como indicador de la duración de la fase vegetativa (Poethig, 1990), sin incluir los cotiledones.

Extracción y cuantificación del ARN.

Se realizó la extracción del ARN de 2-3 muestras biológicas de semillas (5 mg cada una) para cada tratamiento evaluado. Las semillas se sembraron sobre papel de filtro embebido en agar-agua al 0,8 % (p/V). El protocolo experimental fue igual al mencionado en el punto "Ensayos de reversibilidad R/RL", pero luego de los pulsos saturantes de luz (Rp, RLP, Rp+RLp y RLP+Rp), las semillas se incubaron a 21°C en oscuridad durante 12 hs, momento en el que se procedió a la cosecha de las muestras (Fig. 12). Estas muestras se almacenaron a -80°C hasta que se realizó la extracción del ARN.

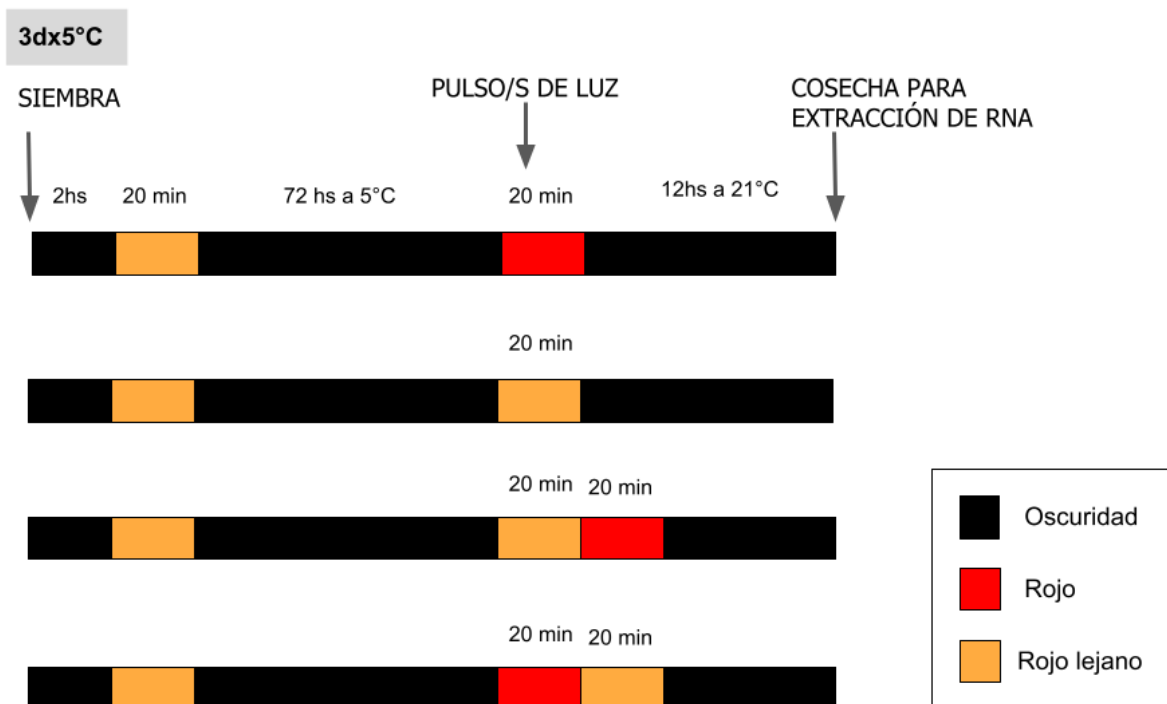


Figura 12: protocolo experimental para la cosecha de semillas irradiadas destinada a extracción de RNA

Como paso inicial se realizó el procesamiento de las muestras en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN. Se repitió este paso hasta obtener un fino polvo, utilizando mortero y pilón. El ARN total de las semillas se extrajo utilizando el kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se comenzó con el lisado de tejidos de la muestra. Se sacó del nitrógeno líquido a cada tubo conteniendo el polvo de semillas, y rápidamente se le agregaron 500 μL de lysis solution con β -Mercaptoetanol. Se vortexeó inmediatamente por 30 segundos. Se incubó la muestra por 3-5 minutos a temperatura ambiente.

Para descartar los restos celulares, se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos para que queden depositados en el pellet. Se pipeteó el sobrenadante en una columna de filtración (con anillo azul) colocada sobre un tubo de recolección de 2mL. Antes de pipetear, se posicionó el tip por debajo de la capa flotante y lejos del pellet. No era tan importante si se llevan partículas de la capa flotante, pero si había que evitar tocar el pellet. Se centrifugó por 1 minuto a velocidad máxima. Se reservó el líquido que quedaba en el tubo de recolección. Si todo el líquido no pasó por la columna, se re-centrifugaba por 3-5 minutos. Para la adhesión del RNA a la columna, en este caso utilizamos el "protocolo A" de la guía de usuarios de la empresa, ya que se consideró que las semillas tienen bajos niveles de RNA. Se pipetearon 750uL de Binding solution en el tubo que contenía el líquido y se mezcló inmediatamente resuspendiendo con la pipeta o mediante un vortex corto. No se centrifugó en este paso. A continuación, se pipetearon 700uL de la mezcla anterior en la columna de adhesión (con anillo rojo). Se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima para adherir el RNA. Se descartó el líquido remanente volteando el tubo de recolección, y limpiando en papel absorbente. Se devolvió la columna al tubo de recolección. Se repitió con lo que quedaba de mezcla. Después se realizó el primer lavado. Se pipetearon 500 uL de wash solution 1 en la columna. Se descartó el líquido remanente volteando el tubo de recolección, y limpiando en papel absorbente. Se devolvió la columna al tubo de recolección. Para el segundo lavado, se pipetearon 500ul de wash solution 2 (que ya estaba preparada con etanol) a la columna. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Se descartó el líquido remanente volteando el tubo de recolección, y limpiando en papel absorbente. Se devolvió la columna al tubo de recolección. Para el tercer lavado, se pipetearon otros 500ul de wash solution 2 a la columna. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos. Se descartó el líquido remanente volteando el tubo de recolección, y limpiando en papel absorbente. Se devolvió la columna al tubo de recolección. Posteriormente, se secó la columna centrifugando 1 minuto a velocidad máxima. Al retirar de la centrifuga, había que tomar cuidado de que el líquido no toque la columna. Pero, si lo tocaba accidentalmente, se volvía a centrifugar por 30 segundos a máxima velocidad. A continuación, para la primera elución, se transfirió la columna a un nuevo tubo recolector de 2ml. Se pipetearon 50ul de H₂O. Se usó H₂O en vez de elution solution para evitar las sales y otros componentes que pueden interferir posteriormente de forma negativa en las RTs y PCRs. Se pipeteó directamente al centro de la columna (sin tocarla). Se dejó asentar durante 1 minuto. Se centrifugó 1 minuto a velocidad máxima. De esta forma, quedó el ARN purificado en el eluido. Se guardó a -80°C hasta su uso.

El ARN se cuantificó utilizando el equipo Nanodrop. Teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos presentan su máximo de absorción a 260 nm y que las proteínas lo hacen a 280 nm, se evaluó la relación de absorbancias en estas dos longitudes de onda para determinar la pureza del material genético (relación 260/280). Una relación óptima de trabajo ronda el valor de 2. Se procedió luego a la determinación de la calidad del ARN mediante la corrida en un gel de agarosa 1,5% con Bromuro de Etidio y 0,5 % de hipoclorito de sodio (comercial) con el fin de descartar la posible presencia de ADN en la muestra o de ARN degradado. El hipoclorito de sodio es capaz de inhibir la acción de las enzimas que degradan ARN (Aranda et al., 2012).

Síntesis del ADN copia (ADNc) a partir del ARN obtenido.

Una vez obtenido el ARN, se sintetizó el ADNc realizando una retrotranscripción (RT) con la enzima M-MLV Reverse transcriptase (Sigma). Para esto, se utilizó un volumen equivalente a 1000 ng de ADNc + H₂O hasta un volumen final de 14 µL. Se incubó durante 5 minutos a 65 °C y luego se

mantuvo esta solución en hielo durante 1 minuto. Se adicionaron 6 μL de la mix de RT [1 μL de M-MLV Reverse Transcriptase Enzyme (200 U/ μl) + 2 μL First Strand Buffer 10X + 1 μL de dNTPs mix 10 mM + 1 μL de oligodT 0,5 ug/ μL + 1 μL de H₂O], obteniendo un volumen final de reacción de 20 μL . Esta solución se incubó durante 1 hora a 37 °C, 5 minutos a 95 °C y luego se mantuvo en hielo o -20 °C para posterior uso.

Análisis de eventos de *splicing* alternativo y cuantificación de abundancia relativa de isoformas mediante PCR semi-cuantitativa.

El ADNc obtenido mediante la RT se utilizó para realizar las reacciones de PCR semi-cuantitativa con el fin de obtener los patrones de *splicing* de los diferentes genes evaluados. Los *primers* fueron diseñados para cada gen de forma tal que fueran capaces de amplificar las diferentes isoformas derivadas del gen, estableciéndose así una competencia de los moldes con los *primers*, resultando en una mayor abundancia del producto de PCR específico de una isoforma en particular cuanto más abundante sea ésta como molde en la muestra. Las secuencias de los *primers* utilizados se encuentran en la Tabla 1. Para cada reacción de PCR, se incubaron 2 μL del ADNc resultante de la RT (diluido en $\frac{1}{2}$ hasta tener una masa de 500 ng de cDNA) con 18 μL de la mix de PCR [0,4 μL primer forward + 0,4 μL primer reverse + 0,2 μL de T-Plus Free ADN polimerasa 500 U (5.000 U/ml) Inbio Highway + 2 μL buffer de reacción TAS 10 X + 2 μL PVP 10x + 2,4 μL cloruro de magnesio 25 mM + 0,4 μL dNTPs mix 10 mM + 10,2 μL H₂O]. El ciclado térmico varió para cada gen evaluado. Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa y la abundancia relativa de las isoformas (bandas en el gel) se cuantificó utilizando el software ImageJ (<https://imagej.net/Welcome>). Con los datos de densitometría se calcularon los valores de los índices de *splicing* (IS) como la abundancia de la isoforma más larga relativa a los niveles de todas las isoformas posibles para cada gen evaluado. Se estudiaron las respuestas de *At-RS31* y otros genes que participan en procesos relacionados con el metabolismo del ARN como así también genes involucrados en los procesos de dormición y germinación (*At-ABI3*, *At-ABI5* y *At-PIF6*, entre otros).

Gen	Locus	Nombre	Secuencia
<i>At-U2AF65A</i>	AT4G36690	U2AF65-E10-Fw	TGCACAGCAGCAAATAGCTT
		pp198-Rv	GGCCTGCCACTGGCTGACCATTGG
<i>At-RS31</i>	AT3G61860	RS31n-Spl-Fw	TCGGATCTGGAACGGTTG
		RS31n-Spl-Rv	CAGTGTCTTTGTAGGCTTCAG
		RS31-endo-Fw	GTTTTTCGTTTCTTCTCCGATTG
		RS31-endo-R	GAACCAAGTAACAGATCGTG
<i>At-SR30</i>	AT1G09140	SR30-E6-Fw	CATGCGCAAAGCTGGAGATG
		SR30-Rv	TTTCATTTTCAACCAGATATCAC
<i>At-DRM1</i>	AT1G28330	DRM1spl-Fw	CTCCAACATCTTTGATAAACC
		DRM1spl-Rv	TTGAGTCACCGCTGTACAAC
<i>At-PIF6/At-PIL2</i>	AT3G62090	PIF6Fsplice	AAAACGAAATGCAGAAGCGTATAA
		PIF6Rsplice	TGTCATATAATTGATTGCTTCATCCA
<i>At-ABI3</i>	AT3G24650	ABI3spl-Fw	TTCTTTACTTGAATCTCCACC
		ABI3spl-Rv2	CTCGGTTGTCTTACTTTAACC
<i>At-ABI5</i>	AT2G36270	ABI5-F	TGGAGAGAAGACAGAGGAG
		ABI5-R	CCCTTGACTTCAAACCTCTC
<i>At-ANAC060</i>	AT3G44290	ANAC0601	GATTTCTACTTATCAAGTGAG
		ANAC0602	ATAGAAATCTTCTTCACTAGG
<i>At-HAB1</i>	AT1G72770	HAB1-F1	TGAAGGAAAAATTGGTAGAGCC
		HAB1-R1	TCAGGTTCTGGTCTTGAACTTTC
<i>At-SnRK2.2</i>	AT3G50500	SnRK2.2-F	TCACCAAGGAGCTTGTTGCTG
		SnRK2.2-R	GTTGGGAATGAAGAACAGAAG
<i>At-SnRK2.3</i>	AT5G66880	SnRK2.3-F	TTCTGGTAATTTCCGGTGTG
		SnRK2.3-R	CATTATGATAGCCAGATGAG

Tabla 1: Primers utilizados en las reacciones de RT- PCR.

Análisis estadístico.

Para evaluar diferencias significativas en la respuesta de germinación de las semillas, la apertura de cotiledones, la aparición de hojas verdaderas, el número de hojas a floración y el índice de *splicing*, se utilizó un modelo de comparación de medias (ANOVA) de dos factores (genotipo y tratamiento / día de post-maduración) con *Infostat* versión 2020. Los valores de porcentaje de germinación de cada tratamiento lumínico fueron transformados mediante la transformación angular para la evaluación estadística. En caso de presentar diferencias significativas ($p < 0,05$), se procedió a realizar contrastes por el método de Tukey, manteniendo el otro factor constante.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Rol de *At-RS31* durante la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz.

(A) Respuestas de reversibilidad al R/RL.

En *A. thaliana* la promoción de la germinación por luz es mediada por los fitocromos. Cuando las semillas reciben un pulso de luz Roja (Rp), se establecen niveles altos de Pfr en las mismas, y la germinación es promovida a través de la acción del phyB y otros fitocromos estables (Botto et al., 1995; Hennig et al., 2002; Arana et al 2014). Una característica fundamental de este tipo de respuesta es su reversibilidad: es posible inactivar el estímulo disparado mediante la acción de un pulso de RL (RLp). Es importante destacar que esta reversibilidad tiene lugar en un período de tiempo finito (Mancinelli, 1994).

Decidimos evaluar las respuestas R/RL reversibles en semillas que fueron embebidas en agar/agua y mantenidas en oscuridad por 3 días a 5°C. Luego recibieron un Rp, RLp o combinaciones de ambos (Rp+RLp y RLp+Rp) durante 20 minutos. Finalizados los pulsos, las semillas se mantuvieron en oscuridad durante tres días a 21°C, momento en que se contó la germinación.

Se encontraron diferencias significativas tanto dentro del factor luz ($p < 0,0001$) como del factor genotipo ($p < 0,0001$). La interacción entre ambos factores también resultó significativa ($p < 0,0001$). Las semillas salvajes Col-0 germinan un 98% en respuesta al Rp y un 42% en respuesta al RLp, indicando que el 56% de la población de semillas germina mediante la acción del phyB. Cuando las semillas Col-0 reciben un RLp y luego un Rp, la germinación se incrementa al 100% y no difiere de la respuesta frente a Rp pero sí de la del RLp. En el caso inverso, cuando reciben un Rp y luego un RLp, la respuesta disminuye al 70% (Fig. 12).

Las semillas que sobre-expresan la isoforma codificante de *At-RS31* (mRNA10X) germinan al 100% independientemente del tratamiento lumínico recibido. Las semillas RS31genOX (sobre-expresan el gen completo, exones e intrones) germinan un 100% en respuesta al Rp y un 57% en respuesta al RLp, siendo la fotorrespuesta del 43%. Cuando son irradiadas primero con RLp y luego con Rp, la germinación es del 98% (igual al tratamiento de R). En el caso inverso, cuando el último pulso es un RLp, la germinación es del 47% (igual al tratamiento de RLp) (Fig. 12).

Las semillas mutantes *rs31* germinaron en un 100% independientemente del tratamiento lumínico recibido (Fig. 12).

Estos datos nos permiten concluir que las semillas que sobre-expresan la isoforma codificante de *At-RS31* (mRNA10X) son insensibles a la luz. Paradójicamente, algo similar ocurre con las semillas mutantes *rs31* en este experimento particular.

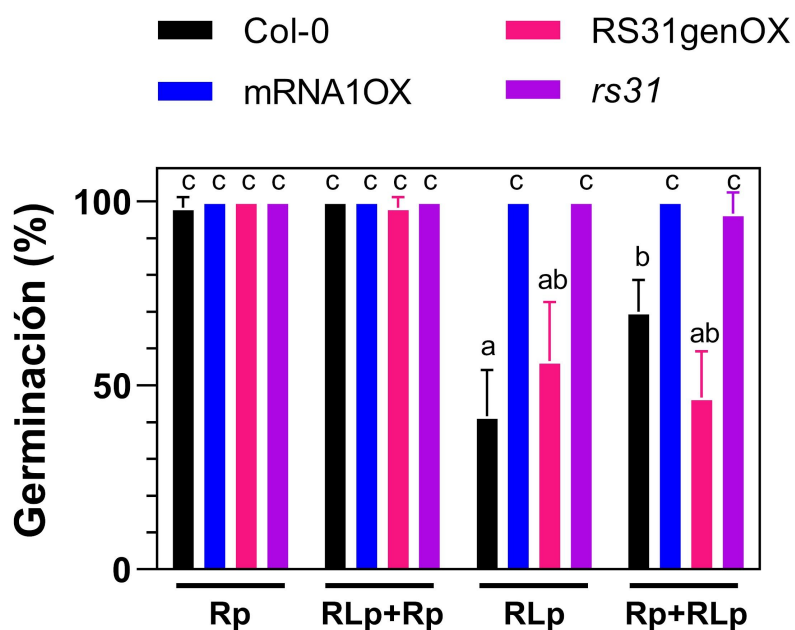


Figura 12: Las semillas que sobre-expresan la isoforma codificante de *At-RS31* (mRNA1OX) son insensibles a la luz. Las semillas se estratifican durante tres días previo a los tratamientos lumínicos. Cada barra representa la media \pm desvío estándar (n=3). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Rp: pulso de luz rojo; RLp: pulso de luz rojo lejano.

(B) Post-maduración en seco y salida de la dormición por luz y frío.

Sabiendo que factores como la post-maduración en seco y la estratificación disminuyen la dormición de las semillas (Benech-Arnold et al., 2000; Yamauchi et al., 2004; Penfield et al., 2005, Oh et al., 2005), diseñamos diferentes experimentos que nos permitieran evaluar cómo afectan el desempeño germinativo en semillas mutantes y líneas transgénicas de *At-RS31*.

Las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 21°C en fotoperíodo de día largo fueron almacenadas en un ambiente seco y en oscuridad a una temperatura constante de 20°C. A distintos tiempos de post-maduración de las semillas (0, 8, 14, 21, 28 y 35 días) se realizaron los ensayos de germinación. Para esto, las semillas fueron embebidas en agar/agua y mantenidas en oscuridad por 1 día a 5°C. Luego recibieron un Rp, un RLp o se mantuvieron durante 72hs en oscuridad a 21°C, momento en el que se contó la germinación.

A los cero días de post-maduración, las semillas salvajes Col-0 germinan más del 90% en respuesta al Rp. En estas mismas condiciones, las semillas mRNA1OX, RS31genOX y *rs31* germinan 100%. Tanto con el RLp como en oscuridad, la germinación de las semillas mRNA1OX es entre un 40% y 20% mayor que Col-0, respectivamente (Fig. 13).

A los ocho días de post-maduración, las semillas salvajes Col-0 germinan un 20%, mientras que las semillas mRNA1OX germinan un 80% en respuesta al Rp. La germinación disminuye drásticamente para ambos genotipos, con menos de un 10% de respuesta en RLp y 0% en oscuridad (Fig. 13).

A los 14 días, el 90% de las semillas Col-0 que reciben el Rp germinan y, por su parte, el 100% de las mRNA1OX. El RLp no promueve la germinación de las semillas salvajes Col-0 (menos del 10%) pero sí es suficiente para promover la germinación de las semillas mRNA1OX (~60%). En oscuridad, los niveles de germinación son despreciables para las semillas salvajes Col-0 (0%) y bajos para las semillas mRNA1OX (~20%) (Fig. 13).

A los 21 días de post-maduración, las semillas salvajes Col-0 germinan un ~90% en respuesta al Rp mientras que las mRNA1OX germinan 100%. Las semillas salvajes Col-0 germinaron 40% en respuesta al RLP mientras que las semillas mRNA1OX germinan un 90%. De manera similar, en oscuridad, la germinación de las semillas mRNA1OX es un 50% mayor que la de Col-0 (Fig. 13).

A los 28 días, la germinación de las semillas salvajes Col-0 es de un 60% y la de las mRNA1OX mayor al 80% cuando son irradiadas con un Rp. En respuesta al RLP y en oscuridad, las semillas salvajes Col-0 no germinan mientras que las mRNA1OX germinan entre un 20% y un 10 %, respectivamente (Fig. 13).

Las semillas salvajes Col-0 y las mRNA1OX irradiadas con Rp muestran el 100% de respuesta de germinación a los 35 días. En oscuridad y con el RLP, las semillas mRNA1OX germinan entre un 30% y 50% más que las semillas salvajes Col-0, respectivamente (Fig. 13).

Como tendencia se observa que las semillas RS31genOX y *rs31* se comportan como Col-0 en su respuesta de germinación en las condiciones evaluadas, independientemente de los días de post-maduración o tratamiento lumínico evaluados (Fig. 13).

Estos datos sugieren que la sobre-expresión de *mRNA1* altera la sensibilidad a la luz de las semillas, específicamente, las semillas mRNA1OX son hipersensibles a la luz.

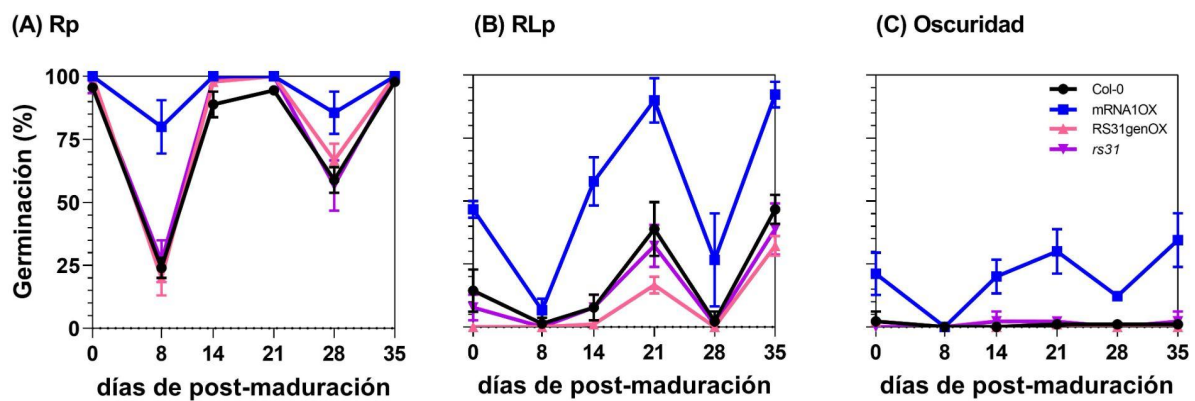


Figura 13: La isoforma *mRNA1* de *At-RS31* es hipersensible a la luz en semillas de *A. thaliana*. Respuesta de la germinación (%) en función de los días de post-maduración en semillas estratificadas en oscuridad durante un día e irradiadas con un (A) Rp, (B) RLP, y (C) su control en oscuridad. Los valores representan la media \pm desvío estándar (n=3).

Adicionalmente, evaluamos las respuestas de germinación cuando las semillas se estratifican durante un período mayor, de tres días. En semillas frescas recién cosechadas (0 días de post-maduración), el Rp indujo un 100% de germinación de las semillas salvajes Col-0 y de las mRNA1OX. Tanto en respuesta al RLP como en oscuridad, las semillas mRNA1OX germinan un 30% y 50% más que Col-0, respectivamente (Fig. 14).

Entre los ocho y 21 días de post-maduración inclusive, las semillas Col-0 y mRNA1OX mantienen los mismos niveles de germinación en respuesta al Rp (100%). A los ocho días, las semillas mRNA1OX irradiadas con un RLP o mantenidas en oscuridad germinan un 60% y un 30% más que las semillas salvajes Col-0, respectivamente (Fig. 14).

A los 14 días de post-maduración, cuando se irradian las semillas con un RLP, Col-0 germina un 15% mientras que las semillas mRNA1OX germinan un 80%. En oscuridad, las semillas mRNA1OX germinan un 60% más que Col-0 (Fig. 14).

A los 21 días de post-maduración, las semillas mRNA1OX germinan un 50% y un 70% más que Col-0 al ser irradiadas con un RLP o mantenidas en oscuridad, respectivamente (Fig. 14).

Tanto en semillas Col-0 como en mRNA1OX, los niveles de germinación son del 90% a los 28 días en respuesta al Rp. La germinación de mRNA1OX es un 60% y 70% mayor que mRNA1OX con un RLP y en oscuridad, respectivamente (Fig. 14).

A los 35 días de post-maduración, tanto las semillas salvajes Col-0 como las mRNA1OX germinan un 100% en respuesta al RLP. Las semillas mRNA1OX germinan un 70% y un 60% más que las semillas salvajes Col-0 cuando se irradian con un RLP o se mantienen en oscuridad, respectivamente (Fig. 14).

En líneas generales, las semillas transgénicas RS31genOX y mutantes *rs31* se comportan de forma similar a Col-0 en su respuesta de germinación en las condiciones evaluadas, independientemente de los días de post-maduración o tratamiento lumínico evaluados (Fig. 14).

Estos datos sugieren que las semillas mRNA1OX germinan independientemente de la luz y que el resto de los genotipos evaluados aún presentan dormición primaria y necesitan el estímulo de luz R para germinar.

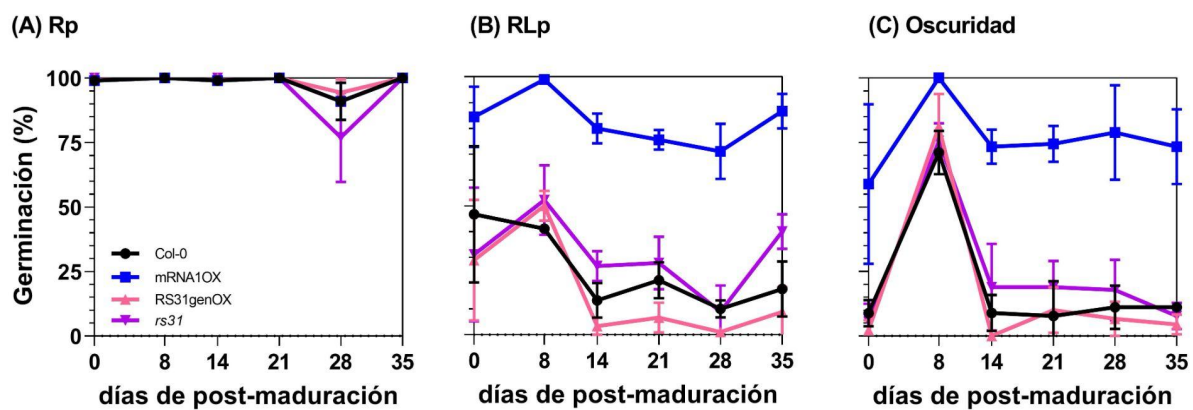


Figura 14: Las semillas mRNA1OX germinan independientemente de la luz. Respuesta de la germinación (%) en función de los días de post-maduración en semillas estratificadas en oscuridad durante tres días e irradiadas con un (A) Rp, (B) RLP, y (C) su control en oscuridad. Los valores representan la media \pm desvío estándar (n=3).

Estos datos sugieren que sobre-expresar la isoforma *mRNA1* del factor de *splicing* *At-RS31* afecta la respuesta de germinación de las semillas, y que la isoforma *mRNA1* es hipersensible al estímulo lumínico recibido. Al mismo tiempo se podría pensar que la isoforma *mRNA1* de *At-RS31* es un regulador positivo de la germinación.

(C) Post-maduración en seco y salida de la dormición por luz a 21°C.

Teniendo en cuenta que los niveles de dormición primaria que traen las semillas analizadas son relativamente bajos y que la estratificación por uno o tres días fue suficiente para romper con la misma, decidimos evaluar las respuestas de germinación a 21°C. Adicionalmente, en respuesta al pulso de luz R, las semillas de todos los genotipos germinan en porcentajes cercanos al 100%. Para ello, se utilizó otro *pool* semillas del mismo lote que en el apartado anterior (Post-maduración en seco y salida de la dormición por luz y frío) y se evaluó la germinación a los 0, 8, 14 y 28 días de

post-maduración. La única diferencia entre ambos tratamientos es la temperatura de incubación previa a los tratamientos lumínicos.

A los 0 días de post-maduración, la imbibición a 21°C en oscuridad por 24 horas y el Rp es suficiente para que germine más del 80% de las semillas salvajes Col-0 y el 100% de las semillas mRNA10X. En respuesta al RLp, las semillas mRNA10X germinan un 70% más que las Col-0. En oscuridad, esta diferencia es del 10% (Fig. 15).

A los 8 días de post-maduración, tanto las semillas salvajes Col-0 como las mRNA10X germinan al 100% en respuesta al Rp. Con un RLp, la germinación de Col-0 es del 20% y la de mRNA10X alcanza el 90%. Las semillas mRNA10X germinan un 50% más que las semillas salvajes Col-0 cuando son mantenidas en oscuridad (Fig. 15).

A los 14 días de post-maduración, el Rp promueve la germinación de las semillas salvajes Col-0 en un 90% y la de mRNA10X se mantiene al 100%. La germinación de las semillas salvajes Col-0 es nula en respuesta al RLp mientras que las mRNA10X germinan un 80%. En oscuridad, las semillas mRNA10X germinan un 70% más que las Col-0 (Fig. 15).

A los 28 días de post-maduración, todas las semillas germinaron un 100% en respuesta al Rp. Tanto en respuesta a un RLp como en oscuridad, la germinación de las semillas mRNA10X es un 60% mayor que Col-0 (Fig. 15).

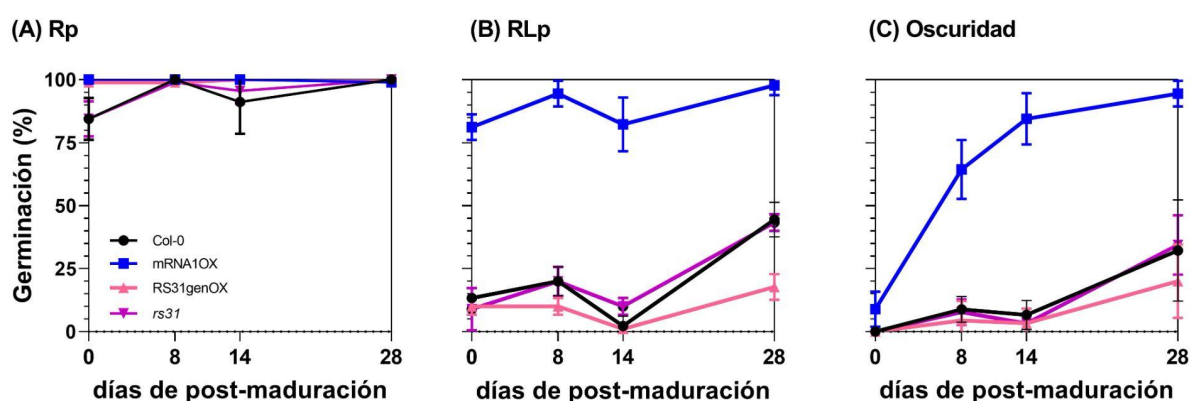


Figura 15: Las semillas mRNA10X germinan independientemente de la luz en semillas de *A. thaliana*. Respuesta de la germinación (%) en función de los días de post-maduración en semillas incubadas en oscuridad a 21°C durante un día e irradiadas con un (A) Rp, (B) RLp, y (C) su control en oscuridad. Los valores representan la media \pm desvío estándar ($n = 3$).

De manera similar a lo observado cuando las semillas se estratifican a bajas temperaturas, estos datos sugieren que las semillas mRNA10X germinan independientemente de la luz y que el resto de los genotipos evaluados aún muestran dormición primaria y necesitan el estímulo de luz R para germinar.

Adicionalmente, evaluamos las respuestas de germinación cuando las semillas se incubaron durante tres días a 21°C. En semillas frescas recién cosechadas, el Rp promueve la germinación de las semillas salvajes Col-0 en un 30% y un 100% en las semillas mRNA10X. La germinación de las semillas Col-0 fue nula tanto al ser irradiadas con un RLp, como en oscuridad. En contraste, las semillas mRNA10X germinaron un 50% y 10% en las respectivas condiciones (Fig. 16).

A los 8 días de post-maduración, la germinación de las semillas salvajes Col-0 es de un 60% mientras que las mRNA10X germinan un 100% en respuesta al Rp. Cuando se irradian con un RLp o se mantienen en oscuridad, las semillas salvajes Col-0 germinan ~10%. En esas condiciones las semillas mRNA10X germinan un 50% y un 70% más que Col-0, respectivamente (Fig. 16).

El Rp es suficiente para que germine el 90% de las semillas salvajes Col-0 a los 14 días de post-maduración, y el 100% de las mRNA10X. En respuesta al RLp, la germinación de las semillas salvajes Col-0 es nula y la de mRNA10X es del 60%. La germinación en oscuridad disminuye al 10% en Col-0 y cercana al 80% en las mRNA10X (Fig. 16).

Por último, el Rp promueve el 100% de germinación tanto en semillas salvajes Col-0 como en mRNA10X a los 28 días de post-maduración. Las semillas salvajes Col-0 germinan un 50% con un RLp y un 30% en oscuridad. Las semillas mRNA10X germinan más del 90% en ambas condiciones. La respuesta de germinación de las semillas RS31genOX y *rs31* mayormente no muestra un patrón alejado del de Col-0 en las diferentes condiciones analizadas (Fig. 16).

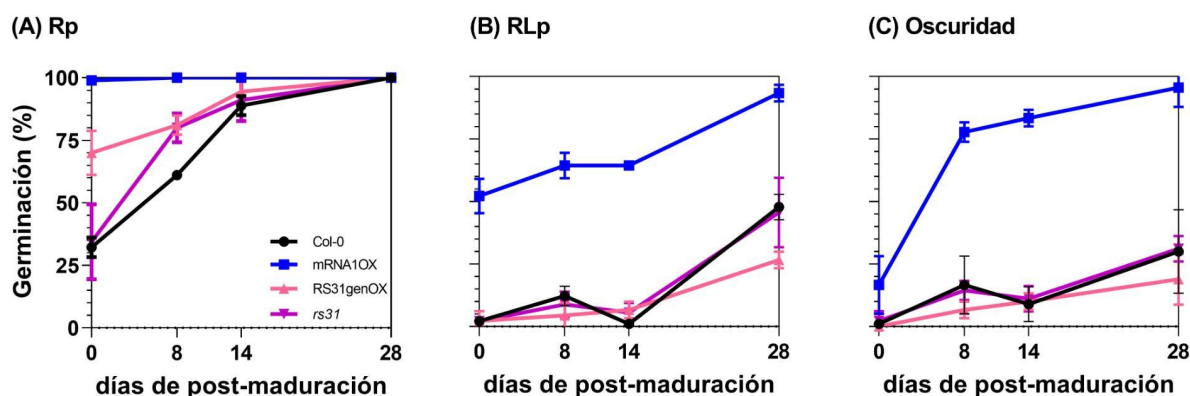


Figura 16: Las semillas mRNA10X germinan independientemente de la luz en semillas embebidas de *A. thaliana*. Respuesta de la germinación (%) en función de los días de post-maduración en semillas incubadas en oscuridad a 21°C durante tres días e irradiadas con un (A) Rp, (B) RLp, y (C) su control en oscuridad. Tratamiento 3dx21°C. Los valores representan la media \pm desvío estándar (n = 3).

Estos datos en conjunto nos permiten concluir que *mRNA1* tiene un rol clave en la dormición primaria (Figs. 13-16). Esto lo podemos observar al comparar los controles de luz RL y oscuridad vs la luz R. Las semillas salvajes Col-0, RS31OX y *rs31* tienen dormición primaria, reflejado en los bajos niveles de germinación en RLp y oscuridad, necesitando del estímulo lumínico de luz R para poder germinar. De forma interesante, esto no ocurre en semillas mRNA10X, que son capaces de germinar en valores cercanos al 100% independientemente del tratamiento lumínico.

Rol de *At-RS31* en la entrada en dormición secundaria por incubación en oscuridad a temperatura constante.

Analizamos la respuesta de las semillas a un pre-tratamiento a temperatura templada cuyo efecto es inducir la dormición. Para ello, se incubaron las semillas en oscuridad durante uno, tres y siete días a temperatura de 21°C. Luego del período de imbibición se expuso a las semillas a distintos tratamientos de luz (Rp y RLp) y se mantuvo un control en oscuridad.

Se observaron diferencias en los perfiles de respuesta según el tipo de luz utilizado. La imbibición en oscuridad por 1 día a 21°C y el Rp es suficiente para que germine más del 80% de las semillas salvajes Col-0 y el 100% de las semillas mRNA10X (Fig. 17, A).

Cuando las semillas se incuban durante 3 días se observa una disminución significativa de la respuesta del 50% respecto al tratamiento de un día en las semillas salvajes Col-0 mientras que las

semillas mRNA1OX mantienen la germinación al 100%, indicando que la incubación prolongada en oscuridad a temperatura constante de 21°C indujo la entrada en dormición secundaria en las semillas salvajes Col-0 pero no en las mRNA1OX en respuesta al Rp (Fig. 17, A). Estos niveles de germinación se mantuvieron iguales para ambos genotipos cuando las semillas se incubaron durante siete días (Fig. 17, A).

Los porcentajes correspondientes a la inducción por luz RL fueron casi nulos en semillas salvajes Col-0 en las tres condiciones de pre-tratamiento evaluadas mientras que las semillas mRNA1OX germinan un 81%, 52% y 23% a los uno, tres y siete días a 21°C, respectivamente (Fig. 17, B). Esto evidencia que la dormición secundaria sí puede establecerse en las semillas mRNA1OX.

Las semillas incubadas en oscuridad no germinaron en ninguno de los pre-tratamientos evaluados (Fig. 17, C).

Las semillas RS31genOX disminuyeron significativamente los niveles de germinación en un 30% en respuesta al Rp tanto en tres vs un día como en siete vs tres días, sugiriendo que entraron en dormición secundaria (Fig. 17, A). Las semillas mutantes *rs31* se comportan igual que las semillas salvajes Col-0 en todas las condiciones evaluadas (pre-tratamiento y luz) (Fig. 17, A-C).

Cuando las semillas Col-0, RS31genOX y *rs31* reciben un Rp, se observa una inducción de la dormición secundaria, reflejada en la disminución de la germinación, a medida que las semillas son incubadas más tiempo en oscuridad a 21°C (Fig. 17, A). En oposición, las semillas mRNA1OX no entran en dormición secundaria en las condiciones evaluadas en esta tesis. (Fig. 17, A). En oscuridad, los niveles de germinación de todos los genotipos evaluados se mantienen nulos hasta los 7 días (Fig. 17).

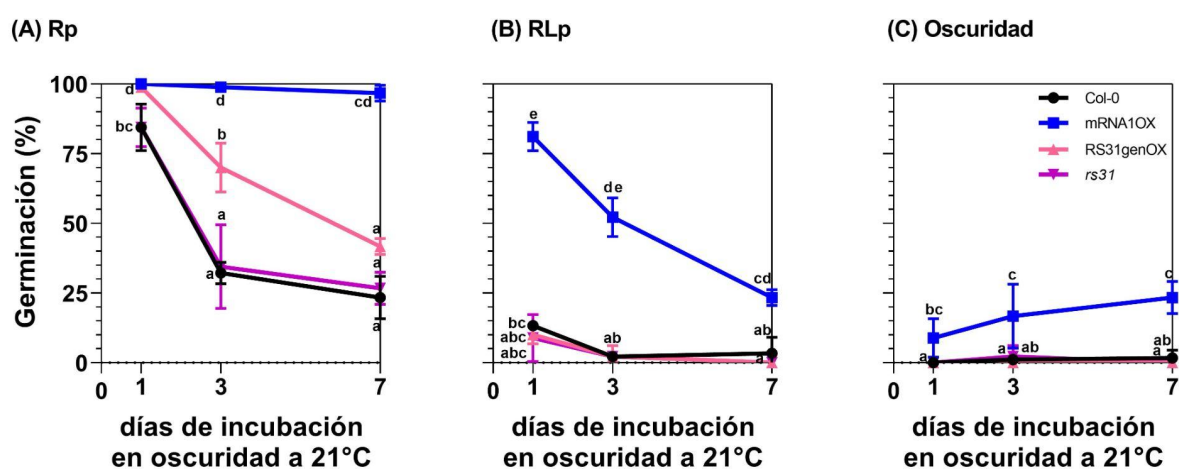


Figura 17: La isoforma *mRNA1* de *At-RS31* y su efecto sobre la dormición secundaria de las semillas embebidas de *A. thaliana*. Respuesta de la germinación (%) en función de los días de incubación en oscuridad a 21°C en semillas embebidas e irradiadas con un (A) Rp o (B) RLp, y (C) su control en oscuridad. Los datos representan la media \pm desvío estándar (n=3). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

En conclusión, los datos sugieren que la isoforma *mRNA1* también cumple un rol durante la entrada en dormición secundaria en estas condiciones. De forma interesante, esto solo ocurre cuando las semillas son irradiadas con un RLp y no con un Rp, pudiendo deberse al nivel de sensibilidad a la luz de las semillas.

Rol de *At-RS31* en otros estadios del ciclo de vida.

- Establecimiento temprano de la plántula en condiciones de estrés por ABA.

El momento de la germinación de la semilla determina en qué entorno crecerá la plántula y, por lo tanto, define si el establecimiento de la plántula será exitoso. Visto y considerando que la sobre-expresión de la isoforma codificante de *At-RS31* provoca un aumento en los porcentajes de germinación de las semillas embebidas de *A. thaliana* en diversas condiciones, incluso bajo tratamientos que no promueven la germinación efectivamente o que, muy por el contrario, inducen dormición secundaria, nos preguntamos cuál sería el comportamiento de las plántulas de los cuatro genotipos en las etapas tempranas de desarrollo. En particular, si las semillas mRNA10X germinan indiscriminadamente ¿realmente se favorece el posterior establecimiento de la plántula en tales situaciones ambientales? ¿afecta positivamente también el crecimiento y desarrollo de la plántula?

Para responder estas preguntas, las semillas se estratificaron durante tres días en oscuridad en placas de Petri conteniendo MS (control) o MS+ABA 1 μ M, y luego se transfirieron a luz blanca continua.

Al evaluar la germinación a las 48 horas, las comparaciones de medias entre los tratamientos ABA y MS mostraron diferencias significativas ($p=0,0001$). El factor genotipo también muestra diferencias significativas ($p<0,0001$). Además, la interacción entre genotipo y tratamiento es significativa ($p=0,003$). En ausencia de ABA (MS), la germinación de las semillas salvajes Col-0 es del 100% y las semillas mRNA10X y *rs31* responden de manera similar a las semillas salvajes (99% y 92% respectivamente, Fig. 18, B). En cambio, la germinación de las semillas RS31genOX fue significativamente menor que las de semillas salvajes Col-0 (85%)(Fig. 18, B).

En presencia de ABA, todas las semillas disminuyen significativamente su nivel de germinación. Las semillas salvajes Col-0 tienen una media del 3% de germinación mientras que las mRNA10X germinan un 40% más respecto a Col-0 (Fig. 18, B). No se encontraron diferencias significativas en la respuesta de las semillas RS31genOX y *rs31* respecto al genotipo salvaje (Fig. 18, B). Como es esperable, la presencia de ABA en el medio de incubación inhibe la germinación de semillas, siendo esta inhibición menor en las semillas mRNA10X (Fig. 18).

Estos resultados sugieren que la isoforma codificante de *At-RS31* afecta la sensibilidad de las semillas al ABA.

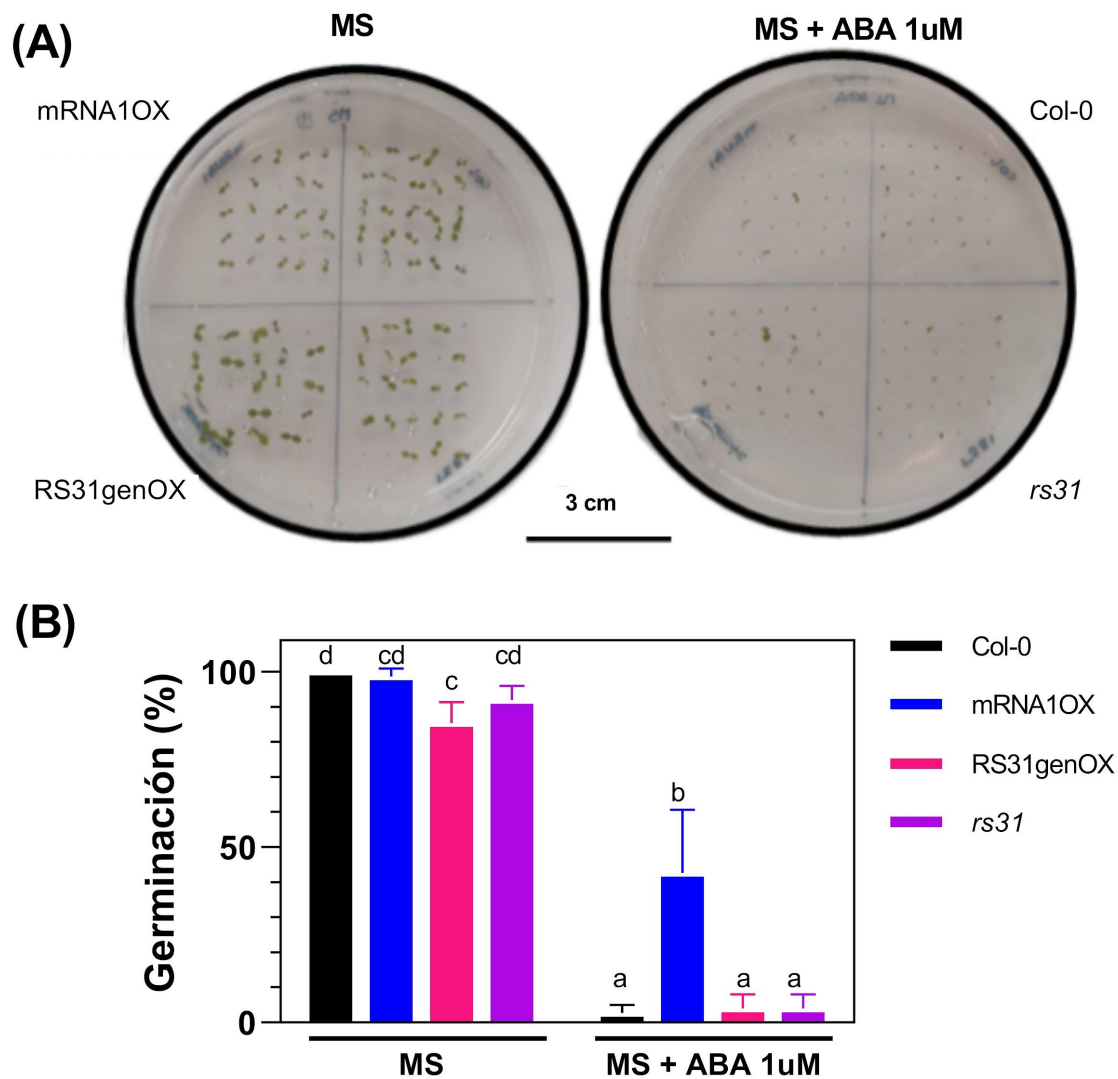


Figura 18: La isoforma *mRNA1* de *At-RS31* es un regulador positivo de la germinación bajo condiciones de estrés abiótico (ABA 1µM) en las semillas embebidas de *A. thaliana*. Germinación de las semillas a los 2 días de haber sido irradiadas con luz blanca continua, en ausencia del ABA (MS) o en su presencia (MS+ABA 1µM). (A) Placas de Petri con plántulas de los diferentes genotipos analizados. (B) Germinación (%). Cada barra representa la media ± desvío estándar (n=3). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

Respecto a la apertura de los cotiledones a los 7 días, este parámetro difiere significativamente entre el tratamiento que contiene ABA 1µM y medio MS control (p<0,0001), y entre genotipos (p=0,0002) (Fig. 19, B). Por su parte, la interacción entre genotipo y tratamiento también es significativa (p=0,002). En condiciones control (sin ABA), no hay diferencias significativas en la apertura de cotiledones entre plántulas salvajes Col-0 y mRNA1OX (p>0,05; Fig. 19, B). La apertura de cotiledones de plántulas RS31genOX es un 10% menor respecto al genotipo salvaje Col-0 (Fig. 19, B). En el caso de *rs31*, la apertura de cotiledones ronda el 88%, difiriendo significativamente de las plántulas salvajes Col-0, pero no de los genotipos restantes (Fig. 19, B).

El ABA redujo significativamente la apertura de cotiledones en todos los genotipos evaluados. La media de apertura en plántulas salvajes Col-0 es del 51%, mientras que en plántulas mRNA1OX es

significativamente menor (24%; Fig. 19, B). La apertura de cotiledones en plántulas mutantes *rs31* es significativamente menor respecto al genotipo salvaje ($p > 0,05$) y mayor respecto a plántulas *mRNA1OX* (Fig. 19, B). La apertura de cotiledones de plántulas *RS31genOX* no difirió del resto de los genotipos evaluados (Fig. 19, B).

En concordancia con lo reportado en bibliografía, la apertura de los cotiledones se ve afectada negativamente por la suplementación del ABA $1\mu\text{M}$ ($p < 0,0001$). Nuestra evidencia experimental sugiere que la apertura de los cotiledones disminuye tanto con la sobre-expresión de la construcción completa de *At-RS31* como con la de su isoforma *mRNA1* (Fig. 19). Nuestros datos sugieren que *At-RS31* juega un rol negativo en este proceso en las plántulas de *A. thaliana*.

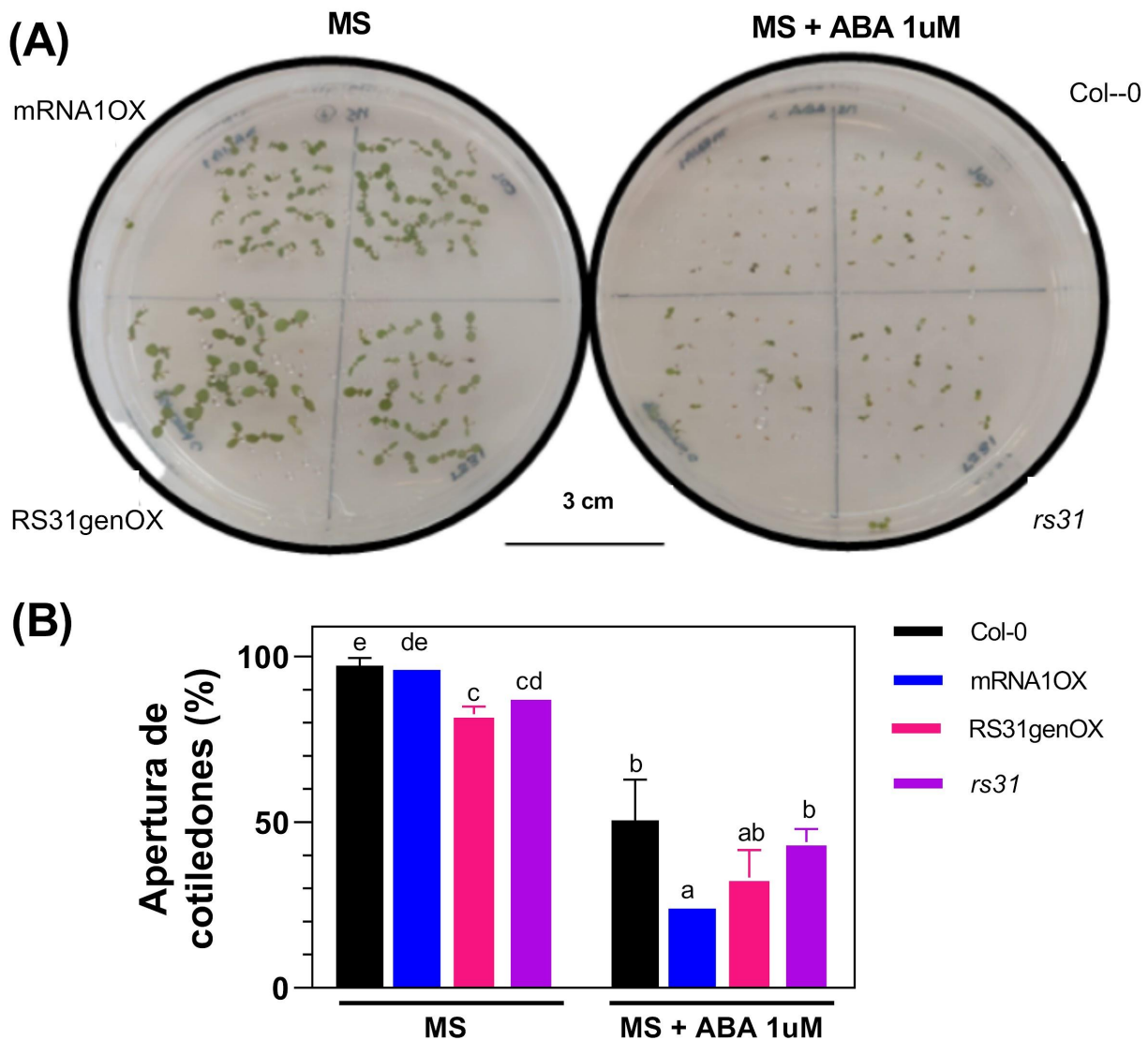


Figura 19: La isoforma *mRNA1* de *At-RS31* es un regulador negativo de la apertura de los cotiledones en las plántulas de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico (ABA $1\mu\text{M}$). Apertura de cotiledones de plántulas de 7 días crecidas bajo luz blanca continua, en ausencia de ABA (MS) o en su presencia (MS+ABA $1\mu\text{M}$). (A) Placas de Petri con plántulas de los diferentes genotipos analizados. (B) Apertura de los cotiledones (%). Cada barra representa la media \pm desvío estándar ($n=3$). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

La aparición de hojas verdaderas a los 9 días presenta diferencias significativas entre el tratamiento con ABA 1 μ M y el control MS ($p < 0,0001$), y también entre los genotipos ($p < 0,0001$; Fig. 20, B). La interacción entre ambos factores es significativa ($p = 0,0002$). En MS, el 100% de las plántulas salvajes Col-0 desarrolla hojas verdaderas mientras que este valor es significativamente menor en plántulas mRNA1OX respecto a Col-0 (91%, Fig. 20, B). El desarrollo de hojas verdaderas es del 87% en plántulas mutantes *rs31* y del 85% en plántulas RS31genOX y difieren significativamente de plántulas Col-0 (Fig. 20, B).

Al suplementar con ABA, solo el 29% de las plántulas salvajes Col-0 es capaz de desarrollar hojas verdaderas, y menos del 10% en las plántulas mRNA1OX (Fig. 20, B). En plántulas RS31genOX, solo el 16% desarrolla hojas verdaderas y tal respuesta no se diferencia ni de Col-0 ni de mRNA1OX (Fig. 20, B). El 32% de las plántulas mutantes *rs31* desarrolla hojas verdaderas y no se diferencia respecto del genotipo salvaje Col-0 pero sí respecto de genotipos mRNA1OX y RS31genOX (Fig. 20, B).

La aparición de las hojas verdaderas se ve afectada negativamente por la suplementación del ABA 1 μ M (Fig. 20). Sin embargo, la sobre-expresión de la isoforma *mRNA1* de *At-RS31* no permite que las plántulas desarrollen hojas verdaderas (Fig. 20, B), sugiriendo que la isoforma *mRNA1* de *At-RS31* juega un rol negativo en este proceso en las plántulas de *A. thaliana*.

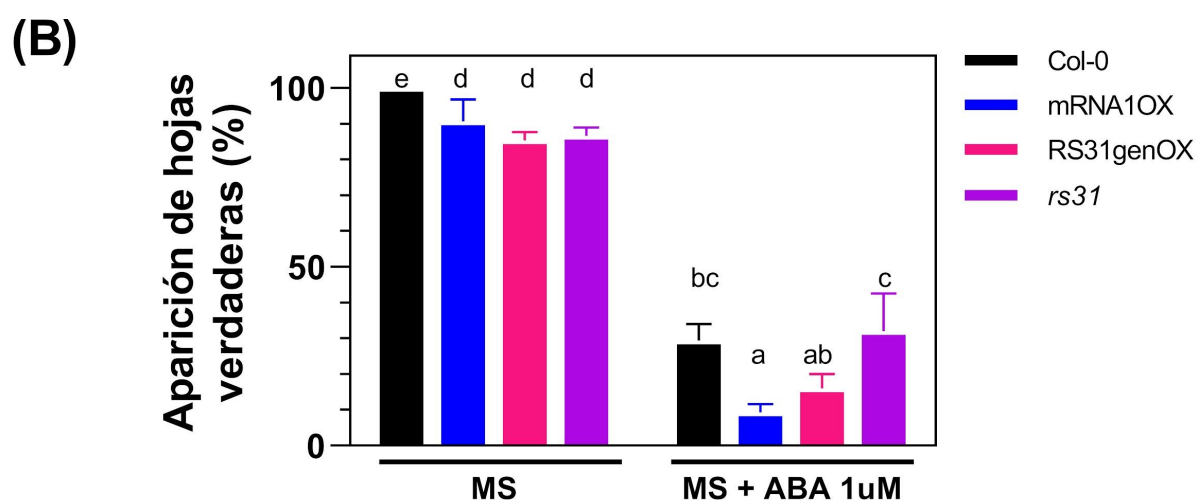
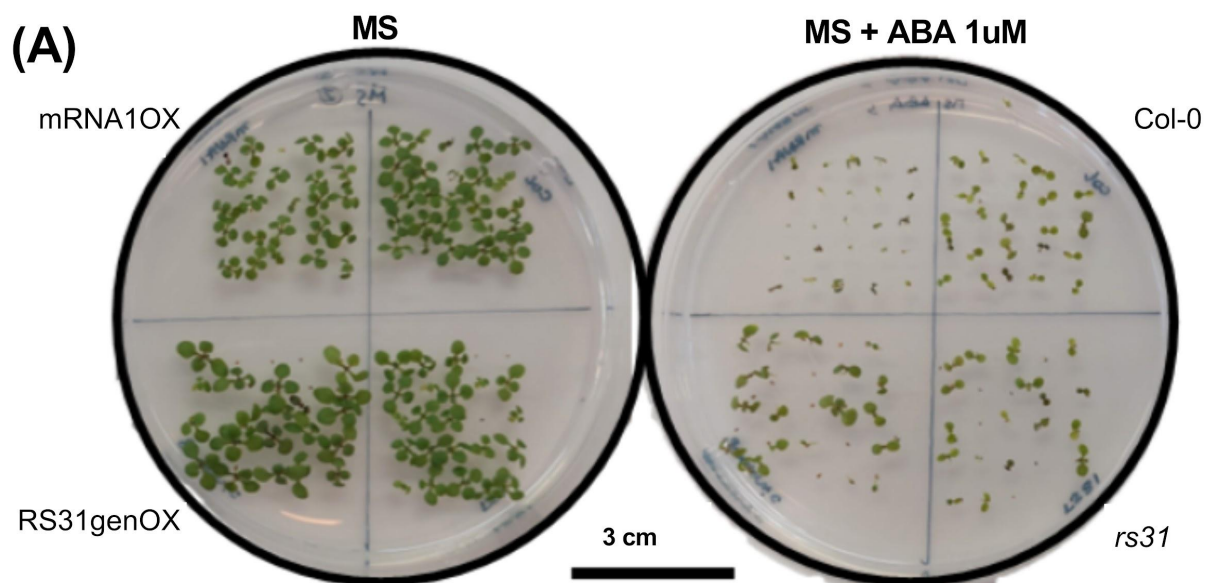


Figura 20: La isoforma *mRNA1* de *At-RS31* es un regulador negativo de la aparición de las hojas verdaderas en las plántulas de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico (ABA 1µM). Aparición de hojas verdaderas en plántulas de 9 días crecidas bajo luz blanca continua, en ausencia de ABA (MS) o en su presencia (MS+ABA 1µM). (A) Placas de Petri con plántulas de los diferentes genotipos analizados. (B) Aparición de hojas verdaderas (%). Cada barra representa la media ± desvío estándar (n=3). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

El conjunto de estos resultados, nos sugiere que la isoforma codificante de *At-RS31* afecta negativamente el establecimiento temprano de las plántulas de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico (ABA 1µM) (Fig. 19 y 20).

- Tiempo a floración.

El proceso de floración es relevante porque refleja el éxito reproductivo de la planta y asegura la supervivencia de la siguiente generación mediante la producción de semillas. Considerando que mRNA1OX muestra fenotipos en germinación y desarrollo/establecimiento temprano de plántulas,

nos preguntamos qué sucede en etapas más tardías, en particular, qué ocurre con la floración. Para esto, se realizó un conteo del número total de hojas principales (sin cotiledones) en la roseta hasta el desarrollo del botón floral de las plantas de los diferentes genotipos, tanto en fotoperíodo de día largo como en día corto.

El fotoperíodo en el cual crecen las plantas de los diferentes genotipos influye significativamente en la respuesta de las hojas a floración ($p < 0,0001$; Fig. 21, A). En el fotoperíodo de día corto, las plantas desarrollan más hojas que en día largo, independientemente del genotipo evaluado (Fig. 21, A). Asimismo, también hay diferencias entre algunos genotipos dentro de cada condición de fotoperíodo ($p < 0,0001$). Existe además una interacción significativa entre genotipo y fotoperíodo ($p = 0,003$). Por un lado, en el fotoperíodo de día corto, la media para Col-0 es de 32 hojas a floración mientras que las plantas mRNA1OX presentan un valor significativamente mayor (64 hojas; Fig. 21, A). El número de hojas a floración de las plantas RS31genOX (39 hojas) no difiere del genotipo salvaje Col-0 y es significativamente menor que el de plantas mRNA1OX (Fig. 21, A). La media de *rs31* es de 19 hojas a floración, valor significativamente menor que el resto de los genotipos evaluados.

Por otro lado, en el fotoperíodo de día largo, la media para las plantas salvajes Col-0 es de 15 hojas a floración mientras que las mRNA1OX presentan un valor significativamente mayor, de 42 hojas (Fig. 21, A). Las plantas RS31genOX y mutantes *rs31* tienen 15 y 16 hojas a floración en promedio, respectivamente (Fig. 21, A). Tales valores no difieren de plantas salvajes Col-0 pero sí de mRNA1OX.

Estos datos sugieren que la sobre-expresión de *mRNA1* retrasa el tiempo a floración (medido en número de hojas), independientemente del fotoperíodo evaluado en contraste con Col-0 (Fig. 21, A). En la fotografía de la Fig. 21, B se puede apreciar la floración más temprana de plantas salvajes Col-0, RS31genOX y *rs31* respecto de las plantas mRNA1OX, representado en un mayor número de hojas en la roseta de ésta última y que todavía no presenta botón floral en el momento en que se tomó la foto. En conclusión, la isoforma *mRNA1* de At-RS31 es un regulador negativo de la floración de *A. thaliana*.

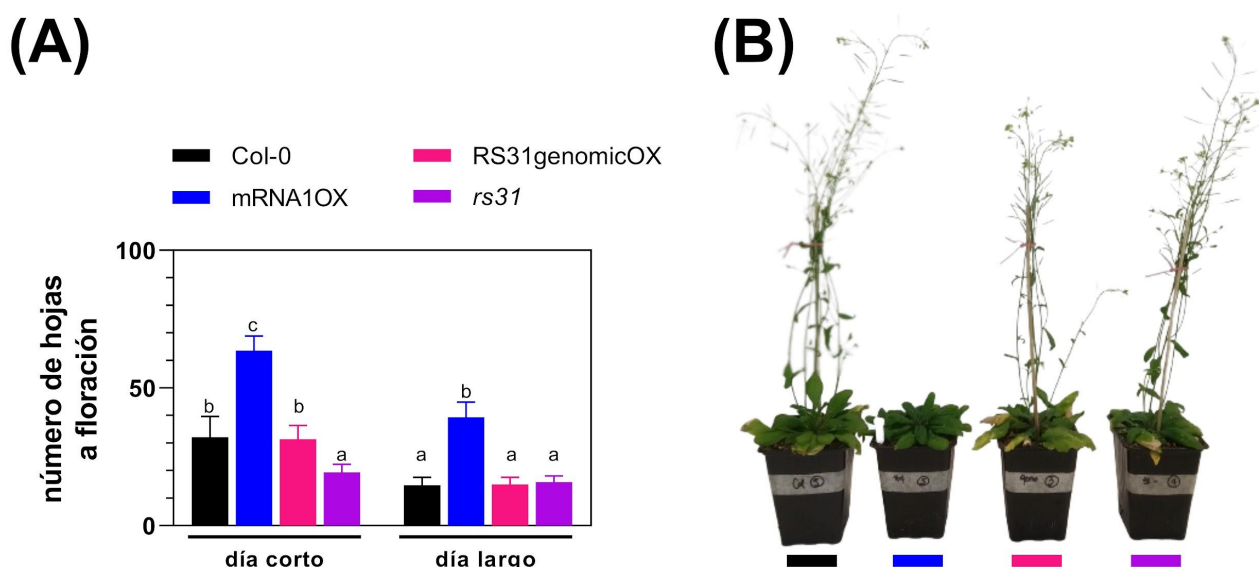


Figura 21: La isoforma *mRNA1* de At-RS31 es un regulador negativo de la floración de *A. thaliana*. (A) Medias del número de hojas a floración en fotoperíodo de día corto (8hs L/16hs O) y largo (16hs L/8hs O). (B) Fenotipo de plantas crecidas en día largo a 21°C. Cada barra representa la media \pm desvío estándar

(n=7). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

Como conclusiones de los resultados hasta aquí expuestos, podemos decir que las líneas transgénicas mRNA10X presentan fenotipo diferente que Col-0 en todos los estadios del ciclo de vida aquí evaluados, desde su germinación y desarrollo temprano hasta la floración. Es un regulador positivo de la germinación aún en condiciones subóptimas de luz (RLp, oscuridad) y afecta la sensibilidad de las semillas al ABA. Interesantemente, en las fases subsiguientes del desarrollo (establecimiento de plántulas) y crecimiento (floración), se desempeña como un regulador negativo.

Rol de At-RS31 en el SA frente a respuestas de reversibilidad R/RL durante la germinación.

Teniendo en cuenta que en algunos de los genotipos con los que trabajamos (Col-0) se modula la respuesta fisiológica de la germinación según el último pulso de luz que reciben las semillas y en otros no (mRNA10X, Fig. 12), quisimos evaluar qué ocurría a nivel molecular. Considerando además que *At-RS31* codifica un regulador de *splicing* alternativo y que esto podría repercutir en la respuesta de germinación *per se*, decidimos evaluar si los patrones de SA de genes de interés se modulan según las respuestas de reversibilidad R/RL. Con tal fin, se cosecharon semillas Col-0 y mRNA10X que fueron irradiadas con un Rp, RLp, Rp+RLp y RLp+Rp, y posteriormente se extrajo su ARN total. Luego se realizó RT-PCR de los genes de interés, para evaluar la abundancia de isoformas y calcular el índice de *splicing* (IS) como la abundancia de la isoforma más larga relativa a los niveles de todas las isoformas posibles para cada gen evaluado. Se realizó un ANOVA de dos factores (luz y genotipo) para el IS. En caso de diferencias significativas ($p<0,05$), se realizaron los contrastes a posteriori correspondientes con el método de Tukey, manteniendo el otro factor fijo.

En primer lugar, analizamos si los patrones de SA de genes involucrados en el proceso de *splicing* presentan alteraciones y si tales alteraciones son producto de la reversibilidad R/RL.

- *At-RS31*

Los *primers* de *splicing* fueron diseñados de manera tal de distinguir los eventos de *splicing* alternativo, el 3'SS alternativo que da lugar a la isoforma *mRNA3* y el 5'SS alternativo (flechas negras en Fig 22, A), que junto al 3'SS mencionado antes, da lugar al *mRNA2* (o la inclusión del exón alternativo). Los *primers* para identificar los transcriptos del gen *At-RS31* endógeno, y distinguirlos de la construcción sobre-expresante que llevan las mRNA10X, fueron diseñados considerando que la región no traducida 3' (3'UTR) de *At-RS31* no está presente en la construcción (flechas rosas en Fig. 22, A). Se presentan imágenes de los geles crudos ya que la cuantificación mostró mucha dispersión y no evidencia los cambios sustanciales que sí se ven en la electroforesis. En las condiciones evaluadas, se identificaron las isoformas principales, *mRNA3* y *mRNA1* (Fig. 22, D y E).

Al utilizar los *primers* para evaluar *splicing*, en las tres réplicas biológicas de semillas Col-0 irradiadas con un Rp, se observan bandas correspondientes a las isoformas *mRNA1* y *mRNA3*, siendo la primera la que más abundancia presenta (Fig. 22, D). En respuesta al RLp, se incrementa

la abundancia (intensidad) de las bandas atribuibles a *mRNA3* (Fig. 22, D). En los tratamientos lumínicos para evaluar reversibilidad, los cambios son muy leves. Cuando el último pulso que perciben las semillas es el R, hay una mayor proporción de *mRNA3*, y, contrariamente, cuando el último pulso percibido es el RL, ésta disminuye y predomina más *mRNA1* (Fig. 22, D). Es decir, se perciben cambios que responden a la reversibilidad R/RL. Estos resultados sugieren que en semillas Col-0 la luz R promueve el uso del 3'SS que deriva en el *mRNA1* y, en RL, se estimula el uso del 3'SS alternativo más proximal, que da lugar al *mRNA3*.

Entre las dos réplicas biológicas de semillas mRNA10X, se pueden encontrar disparidades en sus respectivos patrones de *splicing*. En general, solo una de las réplicas difiere marcadamente de Col-0. Tanto con un Rp como con un RLp, la réplica de la derecha (en el gel) presenta únicamente *mRNA1* (Fig. 22, D). En cambio, la de la izquierda presenta un patrón de *splicing* intermedio, similar al de las semillas salvajes Col-0. En esta línea que sobre-expresa el *mRNA1*, como es de esperar, ante un Rp como último (o único) pulso, predomina la isoforma *mRNA1*. Cuando el último (o único) pulso es un RLp, si bien predomina principalmente *mRNA1*, en la réplica de la derecha también se observa *mRNA3*. Brevemente, las semillas Col-0 muestran cambios en el patrón de SA de *At-RS31* según el último pulso de luz recibido. Si nos enfocamos en las mRNA10X más extremas, en contraste, no se observan cambios en los patrones de SA.

Con los *primers* para evaluar el patrón de SA del gen endógeno, en las tres réplicas biológicas de semillas Col-0 irradiadas con un Rp o con RLp, se observan principalmente bandas (productos de RT-PCR) correspondientes a *mRNA1* (Fig. 22, E). Al irradiar primero con un Rp y luego con un RLp, también abunda *mRNA1* (Fig. 22, E). Pero cuando el último pulso es el R, si bien predomina *mRNA1*, en alguna réplica se aprecian bandas leves correspondientes a *mRNA3* (Fig. 22, E). Evidentemente, por lo observado en Col-0 (sólo gen endógeno) con este par de *primers* no tenemos suficiente sensibilidad para observar cambios causados por la luz en estas condiciones. Entre las dos réplicas biológicas de semillas mRNA10X, en algunos casos hay incongruencias en sus respectivos patrones de SA. Sin embargo, en todos los tratamientos lumínicos, hay bandas que corresponden tanto a *mRNA3* como a *mRNA1*, siendo esta última isoforma más abundante (Fig. 22, E). Esto sugiere que la sobre-expresión de *mRNA1*, promueve el uso del 3'SS alternativo proximal de *At-RS31*. Es decir, la proteína RS31 regula el *splicing* de su propio gen (auto-regulación) en semillas de *A. thaliana*.

- *At-SR30*

Los *primers* fueron diseñados para discriminar los eventos de *splicing* alternativo de 3'SS alternativo en el intrón 10 (Fig. 22, B). El uso del 3'SS alternativo más proximal da lugar a la isoforma P2. El uso del 3'SS más distal, río abajo del anterior, da lugar a la isoforma P1. En estas condiciones, la corrida electroforética en geles de agarosa permitió identificar ambas isoformas (no se muestra) obteniendo los respectivos índices de *splicing*, IS (Fig. 22, F).

Para *At-SR30* existen diferencias entre algunas de las medias del IS de los genotipos ($p=0,0001$) (Fig. 22, F). Algunas medias de los tratamientos lumínicos difieren entre sí ($p<0,0001$) y además la interacción entre ambos factores es significativa ($p=0,03$)

En las semillas salvajes Col-0 que reciben un Rp, la media del IS de *At-SR30* (0,11) se reduce significativamente en un 40% en comparación con un RLp (0,50) (Fig. 22, F). Al irradiarlas primero con un Rp y después con un RLp, el IS se mantiene elevado en promedio (0,43) y es comparable a haber recibido solo un RLp, pero difiere de Rp (Fig. 22, F). La media del IS disminuye cuando recibe a lo último un Rp (0,12), siendo este valor semejante a un único pulso R, pero difiriendo

significativamente de RLp y de Rp+RLp (Fig. 22, F). La evidencia sugiere que en Col-0 el patrón de SA de *At-SR30* responde a la reversibilidad R/RL. La tendencia es que frente a la luz R el IS disminuye, y frente a luz RL aumenta. En términos moleculares, en el primer caso se estimula el uso del 3'SS distal de *At-SR30* cuya isoforma generada es más "liviana" (P1). En el segundo, se impulsa el evento 3'SS alternativo que da lugar a la isoforma más "pesada" (P2).

En las semillas mRNA10X, la media del IS de *At-SR30* es de 0,06 cuando son irradiadas con Rp (Fig. 22, F). En cambio, el IS aumenta cuando reciben un RLp en promedio en un 20% (0,28) y difiere significativamente de Rp (Fig. 22, F). La media del IS nuevamente disminuye cuando el último pulso es de luz R (0,04) pero es comparable a un Rp y no a un RLp (Fig. 22, F). Cuando el último pulso es de luz RL el IS aumenta en promedio (0,16) pero la respuesta es semejante a todos los tratamientos lumínicos (Fig. 22, F). En otras palabras, cuando se involucra a la luz R como último o único pulso, se promueve la generación de la isoforma P1. Con un único RLp, cambian los patrones de SA y se favorece el evento 3'SS alternativo que produce la isoforma P2. Esto último no se mantiene con Rp+RLp, dado que muestra una respuesta intermedia entre Rp y RLp. Los resultados indican que en semillas mRNA10X los cambios en el patrón de SA de *At-SR30* responden parcialmente a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

En síntesis, en las semillas Col-0 se regulan los patrones de SA de *At-SR30* según el último pulso lumínico recibido y mRNA10X sólo responde parcialmente. La sobre-expresión de *mRNA1* correlaciona con una mayor abundancia relativa de P1 en *At-SR30*, es decir, regularía su *splicing* y la respuesta a la luz de este gen.

- *At-U2AF65A*

Los *primers* fueron diseñados para discriminar los eventos de *splicing* alternativo en el intrón 11. La retención de todo el intrón 11 da lugar a la isoforma P2, y el uso de unos 3'SS alternativos dan lugar a las isoformas P1, el proximal, y P3, el distal (Fig. 22, C). En este caso, el IS se calculó como la abundancia de la isoforma P3 relativa a los niveles de todas las isoformas visualizadas. Estrictamente, no es un índice de *splicing*.

No existen diferencias significativas entre las medias del IS de los genotipos salvaje y mRNA10X ($p > 0,05$). Sin embargo, sí existen diferencias entre algunos de los tratamientos lumínicos ($p < 0,0001$). La interacción entre ambos factores no es significativa ($p > 0,05$).

- En las semillas Col-0 irradiadas con un Rp, la media del IS de *At-U2AF65A* es de 0,45 y aumenta significativamente al irradiarlas con un RLp hasta alcanzar 0,75 (Fig. 22, G). El IS continua siendo elevado en promedio (0,79) cuando primero reciben un Rp y luego un RLp, comparable a la respuesta frente a un único RLp, pero no a un Rp (Fig. 22, G). Cuando el último pulso es un Rp, la media del IS es de 0,64 y no presenta diferencias comparado con ningún tratamiento lumínico (Fig. 22, G). En los geles (no se muestran) se observa que el aumento en el IS está dado por la generación mayoritaria de la isoforma P3. También se observa que en respuesta a un Rp, se favorece la abundancia de la isoforma P1 y eso disminuye el IS. Por lo cual, se promueve el uso del 3'SS alternativo distal en estas condiciones. Por su parte, RLp+Rp muestra un patrón de SA intermedio, con mayor abundancia de P3 y menor abundancia de P1. Los datos sugieren que los cambios en el SA de *At-U2AF65A* en semillas salvajes Col-0 se modulan parcialmente según la reversibilidad R/RL durante la germinación.

La media del IS de *At-U2AF65A* para mRNA10X frente al Rp es de 0,42 (Fig. 22, G). Tal valor es significativamente menor comparando el IS en respuesta a un RLp (0,72) (Fig. 22, G). Cuando el tratamiento es Rp+RLp el IS (0,73) se mantiene comparable al RLp y distinto al Rp (Fig. 22, G). Al

irradiar primero con un RLp y luego con un Rp, el IS es de 0,56 y no se diferencia de ningún tratamiento lumínico (Fig. 22, G). En pocas palabras, el IS en el tratamiento con luz R difiere de aquellos que tienen como único o último pulso un RLp. En los geles (no se muestran) se observa un favorecimiento de la producción de P3 y eso aumenta en promedio el IS. En cambio, en respuesta a un Rp aumenta la generación de P1 por medio del uso del 3'SS alternativo distal, disminuyendo el IS en promedio. No obstante, el tratamiento RLp+Rp muestra un patrón de SA intermedio entre Rp y RLp, reflejado en el IS. Los resultados sugieren que el patrón de SA de *At-U2AF65A* en semillas mRNA10X cambian de forma limitada a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

En resumen, los patrones de SA de *At-U2AF65A* en semillas salvajes Col-0 y mRNA10X cambian de la misma forma, principalmente entre un Rp y RLp, siendo la reversibilidad más sutil en la respuesta observada.

El conjunto de estos resultados sugiere que durante la germinación por luz en semillas, los patrones de SA de algunos genes que codifican factores de *splicing* responden a la reversibilidad R/RL en semillas salvajes Col-0 (Fig. 22). No obstante, la sobre-expresión de *mRNA1* parece cambiar la regulación de los eventos de SA de estos genes, generando de alguna forma que los patrones de SA no cambien frente a la luz o lo hagan parcialmente (Fig. 22).

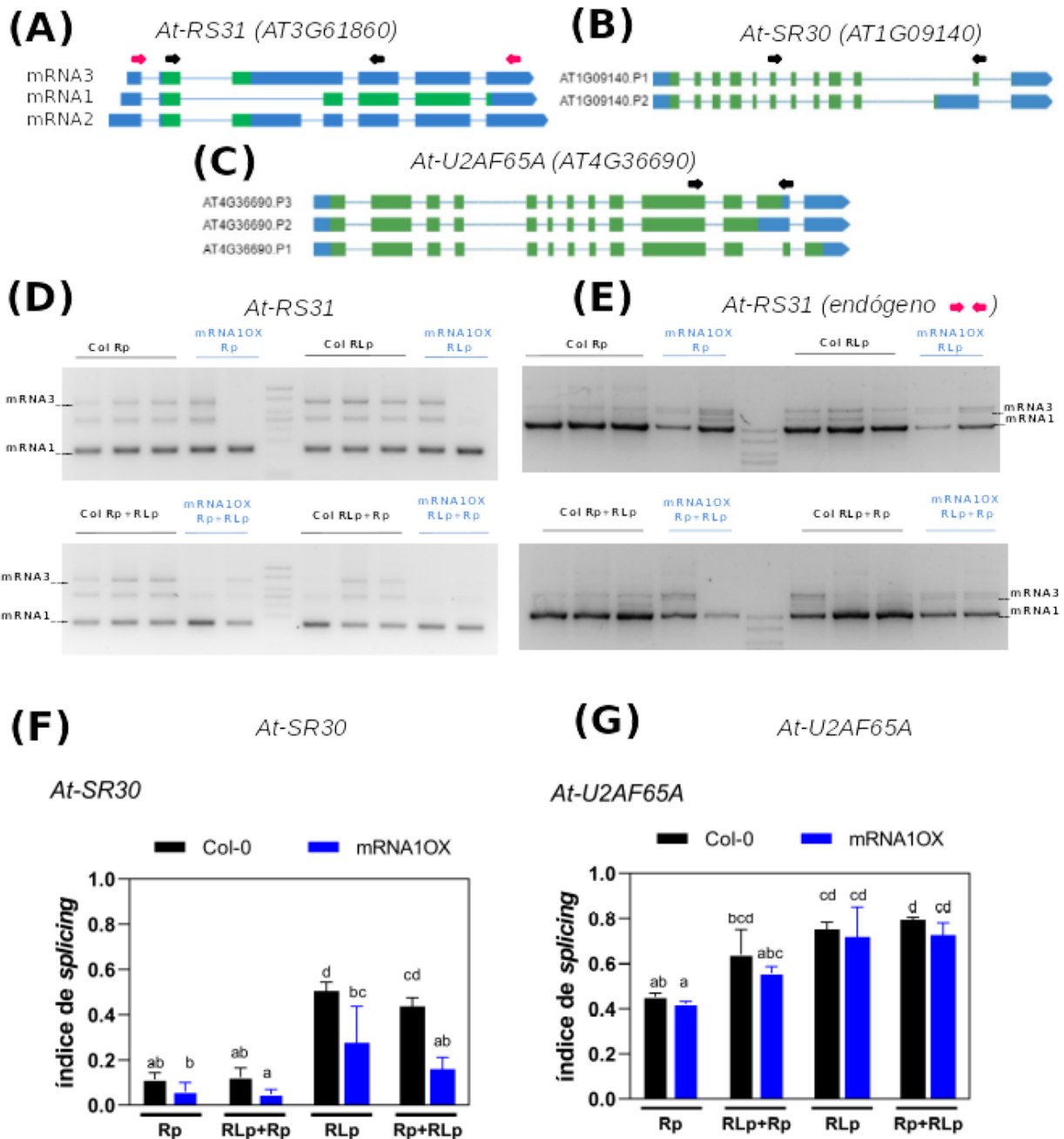


Figura 22: Genes que codifican factores de *splicing* y su respuesta de reversibilidad R/RL. Representación esquemática de las isoformas de los genes (A) *At-RS31*, (B) *At-SR30*, (C) *At-U2AF65A*. Las flechas negras representan la posición de los *primers* utilizados para la RT-PCR. En el caso de *At-RS31*, las flechas rosas indican la posición de los *primers* para visualizar las isoformas obtenidas a partir del gen endógeno y las flechas negras son utilizadas para ver todas las isoformas. Los exones se muestran como cajas (verde codificante, azul no codificante), los intrones se muestran como líneas. Modificado de <https://boxify.boku.ac.at/>. Imágenes representativas de geles de los patrones de *splicing* alternativo de (D) *At-RS31* y (E) *At-RS31* endógeno en respuesta a los tratamientos lumínicos. Se marcan las posibles isoformas visualizadas. Índice de *splicing* (IS) en función del tratamiento lumínico y los contrastes a posteriori correspondientes para (D) *At-RS31*, (E) *At-RS31* endógeno, (F) *At-SR30*, (G) *At-U2AF65A*. Cada barra representa la media \pm desvío estándar ($n_{Col-0}=3$; $n_{mRNA1OX}=2$). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

En segundo lugar, se examinaron los cambios en el SA de genes involucrados en la señalización por luz y ABA.

- *At-DRM1*

Los *primers* fueron diseñados para distinguir la isoforma 1, exclusión del exón 3, de la isoforma JS1, que lo incluye (Fig. 23, A).

Hay diferencias significativas entre las medias del IS del genotipo salvaje Col-0 y mRNA10X ($p=0,003$). Lo mismo ocurre para algunas de las medias del IS de los tratamientos lumínicos ($p=0,0006$). Sin embargo, la interacción entre ambos factores no es significativa ($p>0,05$).

En las semillas Col-0 irradiadas con un Rp, la media del IS de *At-DRM1* es de 0,62 y disminuye al irradiarlas con un RLp hasta alcanzar 0,45 (Fig. 23, C). El IS es en promedio de 0,53 cuando las semillas primero reciben un Rp y luego un RLp (Fig. 23, C). Cuando son irradiadas con un RLp y luego un Rp, la media del IS es de 0,63 (Fig. 23, C). Entre todas estas condiciones, sólo hay diferencias significativas entre los tratamientos RLp y RLp+Rp (Fig. 23, C). Para todas las demás, no se encuentran diferencias significativas. En los geles (no se muestran) se observa que se favorece la producción de JS1 por encima de la generación de 1. Es decir, es más frecuente el evento en el cual se incluye al exón 3, que el que lo excluye. La evidencia sugiere que el patrón de SA de *At-DRM1* en semillas Col-0 no cambia en respuesta a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

La media del IS de *At-DRM1* para mRNA10X en respuesta a un Rp es de 0,73 y de 0,59 en respuesta a un RLp (Fig. 23, C). Cuando el tratamiento es Rp+RLp la media del IS es de 0,56 y se mantiene comparable al RLp (Fig. 23, C). Al irradiar primero con un RLp y luego con un Rp, el IS es de 0,73 (Fig. 23, C). En todas estas condiciones, no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 23, C). En los geles (no se muestran) se puede observar un favorecimiento de la generación de la isoforma JS1 por encima de la producción de 1. Por lo tanto, el evento en el cual se incluye al exón 3 es más recurrente, que el que lo excluye. Los resultados indican que el patrón de SA de *At-DRM1* en semillas mRNA10X no cambia en respuesta a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

En resumen, los patrones de SA de *At-DRM1* en semillas salvajes Col-0 y mRNA10X no varían frente a los distintos tratamientos lumínicos (Fig. 23, C).

- *At-PIF6*

Los *primers* fueron diseñados para discriminar la isoforma 3, de exclusión del exón 3 (tomando como referencia a la isoforma 2), y la isoforma 2, que lo incluye (Fig. 23, B).

No hay diferencias significativas entre las medias del IS del genotipo salvaje Col-0 y mRNA10X ($p>0,05$) ni entre los tratamientos lumínicos ($p>0,05$). Sin embargo, la interacción entre ambos factores, es significativa ($p=0,03$).

En las semillas Col-0 irradiadas con un Rp, la media del IS de *At-PIF6* es de 0,88 y de 0,90 cuando se irradian con un RLp (Fig. 23, D). El IS es en promedio de 0,91 cuando las semillas primero reciben un Rp y luego un RLp (Fig. 23, D). Cuando son irradiadas con un RLp y luego un Rp, la media del IS es de 0,87 (Fig. 23, D). No existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos evaluados. En los geles (no se muestran) se pueden detectar tanto a la isoforma 2 como 3. La isoforma 2 es la más abundante, razón por la cual los IS son elevados. Es decir, en promedio es más frecuente la inclusión del exón 3 que su exclusión. Esto nos indica que el patrón de SA de *At-PIF6* en semillas Col-0 no cambia en respuesta a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

En semillas mRNA10X irradiadas con Rp, la media del IS es de 0,85 y de 0,89 cuando reciben un RLp (Fig. 23, D). Si reciben un RLp y después un Rp, el IS es 1 en promedio (Fig. 23, D). Cuando el último pulso es el RLp, el IS es 0,90 en promedio (Fig. 23, D). Entre todas estas condiciones, sólo hay diferencias significativas entre los tratamientos Rp y RLp+Rp (Fig. 23, D). Para todas las demás, no se encuentran diferencias significativas. En los gels (no se muestran) se observa que están presentes la isoforma 2 y 3. La isoforma 2 que es más pesada, se favorece en todas las condiciones lumínicas por encima de la 3, lo cual se ve reflejado en el IS elevado. La evidencia muestra que el patrón de SA de *At-PIF6* en semillas mRNA10X no cambia en respuesta a la reversibilidad R/RL durante la germinación.

Los tratamientos lumínicos no tienen efecto sobre los patrones de SA de *At-PIF6* en semillas salvajes Col-0 y mRNA10X.

Esta serie de resultados en conjunto nos sugiere que tanto en semillas salvajes Col-0 como en semillas mRNA10X el SA de *At-DRM1* y *At-PIF6* no se ve afectado por los tratamientos de reversibilidad R/RL durante la germinación (Fig. 23, D).

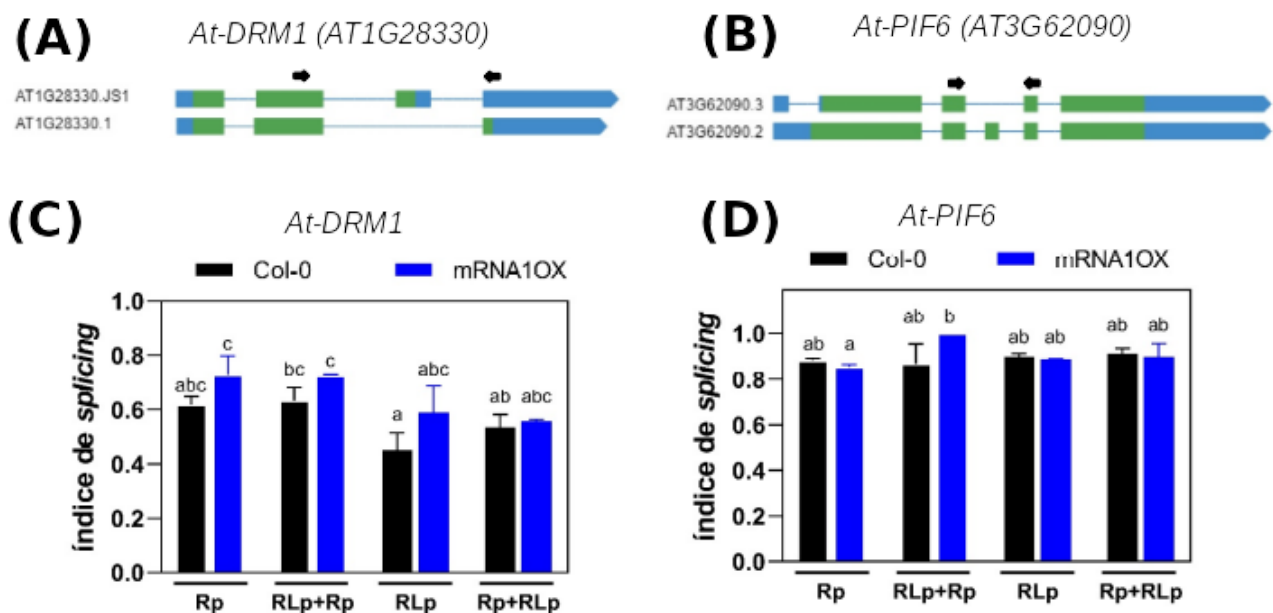


Figura 23: El SA de *At-DRM1* y *At-PIF6* no se ve afectado por los tratamientos de reversibilidad R/RL durante la germinación de las semillas salvajes Col-0 y mRNA10X. Genes que codifican componentes involucrados en (A, C) la dormición (*At-DRM1*) y (B, D) la señalización por luz (*At-PIF6*). (A-B) Representación esquemática de las isoformas. Las flechas negras representan la posición de los *primers* utilizados para la RT-PCR. Los exones se muestran como cajas (verde codificante, azul no codificante), los intrones se muestran como líneas. Modificado de <https://boxify.boku.ac.at/>. índice de *splicing* (IS) en función del tratamiento lumínico y los contrastes a posteriori correspondientes para (C) *At-DRM1*, (D) *At-PIF6*. Cada barra representa la media \pm desvío estándar ($n_{\text{Col-0}}=3$; $n_{\text{mRNA10X}}=2$). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

En tercer lugar, se analizaron genes involucrados en la vía del ABA y la señalización por azúcares, y su posible respuesta de reversibilidad al R/RL a nivel del SA.

- *At-ABI3*

En estas condiciones, sólo se identificó la isoforma P1 (Fig.24, A), por lo que no se pudo calcular el IS (Fig.24, G). Tanto en semillas salvajes Col-0 como en semillas mRNA10X, *At-ABI3* está presente durante la germinación en todos los tratamientos lumínicos en su isoforma P1.

- *At-ANAC060*

Resultó interesante analizar este gen, dado que reduce la sensibilidad al ABA, y además, su expresión es inducida por la cascada de señalización de azúcar-ABA (Li et al., 2014). El diseño de *primers* no permite diferenciar las isoformas c1 y c2 por separado dado que los tamaños de los productos de RT-PCR difieren en 20 pares de bases. Estas isoformas se generan a partir de 3'SS alternativos en el intrón 3/exón 4 (Fig. 24, B) Se visualiza una única banda que puede corresponder tanto a c1 como a c2 (Fig. 24, H). Tampoco se pudo calcular el IS por tal razón. *At-ANAC060* se puede encontrar en semillas salvajes Col-0 y mRNA10X en los diferentes pulsos recibidos como c1 y/o c2.

- *At-SnRK2.3*

El diseño de *primers* permite distinguir entre la isoforma s1 (no se muestra) que se genera la retención del intrón 2, y las isoformas P1 y c1 en las cuales tal intrón se escinde en el ARNm maduro (Fig.24, C). No se visualiza la isoforma s1, pero sí una única banda correspondiente a c1 y/o P1 en todos los tratamientos de luz (Fig.24, I). Por eso, no se pudo calcular el IS para este gen. Durante la germinación, *At-SnRK2.3* está presente en semillas Col-0 y mRNA10X, independientemente del pulso recibido, como isoforma c1 y/o P1.

- *At-ABI5*

El diseño de *primers* es útil para discriminar entre la isoforma P3 que se produce por retención del intrón 4 y la isoforma P1 generada por la escisión del mismo (Fig.24, D).

No hay diferencias significativas entre las medias del IS de los genotipos salvaje Col-0 y mRNA10X ($p>0,05$) ni entre las medias del IS de los tratamientos lumínicos ($p>0,05$). Tampoco existe interacción entre ambos factores ($p>0,05$).

Los valores del IS rondan entre 0,09 y 0,14, y por lo mencionado anteriormente, no difieren entre sí (Fig. 24, J). En los geles (no se muestran) se pueden detectar tanto la isoforma P3 como P1. Esta última es la más abundante, y por eso el IS en promedio es bajo, dado que es la isoforma más liviana. En pocas palabras, durante la germinación, el patrón de SA de *At-ABI5* en semillas Col-0 y mRNA10X no se altera en respuestas de reversibilidad R/RL.

- *At-HAB1*

El diseño de *primers* facilita la discriminación entre la isoforma P2 producida por retención del intrón 4 y la isoforma P1 generada por la escisión del mismo (Fig. 24, E).

No hay diferencias significativas entre las medias del IS de los genotipos salvaje Col-0 y mRNA10X ($p>0,05$). Algunas de las medias del IS de los tratamientos lumínicos difieren entre sí ($p>0,05$). No existe interacción significativa entre ambos factores ($p>0,05$).

En las semillas Col-0 irradiadas con un Rp, la media del IS de *At-HAB1* es de 0,07 y al irradiarlas con un RLp sube significativamente hasta alcanzar 0,20 (Fig. 24, K). El IS es en promedio 0,18 cuando las semillas primero reciben un Rp y luego un RLp, lo cual es comparable a un RLp pero no a un Rp (Fig. 24, K). Cuando son irradiadas con un RLp y luego un Rp, la media del IS es de 0,13 y

no se diferencia de ningún otro tratamiento lumínico (Fig. 24, K). En otras palabras, el Rp disminuye el IS de *At-HAB1* y se diferencia significativamente de un único o último pulso de luz RL. Sin embargo, RLP+Rp presenta una respuesta intermedia entre Rp y RLP. En los geles (no se muestran) se observa que la disminución en el IS está dada por la producción mayoritaria de la isoforma P1 y muy poca abundancia de P2 en Rp. Es decir, se favorece la eliminación del intrón 4. En cambio, ante un RLP, se favorece un poco más la retención del intrón 4 dando una mayor abundancia de la isoforma P2 y aumentando el IS. Por su parte, RLP+Rp muestra un patrón de SA intermedio entre el de Rp y RLP/Rp+RLP. Molecularmente, la luz RL favorece la retención del intrón 4. Los datos sugieren que los cambios en el SA de *At-HAB1* en semillas salvajes Col-0 se modulan parcialmente según la reversibilidad R/RL durante la germinación (Fig. 24, K).

En semillas mRNA10X los IS en promedio toman valores comprendidos entre 0,06 y 0,17, y son semejantes entre sí. En los geles (no se muestran) están las isoformas P1 y P2, siendo P1 la más predominante. Es decir, que ante la sobre-expresión de mRNA1, se anulan los cambios en el SA de *At-HAB1* por luz observados en Col-0 (Fig. 24, K).

En resumen, durante la germinación el patrón de SA de *At-HAB1* se ve afectado en términos generales respondiendo a la reversibilidad R/RL en Col-0, pero con la sobre-expresión de *mRNA1* estas alteraciones se cancelan, aunque la tendencia general de cambios es similar (Fig. 24, K)

- *At-SnRK2.2*

El diseño de *primers* posibilita distinguir la isoforma ID4 generada por la retención de los intrones 3 y 4, y la isoforma 2 en la cual se escinden (Fig. 24, F). No hay diferencias significativas entre las medias del IS de los genotipos salvaje y mRNA10X ($p>0,05$) ni entre las medias del IS de los tratamientos lumínicos ($p>0,05$). Tampoco existe interacción entre ambos factores ($p>0,05$).

Los valores del IS en promedio rondan entre 0 y 0,04, y por lo mencionado anteriormente, no difieren entre sí (Fig. 24, L). En los geles (no se muestran) se puede observar tanto a la isoforma ID4 como 2. Esta última es la más abundante, y por eso el IS en promedio es bajo, dado que es la isoforma más liviana. Con estos resultados se sugiere que es mayoritario el *splicing* canónico. El evento de RI de los intrones 3 y 4, si lo hay, es muy poco abundante.

En pocas palabras, durante la germinación, el patrón de SA de *At-SnRK2.2* en semillas Col-0 y mRNA10X no se altera en respuestas de reversibilidad R/RL.

En líneas generales, este grupo de genes asociados a la vía de transducción de señales del ABA y de azúcares, no se ve regulado por la reversibilidad R/RL al nivel del SA, tanto en semillas salvajes Col-0 como mRNA10X. La excepción viene dada por *At-HAB1* que en Col-0 sí altera su patrón de SA según la luz recibida, pero en mRNA10X estos cambios se suprimen. Por lo tanto, la sobre-expresión de mRNA10X podría estar influyendo de alguna manera la regulación del SA de *At-HAB1*.

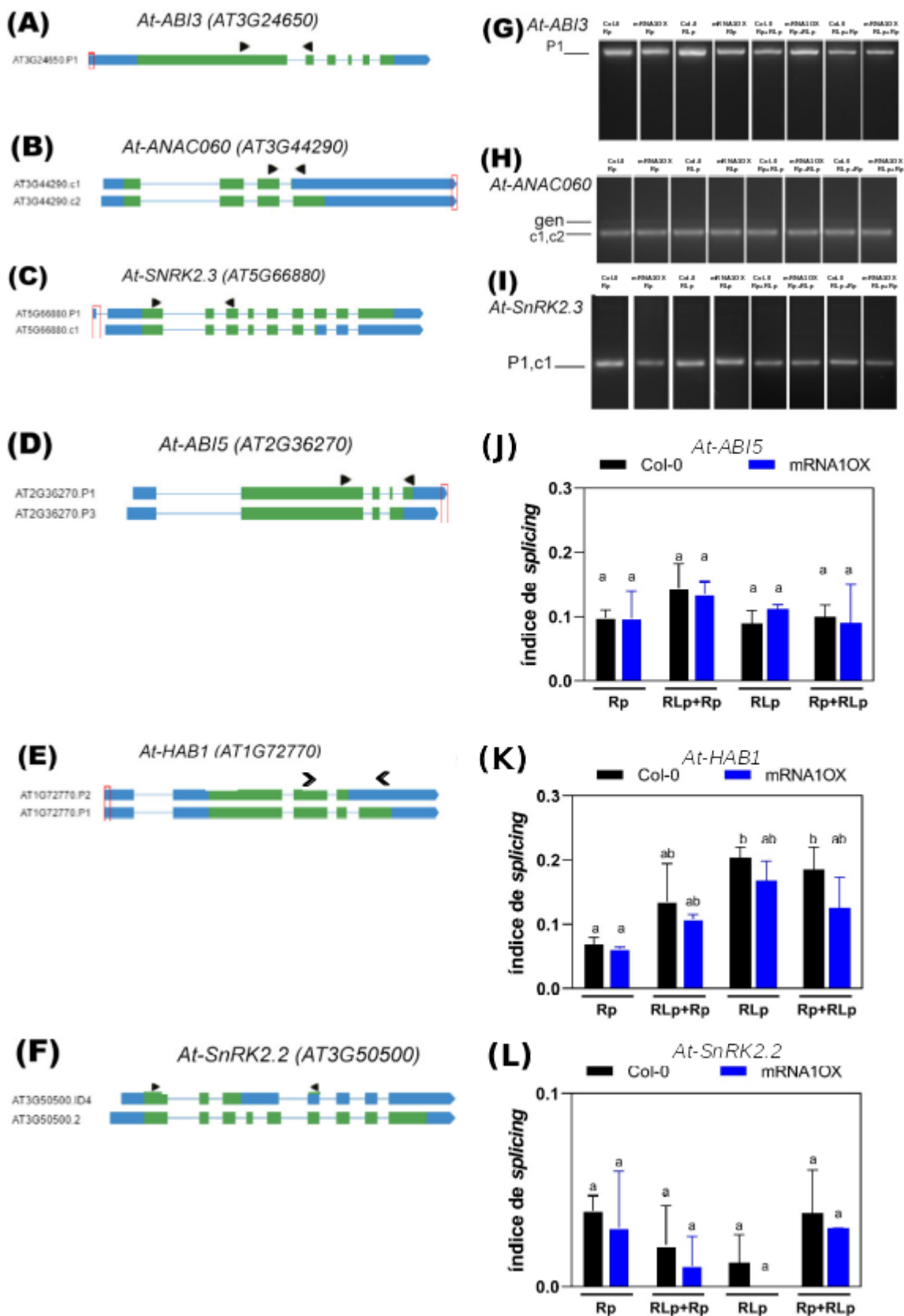


Figura 24: Genes que codifican componentes involucrados en la señalización por el ABA y azúcares durante la germinación y su respuesta de reversibilidad R/RL. Representación esquemática de las isoformas de los genes (A) *At-ABI3*, (B) *At-ANAC060*, (C) *At-SnRK2.3*, (D) *At-ABI5*, (E) *At-HAB1*, (F) *At-SnRK2.2*. Las flechas negras representan la posición de los primers utilizados para la RT-PCR. Los exones se muestran como cajas (verde codificante, azul no codificante), los intrones se muestran como líneas. Modificado de <https://boxify.boku.ac.at/>. Imágenes representativas de geles de los patrones de expresión de (G) *At-ABI3*,

(H) *At-ANAC060* y (I) *At-SnRK2.3* en respuesta a los tratamientos lumínicos. Se marcan las posibles isoformas visualizadas, gen = genómico. Índice de splicing (IS) en función del tratamiento lumínico y los contrastes a posteriori correspondientes para (J) *At-ABI5*, (K) *At-HAB1* y (L) *At-SnRK2.2*. Cada barra representa la media \pm desvío estándar ($n_{Col-0}=3$; $n_{mRNA10X}=2$). Las diferencias se detectaron mediante ANOVA de dos factores seguido de test de Tukey. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).

Es destacable que lo que se observa a nivel fisiológico durante la germinación (Fig. 12), también ocurre a nivel del SA de algunos de los genes evaluados, respondiendo según el último pulso de luz recibido ($Rp=RLp+Rp$ y $RLp=Rp+RLp$). Aquellos genes que responden contundentemente a la reversibilidad R/RL a nivel molecular durante la germinación en Col-0, alterando sus patrones de SA (*At-RS31*, *At-SR30*) parecen perder esta regulación en las semillas mRNA10X. Los resultados sugieren que la sobre-expresión de la isoforma *mRNA1* modifica directa o indirectamente el SA de ciertos genes, haciendo que sus patrones de SA se vean alterados. Por lo tanto, *mRNA1* (*At-RS31* o la proteína RS31 en sí) parece desempeñar un rol regulatorio directo o indirecto en las respuestas de reversibilidad R/RL en semillas de *A. thaliana*.

DISCUSIÓN

Rol de *At-RS31* durante la salida de la dormición y promoción de la germinación por luz en semillas de *A. thaliana*.

Para evaluar el rol de *At-RS31* utilizamos diferentes genotipos, uno que sobre-expresa una construcción con el gen completo (RS31genOX), uno que sobre-expresa sólo la isoforma codificante (mRNA1OX) y una mutante por inserción de T-DNA en el quinto exón del gen (*rs31*). El objetivo principal fue dilucidar el rol del gen, y más particularmente de la proteína SR (codificada por la isoforma mRNA1) en la semilla. Cabe destacar que no analizamos niveles de proteína *At-RS31* sino que asumimos que una mayor cantidad de *mRNA1* implica una mayor cantidad de proteína. Nos enfocamos en ciertos procesos que nos resultaban de gran interés: la dormición y la germinación mediada por la luz.

Por eso, en primer lugar analizamos las respuestas germinativas de los diferentes genotipos frente a la luz. Específicamente, quisimos ver qué ocurría con las respuestas del tipo R/RL reversibles. Las semillas salvajes Col-0 y RS31genOX responden con una alta germinación al ser irradiadas con un Rp y esa respuesta disminuye con un RLp (Fig. 12). Por su parte, las semillas mRNA1OX y mutantes *rs31* parecen no responder a la luz, manteniendo elevada su germinación en todas las condiciones evaluadas (Fig. 12). Sin embargo, el comportamiento de las semillas *rs31* en este experimento en particular no es consistente con los experimentos subsiguientes (Fig. 13-18), en los cuales observamos que las respuestas se asemejan a las de las semillas salvajes Col-0. Esto puede deberse a que para el ensayo de la Fig. 12 se utilizaron semillas con mayores tiempos de post-maduración que en el resto de los experimentos. Cabe aclarar que cada experimento se realizó con semillas de los cuatro genotipos de la misma cohorte. Es decir, semillas derivadas de plantas madres cultivadas en condiciones idénticas, cosechadas al mismo tiempo y con post-maduración uniforme. Por lo tanto, las diferencias no pueden estar dadas por la desigualdad del contexto ambiental en el que las semillas maduraron. Al momento de largar el ensayo, llevaban aproximadamente cinco meses de post-maduración y se utilizó por razones de falta de material vegetal. En tales condiciones, podemos pensar que las semillas mutantes *rs31* germinaron igual que las mRNA1OX, ya que pudieron haber perdido la dormición primaria o su sensibilidad a la luz.

En segundo lugar, analizamos la salida de la dormición primaria de las semillas, evaluando factores que promueven su ruptura (post-maduración en seco, temperatura y luz). Observamos que la estratificación a 5°C durante tres días y a 21°C durante 1 y 3 días promueve la germinación de las semillas mRNA1OX independientemente del estímulo lumínico, es decir, las semillas no muestran dormición primaria, en oposición a lo que ocurre con el resto de los genotipos, que aún tienen dormición primaria y necesitan del estímulo de luz R para poder germinar (Fig. 14-16). Esto sugiere que *mRNA1* tiene un rol clave durante este proceso. En este sentido, se puede observar que las semillas mRNA1OX sí tienen dormición primaria en el inicio de la post-maduración (Fig. 16 RL y Oscuridad), y esta dormición se va perdiendo a medida que avanzan los días, lo que se traduce en un aumento de las semillas germinadas. En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la isoform *mRNA1* de *At-RS31* favorece la salida de la dormición primaria, *At-RS31* sería un regulador positivo de la ruptura de la dormición. En el futuro sería interesante evaluar el

tiempo de post-maduración requerido para que ocurra la salida de la dormición primaria en las semillas RS31genOX y mutantes *rs31*.

La bibliografía propone que el mecanismo que subyace al efecto de la post-maduración sobre la dormición está estrechamente relacionado con el estado redox de la semilla: la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) aumenta durante la post-maduración, hasta que se promueve la salida de la dormición (Bailly, 2019; Bazin et al., 2011). Las ROS participan en la señalización del etileno y alteran la relación ABA/GA al promover la expresión de los genes *CYP707A* involucrados en la degradación del ABA y al aumentar la biosíntesis de las GAs (Bahin et al., 2011; Y. Liu et al., 2010; Oracz et al., 2009). Podríamos pensar que las semillas mRNA1OX tienen una cantidad de ROS mayor al iniciar la post-maduración en comparación a las semillas Col-0, así se llegaría a niveles más elevados más rápidamente, lo que promovería la salida de la dormición primaria tempranamente en éstas. En el futuro sería interesante evaluar qué ocurre con las ROS en nuestros genotipos y en las condiciones evaluadas.

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 nos resultó relevante evaluar cómo *At-RS31* podría regular este proceso. Utilizando semillas frescas recién cosechadas que fueron incubadas durante días variables en oscuridad, observamos que a medida que aumenta el tiempo en que las semillas se incuban embebidas a 21°C en oscuridad, se promueve la entrada en dormición secundaria para tres de los genotipos evaluados (Col-0, RS31OX y *rs31*), lo que se evidencia en una reducción en los niveles de germinación al ser irradiadas con luz R (Fig. 17, A). En estas condiciones de luz, las semillas mRNA1OX no evidencian su entrada en dormición secundaria. Sin embargo, sí lo hacen cuando son irradiadas con un RLp (7 días vs 1 día, Fig. 17B). Si bien nuestros resultados van en eje con reportes anteriores donde se demuestra que la imbibición a altas temperaturas en oscuridad induce la entrada en dormición secundaria de las semillas (Footitt et al. 2017, Donohue et al., 2007, Cone and Spruit 1983; Huang et al. 2015; Ibarra et al., 2016; Springthorpe and Penfield 2015), el hecho de que las semillas mRNA1OX no hayan entrado en dormición secundaria en respuesta al Rp puede deberse a que la temperatura de imbibición utilizada en esta tesis no haya sido lo suficientemente elevada o que los días de imbibición no sean suficientes. Los resultados en RLp nos sugieren que la isoforma *mRNA1*, i.e.: la proteína SR *At-RS31*, no sería un regulador negativo de la entrada en dormición secundaria.

Todos estos datos en conjunto (Figs. 13-17) nos permiten pensar a *mRNA1* como un regulador clave tanto de la dormición primaria como de la dormición secundaria, que puede estar involucrado en las vías de señalización del phyB (R) y del phyA (RL), y que el rol que cumple en ambos procesos podría estar vinculado a la acción de DOG1. DOG1 es importante en el establecimiento de la dormición que puede actuar como parte de un sistema de sensado térmico que afecta la dormición primaria alterando la sensibilidad al ABA (Finch-Savage & Footitt, 2017). Más aún, los niveles de expresión de *DOG1* se correlacionan con cambios dinámicos en los niveles de dormición secundaria en semillas de *A. thaliana* enterradas en el suelo (Seo & Marion-Poll, 2019). En otro estudio también se documentó que participa en la dormición secundaria en respuesta a la estratificación cálida y fría prolongada experimentada por las semillas durante la imbibición (Murphey et al., 2015). En el marco de estos antecedentes, podemos pensar que *mRNA1* estaría actuando en conjunto con o regulando a DOG1, por lo que sería interesante generar nuevos materiales genéticos mediante cruces con semillas mutantes *dog1* y/o líneas marcadas

con el objetivo de evaluar las respuestas de estos materiales durante la dormición primaria y secundaria y comprender cómo ambos genes regulan dichos procesos. Este conocimiento podría ser potencialmente aplicado a cultivos de interés agronómico, como es el caso de *B. napus* (colza canola), que tiene bajos niveles de dormición primaria y se demostró que *DOG1* tiene un rol en la inducción de la dormición secundaria (Née et al., 2015)

Por otra parte, si la isoforma *mRNA1* de *At-RS31*, que es la codificante, es tan relevante para la germinación de las semillas, sería de esperar que las mutantes *rs31* muestren también alteraciones. Paradójicamente, esto no es así, y las semillas mutantes *rs31* responden a nivel germinación como las semillas salvajes Col-0. Sin embargo, esto podría deberse a la redundancia de función con otras proteínas SR. En particular, la subfamilia de las RS en *A. thaliana* está compuesta por 3 proteínas SR más, *At-RS31a* (con aproximadamente un 80% de identidad de secuencia con *At-RS31*), *At-RS40* y *At-RS41* (Barta et al., 2010), que podrían estar compensando la falta de *At-RS31* en las semillas mutantes *rs31* (Fig. 13-17).

Rol de *At-RS31* en otros estadios del ciclo de vida de *A. thaliana*.

El reverdecimiento (*greening*) de las plántulas etioladas es crucial para su crecimiento y supervivencia. Tras alcanzar la superficie del suelo y la luz solar, las plántulas etioladas integran numerosas señales ambientales y señales internas para modular el *greening* y mejorar así su supervivencia y adaptación. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos subyacentes por los que la luz y las fitohormonas, como el ácido abscísico (ABA), regulan de forma coordinada el *greening* de las plántulas etioladas.

Una función importante del ABA es detener el crecimiento temprano de las plántulas en entornos difíciles con el fin de montar una respuesta al estrés y asegurar la supervivencia. Motivados por esto, decidimos indagar sobre el rol de *At-RS31* durante el establecimiento temprano de las plántulas (analizando la apertura de cotiledones y el desarrollo de hojas verdaderas) con el objetivo de obtener información sobre cómo *At-RS31* podría estar involucrado en la integración de la luz y la vía de transducción de señales del ABA durante el establecimiento temprano de las plántulas (Fig. 18-20). En este sentido, *At-RS31* pareciera tener roles similares y opuestos al de otros genes SR. Por ejemplo, se demostró que la aplicación exógena de ABA retrasa la germinación de las semillas Col-0 y *sr45-1* de forma similar y afecta al *greening* de los cotiledones en mayor medida en el mutante *sr45-1* (Carvalho et al., 2010). Nuestros resultados respecto al proceso de germinación en semillas mutantes *rs31* van en esa misma dirección pero cuando se sobre-expresa *mRNA1* van en dirección opuesta, ya que observamos que, si bien la aplicación de ABA 1 μ M disminuye los niveles de germinación de *mRNA1OX*, estos son significativamente mayores respecto de las semillas salvajes Col-0 (Fig. 18B). Más aún, únicamente la isoforma *At-SR45.1* regula positivamente la tolerancia al estrés salino (Albaqami et al., 2019). Esto puede explicar por qué el fenotipo se observa marcadamente en plántulas *mRNA1OX* y no en *RS31genOX* que puede dar lugar a la sobre-expresión de todas las isoformas. *At-SR45a*, *At-RS40* y *At-RS41* también están involucrados en las respuestas al estrés salino (T. Chen et al., 2013; Li et al., 2021; Zhang et al., 2014). En otras especies también se describieron roles de diversos genes SR en algunos de los procesos aquí evaluados. La sobre-expresión del gen *MeRSZ21b* de mandioca (*Cassava* spp.) en *A.thaliana* promueve la tolerancia a la sequía modulando la señalización dependiente del ABA (Chen et al., 2022), lo cual sugiere que los roles de los genes SR pueden extenderse a otras especies. Todos estos ejemplos nos indican que *At-RS31* podría tener roles similares o antagónicos a otras proteínas SR.

Debido a que se demostró que existen genes que regulan tanto la germinación como la floración (Auge et al., 2018; Chiang et al., 2009; Chory et al., 1996; Hughes et al., 2019; Huo et al., 2016), decidimos evaluar si *At-RS31* podría estar regulando también la floración. Si bien no observamos cambios en el tiempo a floración (medido como número de hojas de la roseta) entre las plantas *RS31genOX* y las plantas salvajes *Col-0*, las plantas *mRNA1OX* tienen un fenotipo claro de floración tardía, independientemente del fotoperíodo utilizado (Fig. 21). Coherentemente, las plantas mutantes *rs31* muestran lo contrario, una aceleración de la floración, aunque ésta sólo ocurre en condiciones no inductoras (día corto). Evidentemente, la sobre-expresión de la isoforma codificante *mRNA1* genera alteraciones en el proceso de floración. Esto podría deberse a cambios en la expresión de *FLC*, un regulador central de la floración, como fue reportado en *At-SR45* (Ali et al., 2007). Más aún, se demostró que otros factores de *splicing* son reguladores clave de la floración bajo la influencia de la temperatura ambiental en *A. thaliana* (Hrtyan et al., 2015; Zhu et al., 2017). De forma interesante, el *splicing* alternativo de *At-U2AF65a* en respuesta a cambios de temperatura está controlada por *At-CDKG1*. Los altos niveles de niveles de dos de las tres isoformas de *splicing* (*mRNA1* y *mRNA2*) a alta temperatura pueden traducidos a proteínas truncadas que funcionan en el *splicing* de isoformas no canónicas de *FLM*, otro gen involucrado en la floración (Steffen et al., 2019). A futuro sería interesante evaluar si el fenotipo de floración tardía de *At-RS31* reportado en esta tesis se debe a cambios en los niveles de expresión (o de *splicing* alternativo) de genes que regulan la floración. Resultados preliminares de nuestra colaboradora Maria Kalyna indicarían que sí, al menos para *FLC* y otros reguladores de floración.

Rol de *At-RS31* en el SA de genes de interés en respuestas R/RL durante la germinación.

Dado que *At-RS31* codifica para una proteína SR, y que es precisamente la variante codificante (*mRNA1*) la que genera los fenotipos más marcados en las condiciones analizadas en esta Tesis, decidimos evaluar si los efectos observados podrían ser explicados por cambios en el *splicing* alternativo de genes "clave". Dichos genes serían aquellos que de cambiar pueden repercutir en el parámetro evaluado, i.e.: *At-DRM1* y *At-PIF6* en germinación. Si bien evaluamos las respuestas fisiológicas de todos los genotipos (Fig. 12-18), decidimos hacer foco en las sobre-expresantes *mRNA1OX* para la caracterización molecular y en que la germinación es el estadio evaluado que tenemos mejor caracterizado a nivel molecular (Tognacca et al., 2019).

Los resultados del análisis por RT-PCR y electroforesis en geles de agarosa muestran que los patrones de SA de *At-RS31*, *At-U2AF65A* y *At-SR30* cambian en respuesta a un Rp y un Rlp en semillas salvajes *Col-0* (Fig. 22, D-G), y esto coincide con lo reportado anteriormente (Tognacca et al., 2019). *At-U2AF65A* se encuentra regulado por el fitocromo B, pero *At-RS31* y *At-SR30* no. Para estos últimos se sugiere que pueden estar involucrados otros fitocromos estables y/u otras vías de señalización lumínica (Tognacca et al., 2019). En los experimentos en que evaluamos SA en la presente Tesis de Licenciatura, *At-PIF6* y *At-DRM1* no presentaron cambios por luz R y RL, lo que se contradice con lo reportado anteriormente (Tognacca et al., 2019). Esto podría estar relacionado con el estado de post-maduración de las semillas. Esta cohorte de semillas es la misma que la de los experimentos de reversibilidad de la Fig. 12. Por lo tanto, tenían aproximadamente 5 meses de post-maduración. Y esto difiere de las semillas menos post-maduras utilizadas en Tognacca et. al, 2019. Esto podría sugerir que el tiempo de

post-maduración en seco de las semillas influye en la regulación de los patrones de SA. Por otro lado, en semillas mRNA10X no hay cambios marcados en los patrones de SA evaluados en respuesta a la luz R ni a la luz RL. Por ende, tampoco responden a la reversibilidad. Esto es consistente con lo observado en la fisiología de la germinación, donde responden germinando indiferentemente al/a los pulso/s de luz recibidos (Fig. 12). En pocas palabras, las semillas mRNA10X son insensibles a la luz durante la germinación, tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular o de modulación del *splicing* alternativo. Considerando que las proteínas SR pueden pegarse a su ARNm y regular su propio SA (Kalyna et al., 2003), y que esto ocurriría para el caso de *At-RS31* en plántulas (datos no publicados), no resultaría sorprendente que *At-RS31* se encuentre auto-regulado en semillas. Esto se evidencia al comparar los patrones de SA de *At-RS31* "endógeno" en semillas salvajes Col-0 y mRNA10X (Fig. 22, E). Al sobre-expresar la isoforma codificante *mRNA1*, cambia la proporción de las isoformas del gen *At-RS31* endógeno (me refiero a la copia original en el genoma de *A. thaliana*, no al transgén) entre genotipos (Fig. 22, D y E). Esto es coherente con lo observado en Petrillo et al., 2014 y a datos de nuestro laboratorio y los de nuestras colaboradoras (Andrea Barta y Maria Kalyna, Vienna, Austria). Las proteínas SR también pueden regular el SA de otros genes SR (Kalyna et al., 2003). Teniendo en cuenta lo que se observa en la Fig. 22 junto con evidencia de grupos con los que colaboramos, *At-SR30* se encontraría regulado por *At-RS31*. Hay fuertes indicios de que *At-SR30* presenta un sitio de unión al cual se une *At-RS31* en plántulas de *A. thaliana* de dos semanas, y lo mismo se observó en los transcriptos del gen *At-RS31* (Kalyna y Steiger, datos no publicados, manuscrito en preparación). Por lo tanto, podríamos esperar que esta regulación ocurra también en semillas.

Los patrones de SA de genes asociados a la vía de señalización del ABA y azúcares (*At-ABI3*, *At-ANAC060*, *At-SnRK2.3*, *At-ABI5*, *At-HAB1* y *At-SnRK2.2*) no muestran cambios en respuesta a la luz, tanto en semillas Col-0 como en semillas mRNA10X. Estos hallazgos implicarían que *At-RS31* no está involucrado en la regulación de la expresión de estos genes o en la vía de transducción de señales que los regula. Interesantemente, algunos datos preliminares de nuestro grupo de trabajo sugieren que el metabolismo del ABA (y no el de las GAs) se encuentra alterado en las semillas mRNA10X, lo que podría explicar su mayor germinación respecto de las semillas salvajes Col-0 (Tognacca et al., datos no publicados). El hecho de que en plantas el SA suele estar asociado a la degradación activa de algunas isoformas por *Non-sense Mediated mRNA Decay* (NMD), nos lleva a pensar que la falta de cambios aquí reportada (Fig. 24) pueda deberse a que las isoformas generadas se están degradando por este mecanismo (Kalyna et al., 2012; Wachter & Hartmann, 2014). Sin embargo, esto debería repercutir en un cambio global de los transcriptos totales acumulados del gen analizado.

Globalmente, la primera dificultad a la hora de evaluar los patrones de SA es que los duplicados de semillas mRNA10X no generaron respuestas homogéneas. Estos ensayos no se pudieron repetir debido a la cantidad acotada de semillas con las que contábamos, el elevado número de semillas requerido para tales experimentos y las dificultades para generar nuevas cohortes parejas producto de la pandemia y de diversas problemáticas de funcionamiento de los cuartos de cultivo. Como se detalló anteriormente, las sobre-expresantes mRNA10X tienen una floración tardía en los dos fotoperíodos aquí evaluados, por lo que obtener una elevada cantidad de semillas requiere mucho tiempo. Aún así, decidimos analizar las respuestas de diversos candidatos y evaluar cuántos eventos pueden ser afectados por la proteína *At-RS31*. Volviendo a los resultados, se puede apreciar que una de las réplicas no expresa tanto la construcción del transgén, comparada con la otra (Fig. 22, D). Esto se deduce por la cantidad relativa de la isoforma *mRNA1* en la electroforesis, es decir, por la intensidad de la banda del producto de RT-PCR correspondiente (Fig.

22, D y E). Esto también se corroboró mediante RT-qPCR, donde se observó que la expresión de *mRNA1* era dispar entre ambas réplicas (datos no mostrados). Más aún, teniendo en cuenta lo que solemos observar en plántulas (Petrillo et al., 2014), se podría pensar que la sobre-expresión de *mRNA1* bajo el promotor CaMV35S no es lo suficientemente elevada en semillas. Una solución posible a este problema sería desarrollar plantas transgénicas que sobre-expresen la isoforma *mRNA1* con otro promotor de actividad específica en semillas de *A. thaliana*, como el de α -globulina (Sunilkumar et al., 2002) o el de la β -glucosidasa 19 (S. Liu et al., 2021).

El segundo obstáculo es que varios patrones de SA en los tratamientos para evaluar reversibilidad R/RL no presentaban cambios claros, en contraste a lo que ocurre cuando las semillas reciben un Rp o un RLP como único tratamiento de luz. Puede ser que esto se debe al tiempo transcurrido entre pulsos, generando que la fotorreversión disminuya. Se sabe que la magnitud de la reversión de respuesta del efecto del R disminuye a medida que aumenta el intervalo de tiempo entre el pulso de luz R y RL (Casal et al., 1998). Esto podría evaluarse, simplemente, reduciendo el tiempo entre pulsos. Es algo que se podría testear en el futuro cercano.

El genotipo mRNA1OX en retrospectiva.

Las semillas mRNA1OX presentan una respuesta de germinación más elevada que las semillas salvajes Col-0 en todas las condiciones evaluadas (Fig. 12-18). Tal característica es negativa desde el punto de vista ecológico. Si múltiples semillas brotan en un espacio acotado, el establecimiento de las plántulas y su desarrollo temprano se puede ver afectado por una competencia intensa entre las plántulas por los recursos limitados, lo que puede afectar su crecimiento, desarrollo y supervivencia. También es negativo desde el punto de vista agronómico, dado que una alta densidad de plantas también demanda mayor cantidad de recursos, y si no son satisfechos, su crecimiento es deficiente y la producción se reduce. Además, si se tratara de granos destinados a consumo, no podrían ser comercializados teniendo tal potencial germinativo. Lo mismo si pensamos en malezas, no sería ventajoso que ganen terreno y le quiten recursos a las plantas que sí se desean cultivar. Por lo dicho anteriormente, entonces era esperable que un potencial germinativo excesivo no correlacionara necesariamente con una ventaja en las etapas tempranas de desarrollo de la plántula. De hecho, si bien la apertura de cotiledones de las plántulas a los 7 días de vida responde como las plántulas salvajes Col-0 en un contexto controlado (Fig. 20, condición MS), dos días después el desarrollo adecuado de las hojas verdaderas ya se ve afectado negativamente (Fig. 20, condición MS). Si a esto le sumamos la señal de estrés abiótico inducido por la suplementación del ABA, el desempeño de las plántulas empeora aún más (Fig. 19 y 20, condición MS+ABA 1 μ M). Esta tendencia continúa al examinar tiempo a floración. Las plantas mRNA1OX tardan más tiempo en florecer y, por ende, su etapa vegetativa se extiende más que la de las plantas salvajes Col-0, acumulando más hojas hasta el desarrollo del botón floral (Fig. 21). Esto implicaría que la señalización molecular que regula el desarrollo y la floración de la planta se encuentra alterada por la sobre-expresión de la isoforma *mRNA1*.

Reflexión final.

Cuando concebimos inicialmente el plan de trabajo para esta Tesis, uno de nuestros objetivos era encontrar qué factores, con roles conocidos en germinación o salida de la dormición, podían estar siendo modulados por *At-RS31* y, por esta razón, podrían ser la base molecular que explique los

fenotipos observados en tales eventos fisiológicos. Nuestro diseño experimental incluyó un panel de genes que testeamos a nivel de *splicing* alternativo que fueron elegidos *a priori* por tener variantes de *splicing* anotadas y por poseer algún rol en germinación. Lamentablemente, durante el desarrollo de la Tesis no fuimos capaces de encontrar un candidato claro, con las características mencionadas, que sea regulado por *At-RS31*. Sí observamos la regulación sobre sus propios transcriptos y sobre los transcriptos del gen *At-SR30*. Esto valida nuestra estrategia inicial de búsqueda, demostrando que existen eventos regulados por la SR *At-RS31* en semillas (en el caso de la sobre-expresión de *mRNA1*), y nos permite vislumbrar que, de analizar más factores candidatos podríamos encontrar eventos regulados por esta SR que sean los causantes de los cambios fisiológicos. En los próximos meses contaremos con los resultados de un iCLIP para *At-RS31*. Dichos ensayos son útiles para determinar, con precisión de 1 base, en qué lugar se "pega" una proteína. De este modo, conoceremos todos los transcriptos que pueden ser reconocidos y modulados por *At-RS31*. Los resultados del iCLIP están siendo cruzados con los resultados de un análisis de secuenciación masiva del ARN (RNAseq) de la sobre-expresante de *mRNA1* en comparación con las plántulas salvajes Col-0. Claro, en plántulas. Pero esto puede ser un punto de partida para la búsqueda de eventos regulados en semillas, por un lado porque hay genes que se expresan en diversos tejidos y estadios; por otro, porque podemos reconocer motivos específicos de pegado del factor de *splicing* y basar la búsqueda en éstos. Por ejemplo, ya sabemos que un motivo reconocido por (al que se pega) *At-RS31* es AGACAGA. Podríamos buscar los genes que tienen este motivo en sus transcriptos primarios y analizar cuáles de esos genes tienen roles a nivel germinación. Los mismos tienen una probabilidad no nula de ser regulados por *At-RS31* y de, al mismo tiempo, explicar parcial o totalmente, los fenotipos observados. En paralelo, sería importante determinar los niveles de expresión de los genes testeados, ya que, como discutí previamente, si bien no encontramos cambios en los patrones de *splicing* alternativo, puede ser que los mismos estén eclipsados por la degradación activa de las isoformas que se están generando. Es decir, quizás no cambia el patrón de *splicing* pero sí cambia la expresión total del gen y, en particular, la expresión de la(s) isoforma(s) codificante(s).

Además del avance en el sentido mecanístico que implicó la concreción de esta Tesis, es necesario destacar que pudimos demostrar que *At-RS31* tiene posibles roles fisiológicos a lo largo de todo el ciclo de vida de *A. thaliana*. En Petrillo et al. 2014 se demostró que las plántulas que sobre-expresan el *mRNA1* tienen un fenotipo deletéreo en condiciones subóptimas (baja intensidad de luz, oscuridad prolongada). Aquí demostramos que las semillas mRNA1OX tienen un fenotipo en dormición primaria y secundaria (Fig.14-20) como así también un fenotipo "más débil" durante su desarrollo inicial y, o establecimiento (Fig. 19 y 20). De modo similar, plantas adultas que sobre-expresan *mRNA1* tienen una entrada a la floración marcadamente tardía. Estos fenotipos parecen ir en contra, a nivel de *fitness*, de la germinación exacerbada. Esto sería si consideramos que una germinación exacerbada da como resultado un *pool* de plántulas más competitivas y que pueden desplazar a otros ecotipos u otras especies presentes en el banco de semillas del suelo. Sin embargo, todos estos fenotipos podrían ser consistentes. Germinar tempranamente, o en respuesta a un entorno que no es el apropiado, no es necesariamente una ventaja, muy por el contrario, puede implicar la pérdida de la capacidad de la plántula en desarrollo de crecer, de instalarse en ese entorno por no estar las condiciones ambientales dadas, y esto repercute en mayores chances de perder viabilidad. Evidentemente, la línea transgénica mRNA1OX tiene respuestas alteradas a la luz. Esto se observa en germinación y es evidente también en floración. Al mismo tiempo, condiciones subóptimas como baja intensidad de luz, períodos de oscuridad prolongados, entre otras, provocan fenotipos deletéreos en las plantas sobre-expresantes (Petrillo et al., 2014). Se deduce entonces que la regulación fina de los niveles de proteína *At-RS31* es de gran relevancia para todo el ciclo de vida de *A. thaliana*. Cuando

tengamos en nuestras manos los posibles blancos (*targets*) de regulación y podamos comprender el peso específico de cada uno de éstos en las respuestas fisiológicas, tendremos una idea más acabada de cómo y por qué ocurre esto. ¿Es At-RS31 un regulador central del desarrollo de *A. thaliana*, o simplemente es un factor de *splicing* que tiene efectos pleiotrópicos que modifican las respuestas de la planta en diversos contextos y en diferentes estadios? Los hallazgos de esta Tesis contribuirán a enmarcar los resultados de los análisis ómicos y así estaremos más cerca de tener una respuesta abarcativa sobre el mecanismo de acción de este (querido) factor de *splicing* que ejerce durante el desarrollo de la generación que está por establecerse.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, G. S., Palusa, S. G., Golovkin, M., Prasad, J., Manley, J. L., & Reddy, A. S. N. (2007). Regulation of Plant Developmental Processes by a Novel Splicing Factor. *PLOS ONE*, 2(5), e471.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.-H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., & Jullien, M. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: Studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219(3), 479-488.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C. J., Blankestijn-de Vries, H., & Koornneef, M. (2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 164(2), 711-729.
- Arana, M. V., Sánchez-Lamas, M., Strasser, B., Ibarra, S. E., Cerdán, P. D., Botto, J. F., & Sánchez, R. A. (2014). Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 37(9), 2014-2023.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.
- Auge, G. A., Blair, L. K., Burghardt, L. T., Coughlan, J., Edwards, B., Leverett, L. D., & Donohue, K. (2015). Secondary dormancy dynamics depends on primary dormancy status in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Science Research*, 25(2), 230-246.
- Auge, G. A., Blair, L. K., Kareidiya, A., & Donohue, K. (2018). The autonomous flowering-time pathway pleiotropically regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 121(1), 183-191.
- Bae, G., & Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 281-311.
- Barta, A., Kalyna, M., & Lorković, Z. J. (2008). Plant SR proteins and their functions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 326, 83-102.
- Barta, A., Kalyna, M., & Reddy, A. S. N. (2010). Implementing a rational and consistent nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins) in plants. *The*

Plant Cell, 22(9), 2926-2929.

Baskin CC, Baskin JM. (1998). *Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego: Academic Press.

Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L., & Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(2), 151-160.

Benech-Arnold, R. L., Sánchez, R. A., Forcella, F., Kruk, B. C., & Ghersa, 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. *The Arabidopsis Book*, 2008(6).

Bevan, M., & Walsh, S. (2005). The Arabidopsis genome: A foundation for plant research. *Genome Research*, 15(12), 1632-1642.

Bewley JD. (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell*. 9:1055-1066.

Bewley JD, Black M. (1994). *Seeds: physiology of development and germination*, 2nd edn. New York, London: Plenum Press.

Bossi, F., Cordoba, E., Dupré, P., Mendoza, M. S., Román, C. S., & León, P. (2009). The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *The Plant Journal*, 59(3), 359-374.

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*. *Journal of Plant Physiology*. 146: 307-312.

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 Physiology*. 110: 439-444.

Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Görlach, J. (2001). Growth Stage –Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510.

- Buijs, G., Kodde, J., Groot, S. P. C., & Bentsink, L. (2018). Seed dormancy release accelerated by elevated partial pressure of oxygen is associated with DOG loci. *Journal of Experimental Botany*, *69*(15), 3601-3608.
- Buijs, G., Vogelzang, A., Nijveen, H., & Bentsink, L. (2020). Dormancy cycling: Translation-related transcripts are the main difference between dormant and non-dormant seeds in the field. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *102*(2), 327-339.
- Carrera-Castaño, G., Calleja-Cabrera, J., Pernas, M., Gómez, L., & Oñate-Sánchez, L. (2020). An Updated Overview on the Regulation of Seed Germination. *Plants*, *9*(6), Article 6.
- Carvalho, R. F., Carvalho, S. D., & Duque, P. (2010). The Plant-Specific SR45 Protein Negatively Regulates Glucose and ABA Signaling during Early Seedling Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *154*(2), 772-783.
- Casal, J. J., & Sánchez, R. A. (1998). Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*, *8*(3), 317-329.
- Chahtane, H., Kim, W., & Lopez-Molina, L. (2017). Primary seed dormancy: A temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *Journal of Experimental Botany*, *68*(4), 857-869.
- Chiang, G. C. K., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., Koornneef, M., Soppe, W. J. J., Donohue, K., & De MEAUX, J. (2011). DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in Arabidopsis thaliana. *Molecular Ecology*, *20*(16), 3336-3349.
- Chiang, G. C. K., Barua, D., Kramer, E. M., Amasino, R. M., & Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(28), 11661-11666.
- Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R. K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J., & Vitart, V. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12066-12071.
- Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 21-45.
- Claeys, H., De Bodt, S., & Inzé, D. (2014). Gibberellins and DELLAs: Central nodes in growth

- regulatory networks. *Trends in Plant Science*, 19(4), 231-239.
- Clerkx, E. J. M., El-Lithy, M. E., Vierling, E., Ruys, G. J., Blankestijn-De Vries, H., Groot, S. P. C., Vreugdenhil, D., & Koornneef, M. (2004). Analysis of Natural Allelic Variation of Arabidopsis Seed Germination and Seed Longevity Traits between the Accessions Landsberg erecta and Shakdara, Using a New Recombinant Inbred Line Population. *Plant Physiology*, 135(1), 432-443.
- Come, D., and Thevenot, C. (1982). The Physiology of Biochemistry of Seed Development, Dormancy and Germination. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 271–298 (embryo dormancy).
- Cone, J. W., & Spruit, C. J. P. (1983). Imbibition conditions and seed dormancy of Arabidopsis thaliana. *Physiologia Plantarum*, 59(3), 416-420.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 651-679.
- Darwin, C., & Darwin, F. (1880). The Power of Movement in Plants. London: John Murray.
- Dave, A.; Hernandez, L.; He, Z.; Andriotis, V.; Vaistij, F.E.; Larson, T.; Graham, I.A. (2011). 12-oxo-phytodienoic acid accumulation during seed development represses seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell*. 23, 583–599.
- Davière, J.-M., & Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. *Development*, 140(6), 1147-1151.
- Davière, J.-M., & Achard, P. (2016). A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. *Molecular Plant*, 9(1), 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.011>
- Day, I. S., Golovkin, M., Palusa, S. G., Link, A., Ali, G. S., Thomas, J., Richardson, D. N., & Reddy, A. S. N. (2012). Interactions of SR45, an SR-like protein, with spliceosomal proteins and an intronic sequence: Insights into regulated splicing. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 71(6), 936-947.
- de Casas, R. R., Kovach, K., Dittmar, E., Barua, D., Barco, B., & Donohue, K. (2012). Seed after-ripening and dormancy determine adult life history independently of germination timing. *New Phytologist*, 194(3), 868-879.

- de la Fuente van Bentem, S., Anrather, D., Dohnal, I., Roitinger, E., Csaszar, E., Joore, J., Buijnink, J., Carreri, A., Forzani, C., Lorkovic, Z. J., Barta, A., Lecourieux, D., Verhounig, A., Jonak, C., & Hirt, H. (2008). Site-Specific Phosphorylation Profiling of Arabidopsis Proteins by Mass Spectrometry and Peptide Chip Analysis. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2458-2470.
- Debieu, M., Tang, C., Stich, B., Sikosek, T., Effgen, S., Josephs, E., Schmitt, J., Nordborg, M., Koornneef, M., & de Meaux, J. (2013). Co-Variation between Seed Dormancy, Growth Rate and Flowering Time Changes with Latitude in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 8(5), e61075.
- Derkx, M. P. M., Smidt, W. J., Van der Plas, L. H. W., & Karssen, C. M. (1993). Changes in dormancy of *Sisymbrium officinale* seeds do not depend on changes in respiratory activity. *Physiologia Plantarum*, 89(4), 707-718.
- Donohue, K. (2009). Completing the cycle: Maternal effects as the missing link in plant life histories. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 364(1520), 1059-1074.
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C. R., & Schmitt, J. (2005). The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: Variable natural selection on germination timing. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 59(4), 758-770.
- Donohue, K., Schmitt, J., Mousseau, T. A., & Fox, C. W. (1998). Maternal effects as adaptations.
- Donohue, K., Heschel, M. S., Chiang, G. C. k., Butler, C. M., & Barua, D. (2007). Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant, Cell & Environment*, 30(2), 202-212.
- Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K., & Willis, C. G. (2010). Germination, Postgermination Adaptation, and Species Ecological Ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 293-319.
- Duque, P. (2011). A role for SR proteins in plant stress responses. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 49-54.
- Fankhauser, C., & Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13, 203-229.

- Fenner, M. (Ed.). (2000). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. CABI publishing.
- 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 patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *51*(1), 60-78.
- Finch-Savage, W. E., & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, *171*(3), 501-523.
- Finch-Savage, W., & Footitt, S. (2017). Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *Journal of Experimental Botany*, *68*.
- Finch-Savage, W. E., & Footitt, S. (2017). Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *Journal of experimental botany*, *68*(4), 843-856.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, *11*, e0166.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., & Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 387-415.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H., & Finch-Savage, W. E. (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(50), 20236-20241.
- Franklin, K. A., & Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany*, *61*(1), 11-24.
- Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., & Harberd, N. P. (2004). The *Arabidopsis* Mutant *sleepy1gar2-1* Protein Promotes Plant Growth by Increasing the Affinity of the SCF^{SLY1} E3 Ubiquitin Ligase for DELLA Protein Substrates[W]. *The Plant Cell*, *16*(6), 1406-1418.
- Galland, M., Huguet, R., Arc, E., Cueff, G., Job, D., & Rajjou, L. (2014). Dynamic Proteomics

- Emphasizes the Importance of Selective mRNA Translation and Protein Turnover during Arabidopsis Seed Germination *. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(1), 252-268.
- Gao, H., Gordon-Kamm, W. J., & Lyznik, L. A. (2004). ASF/SF2-like maize pre-mRNA splicing factors affect splice site utilization and their transcripts are alternatively spliced. *Gene*, 339, 25-37.
- Jimeno-Gilles, C., Lelièvre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N., & Limami, A. M. (2009). ABA-Mediated Inhibition of Germination Is Related to the Inhibition of Genes Encoding Cell-Wall Biosynthetic and Architecture: Modifying Enzymes and Structural Proteins in *Medicago truncatula* Embryo Axis. *Molecular Plant*, 2(1), 108-119.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J.-P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J.-C., Bouwmeester, H., Bécard, G., Beveridge, C. A., Rameau, C., & Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189-194.
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., & Soppe, W. J. J. (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment*, 35(10), 1769-1786.
- Graveley, B. R., Hertel, K. J., & Maniatis, T. (2001). The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA*, 7(6), 806-818.
- Griffith, C., Kim, E., & Donohue, K. (2004). Life-history variation and adaptation in the historically mobile plant *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) in North America. *American Journal of Botany*, 91(6), 837-849.
- Gu, J., Ma, S., Zhang, Y., Wang, D., Cao, S., & Wang, Z.-Y. (2020). Genome-Wide Identification of Cassava Serine/Arginine-Rich Proteins: Insights into Alternative Splicing of Pre-mRNAs and Response to Abiotic Stress. *Plant and Cell Physiology*, 61(1), 178-191.
- Gubler, F., Millar, A. A., & Jacobsen, J. V. (2005). Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 183-187.
- Hennig, L., Stoddart, W. M., Dieterle, M., Whitlam, G. C., & Schäfer, E. (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 128(1), 194-200.
- Hilhorst, H. W. M. (1990). Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*. *Plant Physiology*, 94(3),

1096-1102.

- 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.
- Hrtyan, M., Šliková, E., Hejátko, J., & Růžička, K. (2015). RNA processing in auxin and cytokinin pathways. *Journal of Experimental Botany*, *66*(16), 4897-4912.
- Hubbard, K. E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E. D., & Schroeder, J. I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development*, *24*(16), 1695-1708.
- Hughes, P. W., Soppe, W. J. J., & Albani, M. C. (2019). Seed traits are pleiotropically regulated by the flowering time gene PERPETUAL FLOWERING 1 (PEP1) in the perennial *Arabis alpina*. *Molecular Ecology*, *28*(5), 1183-1201.
- Huo, H., Wei, S., & Bradford, K. J. (2016). DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) regulates both seed dormancy and flowering time through microRNA pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(15), E2199-E2206.
- Ibarra, S. E., Tognacca, R. S., Dave, A., Graham, I. A., Sánchez, R. A., & Botto, J. F. (2016). Molecular mechanisms underlying the entrance in secondary dormancy of Arabidopsis seeds. *Plant, Cell & Environment*, *39*(1), 213-221.
- Iglesias-Fernández, R., & Matilla, A. (2009). After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, *60*(6), 1645-1661.
- Isshiki, M., Tsumoto, A., & Shimamoto, K. (2006). The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *The Plant Cell*, *18*(1), 146-158.
- Jenkins, G. I. (2014). Structure and function of the UV-B photoreceptor UVR8. *Current Opinion in Structural Biology*, *29*, 52-57.
- Jiang, J., Liu, X., Liu, C., Liu, G., Li, S., & Wang, L. (2017). Integrating Omics and Alternative Splicing Reveals Insights into Grape Response to High Temperature. *Plant Physiology*, *173*(2), 1502-1518.

- Kalyna, M., & Barta, A. (2004). A plethora of plant serine/arginine-rich proteins: Redundancy or evolution of novel gene functions? *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt 4), 561-564.
- Kalyna, M., Lopato, S., & Barta, A. (2003). Ectopic expression of atRSZ33 reveals its function in splicing and causes pleiotropic changes in development. *Molecular Biology of the Cell*, 14(9), 3565-3577.
- Kalyna, M., Lopato, S., Voronin, V., & Barta, A. (2006). Evolutionary conservation and regulation of particular alternative splicing events in plant SR proteins. *Nucleic Acids Research*, 34(16), 4395-4405.
- Kalyna, M., Simpson, C. G., Syed, N. H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cardle, L., McNicol, J., Dinh, H. Q., Barta, A., & Brown, J. W. S. (2012). Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 40(6), 2454-2469.
- Karssen, C. M., Brinkhorst-van der Swan, D. L. C., Breekland, A. E., & Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: Studies on abscisic acid deficient genotypes of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta*, 157(2), 158-165.
- Kendall, S., & Penfield, S. (2012). Maternal and zygotic temperature signalling in the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research*, 22(S1), S23-S29.
- Kendrick, R.E., & Hillman, W.S. (1971). Absence of phytochrome dark reversion in seedlings of the Centrospermae. *Am. J. Bot.* 58:424-428.
- Kendrick, R. E., & Spruit, C. J. P. (1977). Phototransformations of phytochrome. *Photochemistry and photobiology*, 26(2), 201-214.
- Kim, W.-Y., Fujiwara, S., Suh, S.-S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H. G., & Somers, D. E. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449(7160), 356-360.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognár, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Ádám, É., Schäfer, E., & Nagy, F. (2002). Nucleocytoplasmic Partitioning of the Plant Photoreceptors Phytochrome A, B, C, D, and E Is Regulated Differentially by Light and Exhibits a Diurnal Rhythm. *The Plant Cell*, 14(7), 1541-1555.

- Klose, C., Venezia, F., Hussong, A., Kircher, S., Schäfer, E., & Fleck, C. (2015). Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nature Plants*, *1*, 15090.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y., & Nambara, E. (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: Key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal*, *23*(7), 1647-1656.
- la Rosa, N. M., Sotillo, B., Miskolczi, P., Gibbs, D. J., Vicente, J., Carbonero, P., Oñate-Sánchez, L., Holdsworth, M. J., Bhalerao, R., Alabadí, D., & Blázquez, M. A. (2014). Large-Scale Identification of Gibberellin-Related Transcription Factors Defines Group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as Functional DELLA Partners. *Plant Physiology*, *166*(2), 1022-1032.
- Lagarias, J. C., & Lagarias, D. M. (1989). Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(15), 5778-5780.
- Lee, H. G., Lee, K., & Seo, P. J. (2015). The Arabidopsis MYB96 transcription factor plays a role in seed dormancy. *Plant Molecular Biology*, *87*(4-5), 371-381.
- Lee, K. P., Piskurewicz, U., Turečková, V., Strnad, M., & Lopez-Molina, L. (2010). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(44), 19108-19113.
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., & Peng, J. (2002a). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development*, *16*(5), 646-658.
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N. P., & Peng, J. (2002b). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development*, *16*(5), 646-658.

- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E., & 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. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *45*(3), 309-319.
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Deng, X. W. (2011). Phytochrome Signaling Mechanisms. *The Arabidopsis Book*, *2011*(9).
- Ling, Y., Mahfouz, M. M., & Zhou, S. (2021). Pre-mRNA alternative splicing as a modulator for heat stress response in plants. *Trends in Plant Science*, *26*(11), 1153-1170.
- Linkies, A., & Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports*, *31*(2), 253-270.
- Liu, P.-P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., & Carrington, J. C. (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *The Plant Journal*, *52*(1), 133-146.
- Locascio, A., Blázquez, M. A., & Alabadí, D. (2013). Genomic Analysis of DELLA Protein Activity. *Plant and Cell Physiology*, *54*(8), 1229-1237.
- Longo, C., Holness, S., De Angelis, V., Lepri, A., Occhigrossi, S., Ruta, V., & Vittorioso, P. (2021). From the Outside to the Inside: New Insights on the Main Factors That Guide Seed Dormancy and Germination. *Genes*, *12*(1), Article 1.
- Lopato, S., Kalyna, M., Dorner, S., Kobayashi, R., Krainer, A. R., & Barta, A. (1999). AtSRp30, one of two SF2/ASF-like proteins from Arabidopsis thaliana, regulates splicing of specific plant genes. *Genes & Development*, *13*(8), 987-1001.
- Lopato, S., Waigmann, E., & Barta, A. (1996). *Characterization of a novel arginine/serine-rich splicing factor in Arabidopsis*. *8*(12), 2255-2264.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T., & Chua, N.-H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal*, *32*(3), 317-328.
- Lorković, Z. J., & Barta, A. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Research*, *30*(3), 623-635.

- Lorković, Z. J., Hilscher, J., & Barta, A. (2008). Co-localisation studies of Arabidopsis SR splicing factors reveal different types of speckles in plant cell nuclei. *Experimental Cell Research*, 314(17), 3175-3186.
- Lorković, Z. J., Lopato, S., Pexa, M., Lehner, R., & Barta, A. (2004). Interactions of Arabidopsis RS Domain Containing Cyclophilins with SR Proteins and U1 and U11 Small Nuclear Ribonucleoprotein-specific Proteins Suggest Their Involvement in Pre-mRNA Splicing *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33890-33898.
- Mancinelli AL, Kendrick RE, Kronenberg GHM. (1994). The physiology of phytochrome actions. Photomorphogenesis in plants, eds Kendrick RE, Kronenberg GHM. (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 2nd ed. pp 211270.
- Manley, J. L., & Tacke, R. (1996). SR proteins and splicing control. *Genes & Development*, 10(13), 1569-1579.
- Marmé, D., Marchal, B., & Schäfer, E. (1971). A detailed analysis of phytochrome decay and dark reversion in mustard cotyledons. *Planta*, 100(4), 331-336.
- Marquez, Y., Brown, J. W. S., Simpson, C., Barta, A., & Kalyna, M. (2012). Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in Arabidopsis. *Genome Research*, 22(6), 1184-1195.
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T., & Steber, C. M. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin Ligase[W]. *The Plant Cell*, 15(5), 1120-1130.
- Meyerowitz E. M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell*, 56(2), 263–269.
- Millar, A. A., Jacobsen, J. V., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., Reid, J. B., & Gubler, F. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: The role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal*, 45(6), 942-954.
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110-121. Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., & Sun, T. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *The Plant Journal*, 45(5), 804-818.

- Murphey, M., Kovach, K., Elnacash, T., He, H., Bentsink, L., & Donohue, K. (2015). DOG1-imposed dormancy mediates germination responses to temperature cues. *Environmental and Experimental Botany*, 112, 33-43.
- Nagy, F., Kircher, S., & Schafer, E. (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *Journal of Cell Science*, 114(3), 475-480.
- Nambara, E., & Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165-185.
- Narsai, R., Gouil, Q., Secco, D., Srivastava, A., Karpievitch, Y. V., Liew, L. C., Lister, R., Lewsey, M. G., & Whelan, J. (2017). Extensive transcriptomic and epigenomic remodelling occurs during *Arabidopsis thaliana* germination. *Genome Biology*, 18(1), 172.
- Née, G., Obeng-Hinne, E., Sarvari, P., Nakabayashi, K., & Soppe, W. (2015). Secondary dormancy in *Brassica napus* is correlated with enhanced BnaDOG1 transcript levels. *Seed Science Research*, 25(2), 221-229. doi:10.1017/S0960258514000427
- Nelson, S. K., & Steber, C. M. (2016). Gibberellin hormone signal perception: Down-regulating DELLA repressors of plant growth and development. En *Annual Plant Reviews, Volume 49* (pp. 153-188). John Wiley & Sons, Ltd.
- Nikolaeva, M.G. (1977). Factors controlling the seed dormancy pattern. In *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy*; Khan, A.A., Ed.; North Holland: Amsterdam, The Netherlands, 51–74.
- Nonogaki, H. (2019). The Long-Standing Paradox of Seed Dormancy Unfolded? *Trends in Plant Science*, 24(11), 989-998.
- 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*. *The Plant Cell*, 16(11), 3045-3058.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.-S., Sun, T., 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. *The Plant Cell*, 19(4), 1192-1208. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050153>

- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.-I., & Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *47*(1), 124-139.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T., & Nambara, E. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *141*(1), 97-107. <https://doi.org/10.1104/pp.106.079475>
- Ooms, J. J. J., Leon-Kloosterziel, K. M., Bartels, D., Koornneef, M., & Karssen, C. M. (1993). Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity in Seeds of Arabidopsis thaliana (A Comparative Study Using Abscisic Acid-Insensitive abi3 Mutants). *Plant Physiology*, *102*(4), 1185-1191.
- Palusa, S. G., Ali, G. S., & Reddy, A. S. N. (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: Regulation by hormones and stresses. *The Plant Journal*, *49*(6), 1091-1107.
- 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 Molecular Biology*, *73*(1-2), 89-95.
- Penfield, S., & Springthorpe, V. (2012). Understanding chilling responses in Arabidopsis seeds and their contribution to life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1586), 291-297.
- 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. *Current Biology*, *15*(22), 1998-2006.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., & Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & Development*, *11*(23), 3194-3205.
- Petrillo, E., Godoy Herz, M. A., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W. S., Barta, A., Kalyna, M., & Kornblihtt, A. R. (2014). A Chloroplast Retrograde Signal Regulates Nuclear Alternative Splicing. *6182*, 27-430.
- Postma, F. M., Lundemo, S., & Ågren, J. (2016). Seed dormancy cycling and mortality differ

- between two locally adapted populations of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 117(2), 249-256.
- Probert R.J. (2000). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. In: Fenner M, editor. *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities*. Oxon: CABI Publishing. 261–292.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., & Wagner, D. (1995). Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), 675-680.
- Rae, G. M., Uversky, V. N., David, K., & Wood, M. (2014). DRM1 and DRM2 expression regulation: Potential role of splice variants in response to stress and environmental factors in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(3), 317-332.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, 15(7), 395-401.
- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., & Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology*, 134(4), 1598-1613.
- Reddy, A. S. N. (2004). Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *Trends in Plant Science*, 9(11), 541-547. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.09.007>
- Reddy, A. S. N., & Shad Ali, G. (2011). Plant serine/arginine-rich proteins: Roles in precursor messenger RNA splicing, plant development, and stress responses. *WIREs RNA*, 2(6), 875-889.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18(1), 40-54.
- Riegler, S., Servi, L., Scarpin, M. R., Herz, M. A. G., Kubaczka, M. G., Venhuizen, P., Meyer, C., Brunkard, J. O., Kalyna, M., Barta, A., & Petrillo, E. (2021). Light regulates alternative splicing outcomes via the TOR kinase pathway. *Cell Reports*, 36(10).
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*. 57:837-58. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208. PMID:

16669784; PMID: PMC2664748.

- Saez, A., Apostolova, N., Gonzalez-Guzman, M., Gonzalez-Garcia, M. P., Nicolas, C., Lorenzo, O., & Rodriguez, P. L. (2004). Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *37*(3), 354-369.
- Sano, N., Permana, H., Kumada, R., Shinozaki, Y., Tanabata, T., Yamada, T., Hirasawa, T., & Kanekatsu, M. (2012). Proteomic analysis of embryonic proteins synthesized from long-lived mRNAs during germination of rice seeds. *Plant & Cell Physiology*, *53*(4), 687-698.
- Sarnowska, E. A., Rolicka, A. T., Bucior, E., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A. R., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Franzen, R., Schmelzer, E., Porri, A., Sacharowski, S., Gratkowska, D. M., Zugaj, D. L., Taff, A., Zalewska, A., Archacki, R., Davis, S. J., Coupland, G., ... Sarnowski, T. J. (2013). DELLA-Interacting SWI3C Core Subunit of Switch/Sucrose Nonfermenting Chromatin Remodeling Complex Modulates Gibberellin Responses and Hormonal Cross Talk in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *163*(1), 305-317.
- Savaldi-Goldstein, S., Aviv, D., Davydov, O., & Fluhr, R. (2003). Alternative splicing modulation by a LAMMER kinase impinges on developmental and transcriptome expression. *The Plant Cell*, *15*(4), 926-938.
- SCHMUTHS, H., BACHMANN, K., WEBER, W. E., HORRES, R., & HOFFMANN, M. H. (2006). Effects of Preconditioning and Temperature During Germination of 73 Natural Accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, *97*(4), 623-634.
- Schopfer, P., & Plachy, C. (1985). Control of Seed Germination by Abscisic Acid: III. Effect on Embryo Growth Potential (Minimum Turgor Pressure) and Growth Coefficient (Cell Wall Extensibility) in *Brassica napus* L. *Plant Physiology*, *77*(3), 676-686.
- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., & Yamaguchi, S. (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, *69*(4), 463-472.
- 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 physiology*, *104*(2), 363-371.

- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M. (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 8129-8133.
- Shu, K., Liu, X., Xie, Q., & He, Z. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Molecular Plant*, 9(1), 34-45.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., & Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA Gene Encodes a Transcriptional Regulator Repressing the Gibberellin Signal Transduction Pathway. *The Plant Cell*, 10(2), 155-169.
- Stamm, S. (2002). Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: A new dimension of the human genome. *Human Molecular Genetics*, 11(20), 2409-2416.
- Stamm, S. (2008). Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(3), 1223-1227.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T. A., & Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene*, 344, 1-20.
- Steber, C.M.; McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 125: 763–769.
- Strader, L. C., Ritchie, S., Soule, J. D., McGinnis, K. M., & Steber, C. M. (2004). Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene *SLEEPY1* are rescued by overexpression of its homologue, *SNEEZY*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(34), 12771-12776.
- Stutte, G. W. (2009). Light-emitting Diodes for Manipulating the Phytochrome Apparatus. *HortScience*, 44(2), 231-234.
- Sugliani, M., Brambilla, V., Clercx, E. J. M., Koornneef, M., & Soppe, W. J. J. (2010). The Conserved Splicing Factor *SUA* Controls Alternative Splicing of the Developmental Regulator *ABI3* in *Arabidopsis*[W][OA]. *The Plant Cell*, 22(6), 1936-1946.
- Tanabe, N., Yoshimura, K., Kimura, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2007). Differential Expression of Alternatively Spliced mRNAs of *Arabidopsis* SR Protein Homologs, *atSR30* and *atSR45a*, in Response to Environmental Stress. *Plant and Cell Physiology*, 48(7), 1036-1049.
- Tesis de Licenciatura de Servi, L. (2019). Regulación del splicing alternativo durante la germinación

por luz en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Buenos Aires.

Tesis Doctoral de Tognacca, R. S. (2018). Caracterización funcional de genes involucrados en la germinación mediada por luz y temperatura en semillas de *Arabidopsis thaliana*.

Universidad de Buenos Aires.

Thompson, L. (1994). The Spatiotemporal Effects of Nitrogen and Litter on the Population Dynamics of *Arabidopsis Thaliana*. *Journal of Ecology*, *82*(1), 63-68.

Tognacca, R. S., Rodríguez, F. S., Aballay, F. E., Cartagena, C. M., Servi, L., & Petrillo, E. (2023).

Alternative splicing in plants: Current knowledge and future directions for assessing the biological relevance of splice variants. *Journal of Experimental Botany*, *74*(7), 2251-2272.

Tognacca, R. S., Servi, L., Hernando, C. E., Saura-Sanchez, M., Yanovsky, M. J., Petrillo, E., & Botto, J. F. (2019). Alternative Splicing Regulation During Light-Induced Germination of *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1076.

Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Sun, T. (2004). DELLA Proteins and Gibberellin-Regulated Seed Germination and Floral Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *135*(2), 1008-1019. van Bentem, S. de la F., Anrather, D., Roitingner, E., Djamei, A., Hufnagl, T., Barta, A., Csaszar, E., Dohnal, I., Lecourieux, D., & Hirt, H. (2006). Phosphoproteomics reveals extensive in vivo phosphorylation of *Arabidopsis* proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Research*, *34*(11), 3267-3278.

Vera-Sirera, F., Gomez, M. D., & Perez-Amador, M. A. (2016). Chapter 20—DELLA Proteins, a Group of GRAS Transcription Regulators that Mediate Gibberellin Signaling. En D. H. Gonzalez (Ed.), *Plant Transcription Factors* (pp. 313-328). Academic Press.

Vishal, B., & Kumar, P. P. (2018). Regulation of Seed Germination and Abiotic Stresses by Gibberellins and Abscisic Acid. *Frontiers in Plant Science*, *9*.

Wachter, A., & Hartmann, L. (2014). NMD: Nonsense-Mediated Defense. *Cell Host & Microbe*, *16*(3), 273-275.

Wang, Z., Ji, H., Yuan, B., Wang, S., Chao, S., Yao, B., Zhao, H., & Li, X. (2015). ABA signalling is fine-tuned by antagonistic HAB1 variants. *Nature Communications*, *6*, 8138.

Wu, J. Y., & Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site

- selection and regulated alternative splicing. *Cell*, 75(6), 1061-1070.
- Xu, H., Lantzouni, O., Bruggink, T., Benjamins, R., Lanfermeijer, F., Denby, K., Schwechheimer, C., & Bassel, G. W. (2020). A Molecular Signal Integration Network Underpinning Arabidopsis Seed Germination. *Current Biology: CB*, 30(19), 3703-3712.e4.
- Xue, C., Zhang, H., Lin, Q., Fan, R., & Gao, C. (2018). Manipulating mRNA splicing by base editing in plants. *Science China. Life Sciences*, 61(11), 1293-1300.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S. A., & Nagatani, A. (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *The Journal of Cell Biology*, 145(3), 437-445.
- 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[W]. *The Plant Cell*, 16(2), 367-378.
- Yamauchi, Y., Takeda-Kamiya, N., Hanada, A., Ogawa, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2007). Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed Arabidopsis thaliana seeds. *Plant & Cell Physiology*, 48(3), 555-561.
- Yan, Q., Xia, X., Sun, Z., & Fang, Y. (2017). Depletion of Arabidopsis SC35 and SC35-like serine/arginine-rich proteins affects the transcription and splicing of a subset of genes. *PLOS Genetics*, 13(3), e1006663.
- Yoshida, H., & Ueguchi-Tanaka, M. (2014). DELLA and SCL3 balance gibberellin feedback regulation by utilizing INDETERMINATE DOMAIN proteins as transcriptional scaffolds. *Plant Signaling & Behavior*, 9(9), e29726.
- Yu, X., Liu, H., Klejnot, J., & Lin, C. (2010). The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, e0135.
- Zhang, R., Calixto, C. P. G., Marquez, Y., Venhuizen, P., Tzioutziou, N. A., Guo, W., Spensley, M., Entizne, J. C., Lewandowska, D., Ten Have, S., Frei Dit Frey, N., Hirt, H., James, A. B., Nimmo, H. G., Barta, A., Kalyna, M., & Brown, J. W. S. (2017). A high quality Arabidopsis transcriptome for accurate transcript-level analysis of alternative splicing. *Nucleic Acids Research*, 45(9), 5061-5073.

Zhu, F. Y., Chen, M. X., Ye, N. H., Shi, L., Ma, K. L., Yang, J. F., ... & Zhang, J. (2017). Proteogenomic analysis reveals alternative splicing and translation as part of the abscisic acid response in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 91(3), 518-533.