

## Tesis de Posgrado

# Estudio del fotocontrol de la germinación de semillas de *Datura Ferox* : Aspectos fisiológicos y moleculares

Burgin, María José

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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

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

**Cita tipo APA:**

Burgin, María José. (2002). Estudio del fotocontrol de la germinación de semillas de *Datura Ferox* : Aspectos fisiológicos y moleculares. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3457\\_Burgin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3457_Burgin.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Burgin, María José. "Estudio del fotocontrol de la germinación de semillas de *Datura Ferox* : Aspectos fisiológicos y moleculares". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3457\\_Burgin.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3457_Burgin.pdf)

**EXACTAS** UBA

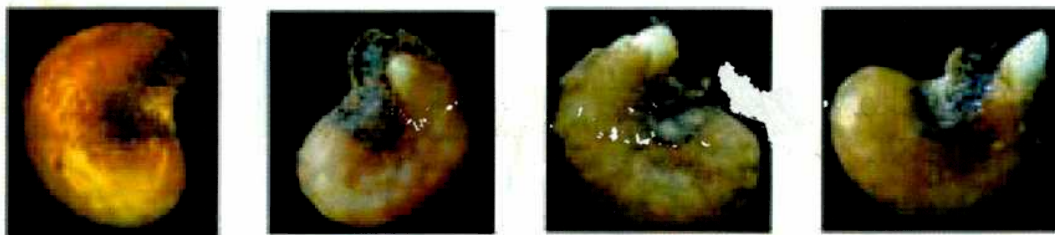
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**ESTUDIO DEL FOTOCONTROL DE LA GERMINACIÓN  
DE SEMILLAS DE *DATURA FEROX*:  
ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES**



**María José Burgin**

Nº 3487

3457

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

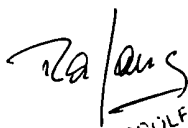
**ESTUDIO DEL FOTOCONTROL DE LA GERMINACIÓN  
DE SEMILLAS DE *DATURA FEROX*:  
ASPECTOS FISIOLÓGICOS Y MOLECULARES**

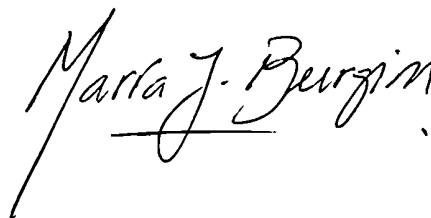
Tesis presentada para optar por el grado de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Lic. María José Burgin**  
**Director: Dr. Rodolfo A. Sánchez**  
**Consejero: Dr. Norberto Iusem**

Instituto de Investigaciones Fisiológicas Vinculadas a la Agricultura (IFEVA)  
Cátedra de Ecología y Fisiología Vegetal  
Facultad de Agronomía  
Universidad de Buenos Aires

2002

  
DR. AGR. RODOLFO SANCHEZ  
PROFESOR TITULAR





## ***Agradecimientos***

Primero que nada quiero agradecer al IFEVA... por estar donde está, rodeado de todo ese increíble verde y contener a toda esa gente.....que ha llenado todos estos años no sólo de trabajo, sino de muchos amigos.....

A Rodolfo, mi jefe, por aceptarme como su becario, por ayudarme y enseñarme durante todos este tiempo.....a Lucila, por enseñarme de su instinto con las *Daturas*.....a Alejandra, por acompañarme en todo un montón.....a Vero, por este último tiempo que compartimos intensamente y por estar ahí todos los días..... a Javier y a Nacho por darme una mano siempre que la necesite.

A Marcelo, por darme la primera pista de que el IFEVA era el lugar correcto para trabajar, y a Jorge Casal por darme la primera oportunidad de hacerlo....

A todos mis queridísimos compañeros de oficina de todos estos años....a Hernán, a Laura, a Agus, a Marino, a Pamela y Rox..... a todos los Casales, ...Tere, Laura y Karina....por hacer increíblemente divertidos, acompañados y cortos, todos los días de trabajo.

A todo el grupo de UV.....por el nitrógeno, el zip, la grabadora de CDs, el Multianalist.....por la paciencia y la inmensa ayuda...en particular a Ana, a Carla, a Carlos, a Miriam, a Mariela y a todos los demás.....

A Campomar en general y en particular al Dr. Stanelloni, por brindarme tan abiertamente su laboratorio.....a la gente del lab 208, en particular a Majo y Ale.....a las chicas del 206, Paula y Faby, por tanta y tan incondicional ayuda....A Jime, por la amistad y las secuencias..... y a toda la gente de Campomar, que hace que tantas cosas sean mucho más fáciles.

A los amigos de *afuera*, a Fer Carrari, a Vale Tekiel y a la Suris...por los consejos, el soporte y las impresiones.

# ÍNDICE

<i>Resumen</i> .....	IV
<i>Abstract</i> .....	V
<i>Abreviaturas</i> .....	VI
<i>Publicaciones y manuscritos en preparación</i> .....	VII
<i>Presentaciones a congresos</i> .....	VII

## Capítulo I

### ***Introducción General***

<i>Introducción general</i> .....	I
<i>Los fitocromos</i>	
<i>Estructura y función</i> .....	2
<i>Fotobiología</i> .....	3
<i>Origen y evolución</i> .....	5
<i>Modos de acción: LFR, VLFR y HIR</i> .....	5
<i>LFRs</i> .....	6
<i>VLFRs</i> .....	6
<i>HIRs</i> .....	7
<i>Dormición de semillas y respuestas a la luz</i> .....	8
<i>Fitocromos en semillas</i> .....	9
<i>Germinación y fitocromo en ambientes naturales</i> .....	9
<i>Procesos fisiológicos involucrados en la germinación de las semillas</i> .....	10
<i>Fisiología de la germinación de semillas con dormición impuesta por las cubiertas</i> .....	11
<i>Mecanismo de acción del fitocromo en la germinación</i>	
<i>Hormonas: giberelinas y ácido abscisico</i> .....	12
<i>Hidrolasas de pared</i> .....	14
<i>Expansinas</i> .....	16
<b>OBJETIVOS DE ESTA TESIS</b> .....	17

## Capítulo II

### ***Estudio a nivel fisiológico de la acción antagónica de los modos de acción LFR y HIR en el control de la germinación de semillas de Datura ferox***

INTRODUCCIÓN .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	33

## Capítulo III

### ***Estudio de la acción antagónica de los modos de acción LFR y HIR, en semillas de Datura ferox, sobre el nivel de transcritos de algunos genes relacionados con la germinación***

INTRODUCCIÓN.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	44
DISCUSIÓN.....	67

## Capítulo IV

### ***Estudio de la acción antagónica de los modos de acción VLFR y HIR, en semillas de Datura ferox, sobre el nivel de transcritos de algunos genes relacionados con la germinación***

INTRODUCCIÓN.....	74
MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
RESULTADOS.....	80
DISCUSIÓN.....	93

**Capítulo V**

***Discusión General***

***Introducción.....97***

***Inducción de la germinación de D. ferox: VLFR y LFR.....98***

***Inhibición de la germinación de D. ferox: HIR.....103***

***Bibliografía.....105***



## **Resumen**

Dependiendo del nivel de dormición la germinación de semillas de *Datura ferox* puede ser estimulada por la luz mediante una LFR o una VLFR. En ambos casos, esta promoción involucra el aumento de la fuerza expansiva del eje embrionario y el ablandamiento del endosperma micropilar, este último, asociado al aumento de las actividades endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa en ese tejido. El análisis del nivel de transcritos relacionados con la germinación, revela la existencia de puntos en común y diferencias importantes entre la LFR y la VLFR. La LFR produce en embriones un incremento en el nivel de transcritos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, *DfGA3 $\beta$ -hy*, y una reducción en aquellos que codifican para GA 20 oxidasa, *DfGA20-ox*, indicando un probable aumento en el contenido de giberelinas. En respuesta a la LFR, y posiblemente a la acción de las giberelinas, se observa en el endosperma micropilar un aumento en el nivel de mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, y en embriones un aumento de la acumulación de transcritos para expansinas. En semillas sensibles a la VLFR, el requerimiento de luz solo se mantiene para el aumento del nivel de transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy*, mientras que la acumulación de los otros mensajeros analizados se produce independientemente de la luz.

La germinación de *D. ferox* inducida por una VLFR, o una LFR, puede ser inhibida por una HIR. En ninguno de estos casos la HIR afecta el potencial de crecimiento del eje embrionario, siendo el blanco de la inhibición el ablandamiento del endosperma micropilar. El antagonismo LFR-HIR involucra una disminución de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, mientras que en la inhibición de la VLFR por una HIR, la promoción de las actividades endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa se encuentra bloqueada. A nivel de los distintos transcritos analizados, tanto en el antagonismo LFR-HIR como en el VLFR-HIR, se observa una fuerte relación entre nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* y los valores de germinación. En el caso de inhibición de la VLFR por la HIR, la inhibición de la actividad endo- $\beta$ -mananasa se encuentra asociada a una disminución en el nivel de los mensajeros para esta enzima. Los resultados obtenidos indican que los efectos de la HIR sobre la actividad de endo- $\beta$ -mananasa pueden deberse, tanto a una reducción en el nivel de mensajeros para esta enzima (VLFR), como a algún proceso posterior al establecimiento de dichos niveles, que determina una disminución de esta actividad enzimática (LFR).

## ***Abstract***

*Datura ferox* seed germination can be promoted by a LFR or a VLFR, according to dormancy levels. In both cases, this promotion involves an increase in embryo growth potential and endosperm softening. Endosperm weakening is related to an increase in endo- $\beta$ -mannanase y  $\beta$ -mannosidase activities. The analysis of transcript levels related to germination, reveal some common points but also differences between germination induced by a LFR, or by a VLFR. In response to the LFR, transcript accumulation for GA 3  $\beta$ -hydroxylase, *DfGA3 $\beta$ -hy*, is promoted in embryos, while a reduction in those for GA 20 oxidase, *DfGA20-ox*, is observed, suggesting an increase in gibberellin content. An increase in transcript levels for endo- $\beta$ -mannanase and expansins, in endosperm caps, and for expansins in embryos, is promoted by the LFR and gibberellins. In seeds sensible to the VLFR, the light requirement is only maintained for the rise in *DfGA3 $\beta$ -hy* transcripts level, while the other analyzed transcripts accumulated independently of the light.

Germination of *D. ferox* induced by a LFR, or a VLFR, can be inhibited by a HIR. It could not be detected any affect of HIR on embryo growth potential. Endosperm softening is the target of the inhibition by the HIR. Endo- $\beta$ -mannanase activity promoted by LFR is deeply diminished by HIR. In the VLFR, the promotion of endo- $\beta$ -mannanase y  $\beta$ -mannosidase activities is cancelled by the HIR. HIR inhibition of germination, promoted by VLFR or LFR, is linked to the pattern of GA 3  $\beta$ -hydroxylase transcript accumulation. In the VLFR-HIR antagonism, endo- $\beta$ -mannanase activity inhibition is related to a decrease in the transcripts level for this enzyme. These results indicated that endo- $\beta$ -mannanase activity could be affected by HIR by a lowering on its transcripts level (VLFR), or by some other process given after the establishment of this transcripts level, determining a drop in enzyme activity.

## ***Abreviaturas***

ABA	ácido absclísico
<i>DfExp1</i>	gen de <i>Datura ferox</i> para expansina 1
<i>DfExp2</i>	gen de <i>Datura ferox</i> para expansina 2
<i>DfGA20-ox</i>	gen de <i>Datura ferox</i> para GA 20 oxidasa
<i>DfGA3<math>\beta</math>-hy</i>	gen de <i>Datura ferox</i> para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa
<i>DfMan</i>	gen de <i>Datura ferox</i> para endo- $\beta$ -mananasa
GAs	giberelinas
HIR	respuesta a las altas irradiancias
LFR	respuesta a bajos flujos
P	Pr + Pfr
PCR	<i>Poly Chain Reaction</i>
Pfr	forma activa de los fitocromos
Pfr/P total	fotoequilibrio de los fitocromos
Pr	forma inactiva de los fitocromos
R	luz roja
RL	luz roja lejana
RLc	luz roja lejana continua
RT	Reacción de retro-transcripción
VLFR	respuesta a muy bajos flujos
wt	tipo salvaje

### ***Publicaciones y manuscritos en preparación***

- Iapalucci, S., Cherňavsky, A., Rossi, C., **Burgin**, M.J. y Franze-Fernández M.T.; CEVAN-CONICET, Bs. As. (1994), TACARIBE GENE EXPRESSION IN CYTOPHATHIC AND NON-CYTOPHATHIC INFECTIONS, *Virology*, Vol 200, pp.613.
- **Burgin**, M.J., Casal J.J., Whitelam G.G. and R.A. Sánchez (1999). A POOL OF PHYTOCHROME MORE ABUNDANT IN DARK- THAN IN LIGHT-GROWN TISSUES AND RUDIMENTARY RESPONSES TO FAR-RED LIGHT ARE PRESENT IN *PINUS ELLIOTTI* AND *PESUDOTSUGA MENZIESI*, *Journal of Experimental Botany*, **50**, 831-836.
- de Miguel, L.; **Burgin**, M.J., Casal J.J., and R.A. Sánchez. (2000). INHIBITION OF GERMINATION BY HIGH IRRADIANCE RESPONSE (HIR) IN *DATURA FEROX* SEEDS: CHANGES IN ENDOSPERM AND EMBRYO, *Journal of Experimental Botany* **51**, 1127-1133.
- **Burgin**, M.J.; Pérez Flores, L.; Mella, A.; Staneloni, R. and Sánchez, R.A. THE RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTAGONISTIC ACTION OF LOW-FLUENCE AND HIGH-IRRADIANCE RESPONSES OF PHYTOCHROME ON GERMINATION, AND TRANSCRIPTS LEVELS OF GA3 $\beta$ HYDROXYLASE, GA20 OXIDASE AND ENDO- $\beta$ -MANNANASE GENES, (manuscrito en preparación).
- Mella, R.A., **Burgin**, M. J., Stanelloni, R.J. AND R.A. Sánchez. EXPANSIN GENE EXPRESSION IS REGULATED BY PHYTOCHROME DURING INDUCTION OF GERMINATION IN *DATURA FEROX* L. SEEDS, (manuscrito en preparación).

### ***Presentaciones a congresos***

- M.J. **Burgin**, M.V. Arana, L. De Miguel, R. Stanelloni y R.A. Sánchez, RESPONSES OF *DATURA FEROX* SEEDS TO A FAR-RED-LIGHT PULSE ARE INHIBITED BY CONTINUOUS FAR-RED-LIGHT IRRADIATION. VII International Workshop on Seed Biology, Salamanca, España, 2002 (aceptado).
- R. Alejandra Mella, Maria José **Burgin**, Roberto J. Stanelloni and Rodolfo A Sánchez EXPANSINS GENE EXPRESSION IS REGULATED BY PHYTOCHROME DURING THE INDUCTION OF GERMINATION IN *DATURA FEROX* L. SEEDS. VII International Workshop on Seed Biology, Salamanca, España, 2002 (aceptado).
- de Miguel, L., Arana, V., **Burgin**, M. J. and Sánchez, R. A. THE RESPONSE OF MICROPYLAR ENDOSPERM CELLS TO GIBBERELLIN STIMULUS OF  $\beta$ -MANNANASE ACTIVITY AND  $\beta$ -MANNANASE AND EXPANSIN GENE EXPRESSION IS INCREASED BY A FACTOR PRODUCED BY THE EMBRYO IN

*DATURA FEROX* SEEDS. VII International Workshop on Seed Biology, Salamanca, España, 2002 (aceptado).

- **Burgin**, M. J.; Pérez Flores, L.; Mella, A.; Staneloni, R. and Sánchez, R. A. THE TRANSCRIPTION OF  $\beta$ -MANNANASE AND GA 3 $\beta$ -HYDROXYLASE GENES OF *DATURA FEROX* SEEDS IS REGULATED BY PHYTOCHROME. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Plant Biology 2000, San Diego, CA, USA. Abstract 146.

- Mella, A.; **Burgin**, M. J.; Staneloni, R. and Sánchez, R. A. EXPANSINS GENE EXPRESSION IS REGULATED BY PHYTOCHROME DURING DORMANCY BREAKAGE IN *DATURA FEROX* L. seeds. Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, Plant Biology 2000, San Diego, CA, USA. Abstract 152.

- L. de Miguel, M.J. **Burgin**, J.J. Casal y R.A. Sánchez, IFEVA, Facultad de Agronomía, UBA-CONICET, "INHIBITION OF GERMINATION BY HIGH IRRADIANCE RESPONSE (HIR) IN *DATURA FEROX* SEEDS: CHANGES IN ENDOSPERM AND EMBRYO", VI International Workshop on Seed Biology, 24 al 28 de enero de 1999, Mérida, Yucatán, México. Comunicación oral presentada por el Dr. Rodolfo A. Sánchez.

- L. de Miguel, M.J. **Burgin**, J.J. Casal y R.A. Sánchez, IFEVA, Facultad de Agronomía, UBA-CONICET, "LA INHIBICIÓN DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *DATURA FEROX* POR LA RESPUESTA DE ALTA IRRADIANCIA: CAMBIOS EN EL ENDOSPERMA Y EN EL EMBRIÓN", Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, 23 al 25 de noviembre de 1998, Mar del Plata, Argentina.

- **Burgin**, M.J.; Casal, J.J. y Sánchez, R.A.. IFEVA-CONICET, Bs. As. "PHYTOCHROME AND PHOTOMORPHOGENESIS IN GYMNOSPERMS", XIII PABMB Congress, noviembre de 1996, Pucón, Chile.

-Iapalucci, S., Cherflavsky, A., Rossi, C., **Burgin**, M.J. y Franze-Fernández M.T.; CEVAN-CONICET, Bs. As.."EVENTOS MOLECULARES EN INFECCIONES LÍTICAS Y PERSISTENTES POR UN ARENAVIRUS", SAIB 1992, Huerta Grande, Córdoba.

-Iapalucci, S., Cherflavsky, A., Rossi, C., **Burgin**, M.J. y Franze-Fernández M.T.; CEVAN-CONICET, Bs. As.."TACARIBE GENE EXPRESSION IN CYTOPHATHIC AND NON-CYTOPHATHIC INFECTIONS", IXTH. Congress of Virology, 1993, Glasgow, Escocia.



### ***Introducción general***

Las plantas dependen de la luz como única fuente de energía y sólo pueden completar su ciclo de vida aprovechando adecuadamente este recurso, lo que implica coordinar su crecimiento y desarrollo, desde la germinación hasta la floración, con su ambiente, en particular con el ambiente lumínico. Esta coordinación depende de su capacidad de sentir, evaluar y responder a la cantidad, calidad y dirección de la luz. Para lo cual las plantas poseen un variado conjunto de fotorreceptores que les permiten discriminar la luz en un rango extraordinariamente amplio de flujo y calidad espectral.

La región del espectro que abarca la banda de luz roja (R) y roja lejana (RL) es particularmente rica en información sobre el ambiente. La presencia de canopeo y de plantas vecinas provocan cambios en la relación R/RL que brinda información a las semillas y plántulas que se encuentran próximas o en la superficie del suelo (Smith, 2000). La familia de fotorreceptores que permiten monitorear la banda R-RL del espectro se conoce como la de los **fitocromos**, estos fueron los primeros fotorreceptores identificados en plantas (Butler *et al.*, 1959; Fankhauser, 2001). Se los encuentra a través de todo el reino vegetal y recientemente también se los ha identificado en bacterias (Vierstra y Davis, 2000). Los primeros fotorreceptores para la luz azul en ser descubiertos fueron dos **criptocromos** (Christie y Briggs, 2001). Posteriormente, otros dos receptores para la luz azul fueron identificados conocidos como **fototropinas** (Christie y Briggs, 2001). Los fitocromos y criptocromos se encuentran principalmente involucrados en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, mientras que las fototropinas controlan el fototropismo, el movimiento de los cloroplastos (Christie y Briggs, 2001) y la apertura de estomas (Toshinori *et al.*, 2001).

## ***Los fitocromos***

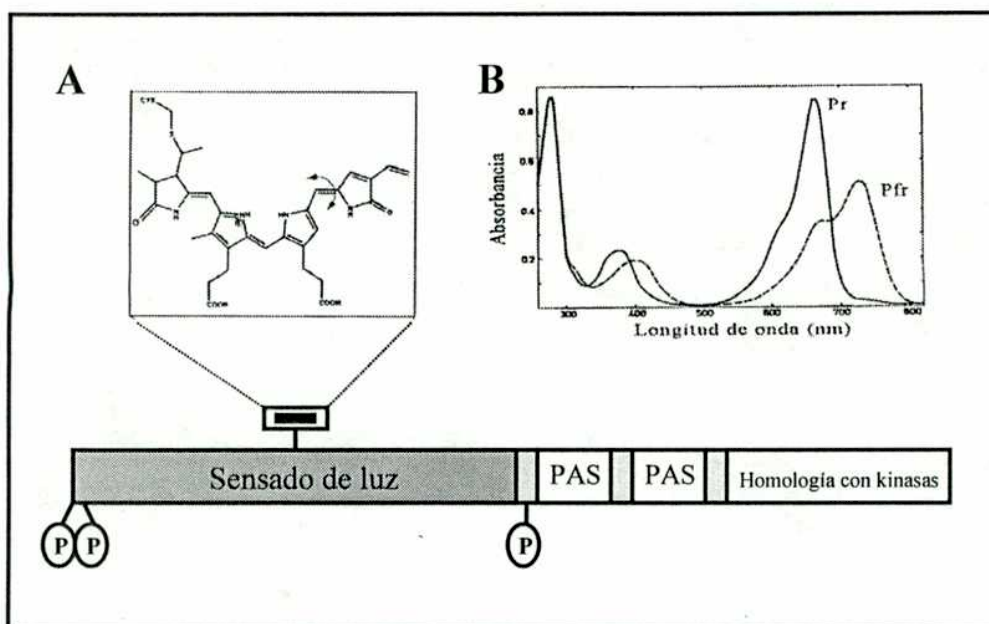
### ***Estructura y función***

Hasta los años setenta se creyó en la existencia de un único fitocromo que mediaba las múltiples respuestas a la luz, realizándose enormes esfuerzos para purificarlo y caracterizarlo bioquímicamente (Briggs y Rice, 1972). Sin embargo, recién en 1983 se reportó la purificación de un fitocromo (Lagarias, 1985; Vierstra y Quail, 1983) y unos años más tarde se publicaron las primeras secuencias obtenidas (Abe *et al.*, 1989; Sharrock y Quail, 1989).

En las especies estudiadas, los fitocromos se encuentran codificados por una pequeña familia multigénica (Clack *et al.*, 1994; Cordonier-Pratt *et al.*, 1994; Sharrock y Quail, 1989, Wang *et al.*, 1991; *ect*). En *Arabidopsis* y en tomate los fitocromos están codificados por cinco genes distintos (Clack *et al.*, 1994; Pratt *et al.*, 1997). En *Arabidopsis* estos genes se denominan *PHYA-E*. Los cuales se expresan a través de toda la planta con pequeñas diferencias en sus patrones (Goosey, 1997).

Los fitocromos se encuentran formando dímeros de aproximadamente 125 kDa por cadena polipeptídica. Cada monómero puede ser dividido en distintas regiones funcionales (Fig. I. 1 A). El dominio amino-terminal, de unos 60 kDa, incluye el sitio de unión covalente al cromóforo, un tetrapirrol lineal de cadena abierta; mientras que el dominio carboxi-terminal es el responsable de la transducción del estímulo luminoso. Esta región puede a su vez ser subdividida en dos regiones. Una de ellas inmediatamente adyacente al sitio de unión al cromóforo, de 30 kDa, contiene dos dominios PAS, y la otra hacia el extremo carboxi-terminal, que presenta cierta homología con los sistemas de dos componentes bacterianos histidina quinasa (Fankhauser, 2000).





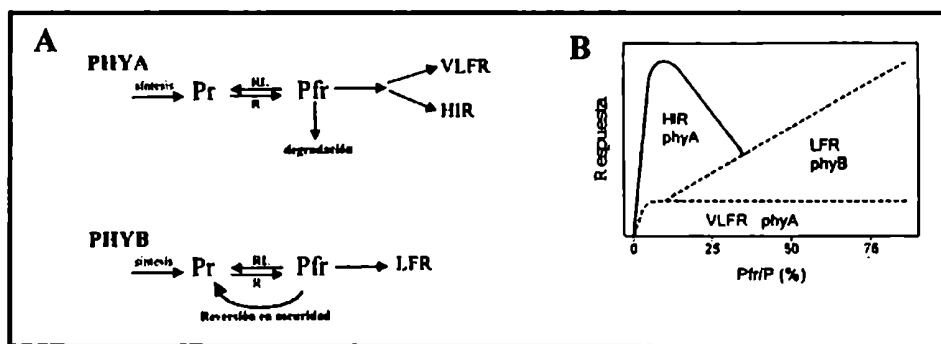
**Figura I. 1. Diagrama en bloques de la estructura en dominios una molécula de fitocromo (A).** Se indican: el sitio de unión al cromóforo, los dominios PAS, los posibles sitios de fosforilación (P) y el dominio con homología a histidina quinasa (Genick y Chory, 2000). **Espectro de absorción del fitocromo de Avena (B).** Los espectros fueron realizados después de un pulso de R (---) o de RL (—), estableciéndose fotoequilibrios del 85 % y del 3 %, respectivamente (Rüdiger y Thümmler, 1994).

### Fotobiología

Los fitocromos se encuentran en dos formas interconvertibles: una posee un máximo de absorción en R (660 nm), **Pr**, y otra un máximo de absorción en RL (730 nm), **Pfr**. Sin embargo, existe un solapamiento entre los espectros de absorción de ambas formas (Fig. I. 1 B), lo cual implica que cuando semillas u otro material vegetal es irradiado la fototransformación ocurre en ambas direcciones. Estableciéndose así un determinado nivel de Pfr del fitocromo total (Pfr/P), donde un pulso saturante de R determina un Pfr/P estimado del 87 %, mientras que uno de RL establece un Pfr/P de 0.03 % (es decir, 97 % de Pr). Las reacciones de fotoconversión entre el Pr y Pfr generan una serie de intermediarios de vida corta, de los cuales algunos de ellos pueden acumularse durante irradiaciones continuas (Kendrick y Spruit, 1977; Mancinelli, 1994).

La cantidad total de determinado fitocromo en un tejido depende del balance entre su síntesis y destrucción (Fig. I. 2 A). En las plantas los fitocromos son sintetizados en la forma Pr. De acuerdo a la estabilidad de la forma Pfr, los fitocromos se dividen en: tipo I, inestables (PHYA) y tipo II, estables (PHYB, C, D y E). Los distintos fitocromos pueden revertir en Pfr a Pr en oscuridad, lo cual ocurre en semillas, en tejidos etiolados o de-etiolados (Mancinelli, 1994). El fitocromo A (PHYA) es el más abundante en plántulas etioladas, degradándose rápidamente a partir de su forma Pfr, luego de una breve exposición a la luz. La vida media del PHYA es de 1-2 hs (Vierstra, 1994) y su degradación se encuentra mediada por ubiquitinación a través del sistema del proteosoma (Clough *et al.*, 1999). El fitocromo B (PHYB) es el más abundante de los fitocromos de tipo II en plántulas o plantas que crecen a la luz (Clack *et al.*, 1994; Hirschfeld *et al.*, 1998)

Es importante recalcar que bajo una determinada condición de luz y en un determinado tejido, probablemente existan unas doce (o más) especies de fitocromo de acuerdo al estado de fosforilación, localización nuclear/citoplasmática, Pfrs/ Prs y al menos para el PHYA alguno de sus intermediarios de ciclado. Cada una de estas especies puede tener distinta actividad biológica, distinta afinidad por sustratos o distintos sustratos, y por todo ello un papel diferente y específico en la regulación de las distintas respuestas a la luz (Reed, 1999).



**Figura I. 2. Modos de acción de los fitocromos.** En (A) se esquematizan los procesos que pueden afectar las cantidades de Pr y Pfr presentes en un determinado tejido y los distintos modos de acción desencadenados por cada fitocromo. En (B) se representan esquemáticamente los modos de acción de los fitocromos en función del fotoequilibrio calculado (Pfr/P) (Casal, *et al.*, 1998).

### *Origen y evolución*

Genes de tipo *PHY* se encuentran presentes no sólo en plantas verdes, incluyendo gimnospermas y helechos, sino también en algas, hongos, y bacterias (Smith, 2000). Los fitocromos de plantas y bacterias presentan actividad quinasa regulada por luz. Los fitocromos bacterianos tienen actividad histidina-quinasa, mientras que los de plantas catalizan fosforilaciones en residuos de treonina/serina. Lo cual sugiere que la actividad treonina/serina quinasa evolucionó a partir de una histidina quinasa ancestral (Fankhauser, 2000; McCarty y Chory, 2000).

El análisis filogenético de las secuencias de *PHY* de plantas superiores apunta a la existencia de cuatro eventos de duplicación durante la evolución de los genes *PHY*. La primera, habría ocurrido cerca del origen de las plantas con semillas, generando las líneas *PHYA/C* y *PHYB/D/E*. Dos duplicaciones posteriores, cerca del origen de las plantas con flores habrían separado al *PHYA* del *PHYC*, y al *PHYB/D* del *PHYE*. Mientras que la divergencia del *PHYB* y el *PHYD* sería mucho más reciente (Smith, 2000).

Los *PHYs* actuales se habrían originado a partir de un progenitor procariótico, en el cual presumiblemente cumpliera con una simple función de sensor de luz; donde la capacidad de fotoconversión entre las formas Pr y Pfr, puede haber carecido de importancia funcional. Sin embargo, esta propiedad habría sido seleccionada y refinada a través de la evolución de las plantas terrestres. Convirtiéndose así en un sistema sensor de múltiples componentes con una importancia tal como la tiene el sentido de la vista en animales (Smith, 2000).

### *Modos de acción: LFR, VLFR y HIR*

Los fitocromos median respuestas durante todo el ciclo de vida de la planta, respondiendo a la intensidad y calidad de luz en un rango dinámico de varios órdenes de magnitud. La germinación de semillas, la de-etiolación de plántulas, el desarrollo de la maquinaria fotosintética, la arquitectura de la planta y el momento de la floración entre otras respuestas, se encuentran controladas por la percepción del ambiente luminoso a través del sistema de los fitocromos.

### *LFRs*

Las respuestas mediadas por fitocromo mejor estudiadas son aquellas que se inducen por una dosis de luz que va desde  $1 \mu\text{mol m}^{-2}$  (0,1 segundo bajo un canopeo denso o unos pocos milímetros bajo la superficie del suelo) hasta unos  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$  (0,5 segundos bajo la luz de pleno día) (Fig. I. 2 B). Estas respuestas se denominan LFRs por *Low Fluence Response* y presentan la característica de ser inducidas por un pulso de R y revertidas por otro de RL. La magnitud de la reversión por el pulso de RL va disminuyendo a medida que aumenta el tiempo transcurrido entre el pulso de R y el de RL (Casal *et al.*, 1998). Los fitocromos involucrados en la inducción de la germinación en estas condiciones son el PHYB (Botto *et al.*, 1995) y PHYE (Hennig *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* los mutantes *phyB* muestran una respuesta germinativa deficiente en el rango de la LFR (Botto *et al.*, 1995), mientras que esta deficiencia no se observa en los mutantes *phyA* (Botto *et al.*, 1996). El doble mutante *phyA phyB* presenta una LFR residual indicando la participación de otro fitocromo en esta respuesta (Botto *et al.*, 1995; Poppe y Schafer, 1997; Yang *et al.*, 1995), que desaparece completamente en el triple mutante *phyA phyB phyE* (Hennig *et al.*, 2002).

### *VLFRs*

Bajo ciertas condiciones un pulso de RL es capaz de promover la germinación de semillas por sobre los valores de germinación obtenidos para las mismas en oscuridad (Casal y Sánchez, 1998). Una dosis de fotones tan baja como  $0,1 \mu\text{mol m}^{-2}$ , donde se establece un nivel de Pfr/P de aproximadamente 0,01 %, es suficiente para inducir la germinación. Estas respuestas son llamadas VLFRs por *Very Low Fluence Response* (Fig. I. 2 B). El establecimiento de niveles de Pfr muy bajos alcanzan no solo para inducir, sino incluso para saturar la respuesta, por lo que no presentan reversión por RL (Casal *et al.*, 1998). Los mutantes *phyA* de *Arabidopsis* carecen de VLFR, tanto para la germinación (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996) como para otro tipo de respuestas (Casal *et al.*, 1998) indicando que la misma se encuentra mediada por el PHYA.

Si ambos modos de acción, VLFR y LFR, se encuentran regulando una determinada respuesta se observa entonces una curva bifásica entre la magnitud de la respuesta y la

cantidad de Pfr. Este tipo de respuestas bifásicas pueden manifestarse para la germinación tanto en el laboratorio (Blaauw-Jansen y Blaauw, 1975; Cone *et al.*, 1985; Rethy *et al.*, 1987) como en condiciones naturales (Derkx y Karssen, 1993; Scopel *et al.*, 1991). Otras respuestas mediadas por los fitocromos como el alargamiento de los hipocotilos y la apertura de los cotiledones durante la de-etiolación también muestran este tipo de patrones (Casal *et al.*, 1998).

### *HIRs*

Los efectos de la luz RL continua (RLc) sobre la germinación de semillas y otros procesos fisiológicos son conocidos como HIRs por *High Irradiance Responses* (Fig. I. 2 B). Este tipo de respuestas no cumplen con la ley de reciprocidad: pulsos poco frecuentes de la misma longitud de onda y de igual flujo total que una irradiación continua, no producen el mismo efecto (Casal *et al.*, 1998). La demostración, a nivel fotobiológico, de que las HIRs se encuentran mediadas por el sistema de los fitocromos fue llevada a cabo por Hartmann (1966), quién trabajó con la germinación de semillas de lechuga expuestas a luz RL (766 nm) por períodos prolongados e irradiando simultáneamente con cantidades variables de luz R (658 nm). Hartmann observó que el agregado de distintas cantidades de R al fondo de RL producía un patrón de respuesta de tipo campana invertida. El máximo de la inhibición de la germinación se encontraba en aquella relación R/RL que establecía un Pfr/P calculado de 10 %, observándose una muy buena correlación del efecto de RLc con la tasa de ciclado del fitocromo entre las formas Pr y Pfr (Hartmann, 1966).

El tipo de fitocromo involucrado en la inhibición de la germinación de semillas no se conocía con exactitud, aunque por analogía con otras respuestas de tipo HIR estudiadas en plántulas, el PHYA era considerado el mejor candidato (Casal y Sánchez, 1998; Casal *et al.*, 1998). Muy recientemente, utilizando mutantes de tomate se determinó que efectivamente el fitocromo que media la inhibición de la germinación a través de una HIR es el PHYA (Shichijo *et al.*, 2001).

### ***Dormición de semillas y respuestas a la luz***

El lugar y el momento de la germinación condiciona definitivamente el crecimiento y desarrollo posterior de la planta. Las semillas pueden sentir un gran número de señales ambientales, tendiendo a germinar cuando estas señales indican condiciones favorables para el establecimiento y crecimiento de las plántulas (Casal y Sánchez, 1998).

La dormición es entendida como la imposibilidad de germinar que tiene una semilla viable en condiciones adecuadas de incubación (Bewley y Black, 1982). La dormición es un estado que posee bases genéticas bajo la influencia de un gran número de factores ambientales, muy frecuente en las semillas de malezas (Koorneef *et al.*, 2002). El grado de dormición de las semillas restringe el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación (Bewley y Black, 1982), e incluso puede acotarlo al punto de no encontrarse condiciones que la permitan. Si bien un determinado factor puede ser el responsable de la ruptura de la dormición, esta es en última instancia el resultado de una compleja red de interacciones (Benech-Arnold R L, 2000).

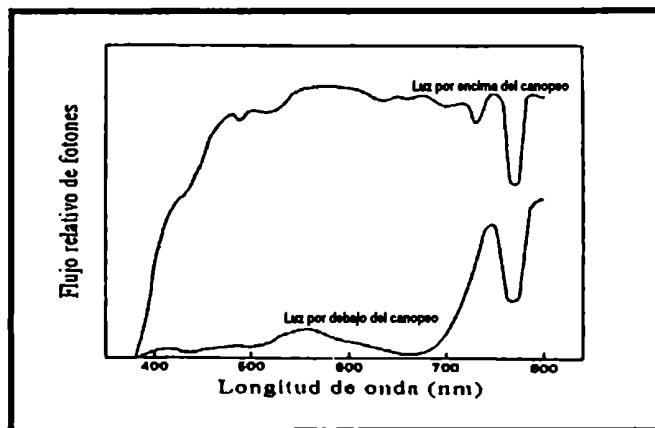
En los ambientes agrícolas las semillas de malezas caen de la planta madre, maduras y en general, profundamente dormidas. Una vez en el suelo pueden quedar enterradas o bien en la superficie. Durante su permanencia en el suelo la dormición de las semillas se va reduciendo gradualmente, aumentando así el rango de condiciones ambientales donde puede ocurrir la germinación. Dentro de este proceso de post-maduración varios factores ambientales como la humedad, el ambiente gaseoso y la temperatura tienen un papel muy importante. A medida que se va perdiendo la dormición, aumentan las posibilidades de que actúen algunos factores que pueden terminar la dormición y estimular la germinación, como es el caso de los nitratos, las temperaturas alternadas y la luz. En general estos factores se presentan en escenarios ambientales apropiados para el desarrollo futuro de las plántulas (Bewley y Black, 1982). Las respuestas a la luz dependen de la profundidad de la dormición. Cuando las semillas presentan un alto grado de dormición pueden no responder a este estímulo, o responder muy pobremente. A medida que los niveles de dormición van descendiendo aumenta la respuesta de las semillas a la luz, e incluso pueden llegar a adquirir la capacidad de germinar en oscuridad, liberándose así de este requerimiento.

### ***Fitocromos en semillas***

El requerimiento de luz para la germinación de las semillas depende en gran medida del ambiente en el cual estas se desarrollaron y de las condiciones ambientales que atravesó la planta madre (Wulff, 1995). Durante la maduración de las semillas, se produce en las mismas síntesis de fitocromo en la forma Pr. Dependiendo de las propiedades ópticas de las cubiertas seminales y de los frutos, así como de las características del ambiente lumínico que rodea los mismos, una proporción variable de este Pr puede ser transformado en Pfr, persistiendo en las semillas por largos períodos de tiempo como ocurre con el PHYB (Casal *et al.*, 1991; Reed *et al.*, 1993; Shinomura *et al.*, 1996). La germinación de semillas en oscuridad indica la presencia de Pfr en las mismas, o bien la independencia de ésta del Pfr. De acuerdo a los valores de germinación en oscuridad un tratamiento con RL puede inhibir (a través de una LFR) o estimular (mediante una VLFR) la germinación de las semillas (Casal y Sánchez, 1998).

### ***Germinación y fitocromo en ambientes naturales***

Bajo condiciones naturales los tres modos de acción del fitocromo podrían estar involucrados en el control de la germinación de semillas. La inducción de la germinación por una muy breve exposición a la luz durante el laboreo del suelo (mediante una VLFR), favorece la aparición de plántulas cuando el suelo ha sido removido y los competidores potenciales eliminados por la acción de las herramientas (Scopel *et al.*, 1991). La inducción de la germinación de semillas por altas relaciones de R/RL a nivel del suelo (mediante una LFR), se vería favorecida por la percepción de discontinuidades en el canopeo, debidas a la muerte de individuos altos en un bosque (Vázquez-Yañez y Smith, 1982), al forrajeo de animales herbívoros en pasturas (Deregibus *et al.*, 1994), o a las causadas por inundaciones (Insausti *et al.*, 1995). La inhibición de la germinación por la luz que atraviesa un canopeo presenta dos componentes: por un lado, puede impedir la inducción de una LFR y por otro puede inducir una HIR (Casal y Sánchez, 1998). La HIR contribuiría así a impedir la germinación bajo canopeos densos, y por ende bajo condiciones de alta competencia (Fig. I. 3).



**Figura I. 3.** Distribución espectral de la luz natural, antes y después de atravesar un canopy vegetal (Smith, 1979).

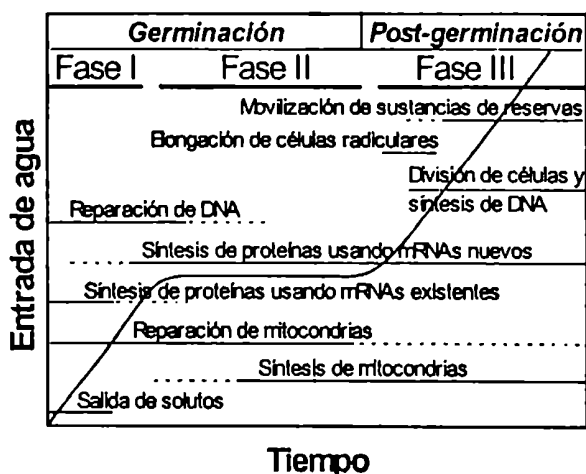
### ***Procesos fisiológicos involucrados en la germinación de las semillas***

La germinación es el proceso que comienza con la entrada de agua en la semilla durante la imbibición, y que continua con la elongación del eje embrionario hasta su culminación con la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1994). La entrada de agua en las semillas muestra un patrón trifásico (Fig. I. 4). La *fase I*, o de imbibición, corresponde a la entrada inicial de agua como consecuencia de las fuerzas mátricas. Suponiendo cubiertas permeables al agua, la entrada de la misma es independiente del estado de dormición de las semillas. Se producen entonces cambios estructurales a nivel de las membranas celulares y comienzan los procesos de reparación de la maquinaria metabólica. En condiciones naturales, el grado de imbibición se encuentra determinado por las características de las semillas, el contenido de agua del suelo y el grado de contacto entre ambos (Harper, 1977). La *fase II* se caracteriza por la estabilización de la entrada de agua. Durante esta fase, en semillas que no presentan dormición, la mayoría de los eventos metabólicos están relacionados con la preparación para la emergencia de la radícula. Las semillas dormidas también presentan actividad metabólica, aunque esta no se encuentra vinculada al reinicio del crecimiento del embrión. El inicio de la *fase III* está relacionado con la emergencia de la radícula., por consiguiente, sólo aquellas semillas en condiciones de germinar entran en esta fase. Se reinicia la entrada neta de agua, en relación con cambios que se producen en las células del embrión a medida que estas se elongan y penetran en los tejidos circundantes. La expansión del eje embrionario y su crecimiento a través de los



tejidos que lo rodean, determina la finalización del proceso germinativo (Bewley y Black, 1994).

Las posibles causas para que se inicie el crecimiento del eje embrionario estarían relacionadas con: (1) el descenso del potencial agua (componente osmótico) en las células del eje embrionario, determinando una mayor entrada de agua y por consiguiente un aumento en la presión de turgencia, causando así la elongación celular; (2) la relajación (aumento en la extensibilidad) de las paredes de las células del eje embrionario permitiendo la elongación; (3) el ablandamiento de los tejidos que circundan a la radícula permitiendo el crecimiento de la misma; (4) una combinación de estos procesos (Bewley y Black, 1994).



**Figura I. 4. Patrón trifásico de la entrada de agua en semillas durante la germinación.** Los eventos más importantes asociados a la germinación y al crecimiento post-emergencia se mencionan en la figura (Bewley, 1997 a).

#### ***Fisiología de la germinación de semillas con dormición impuesta por las cubiertas***

Los cambios fisiológicos que determinan la germinación han sido mayoritariamente estudiados en semillas que presentan dormición impuesta por los tejidos que rodean al embrión. En este tipo de semillas el control de la germinación se encuentra en el balance entre la capacidad del embrión para crecer (elongarse) y las restricciones impuestas por los tejidos que lo circundan (Bewley, 1997 a y b). El fitocromo puede afectar ambos procesos.

La promoción del crecimiento del embrión tiene un papel clave en la germinación de semillas de lechuga inducida por Pfr (Carpita *et al.*, 1979b), donde tanto una disminución en el potencial osmótico de las células del mismo, como un aumento en la extensibilidad de las paredes celulares podrían estar implicadas (Carpita *et al.*, 1979a). En semillas de *D. ferox*, el Pfr induce la germinación aumentando el potencial de crecimiento del embrión y disminuyendo la resistencia del endosperma micropilar (Sánchez y de Miguel, 1985; Sánchez y de Miguel, 1992). Previamente a la extrusión de la radícula se observan grandes modificaciones en las paredes celulares de esta región del endosperma en respuesta al Pfr (Sánchez *et al.*, 1990). En lechuga (Psaras *et al.*, 1981) y *D. ferox* (Mella *et al.*, 1995) las células del endosperma micropilar cambian su típica estructura de tejido de almacenamiento, a estructuras características de los tejidos metabólicamente activos. El ablandamiento del endosperma micropilar también se observa en la germinación en oscuridad de semillas de tomate (Nonogaki *et al.*, 1992), este proceso inicialmente fue observando en la germinación inducida por GAs en mutantes de tomate *gib-1* (Groot y Karssen, 1987).

Es importante recalcar que los procesos fisiológicos bajo control de los fitocromos que determinan la germinación solo han sido estudiados en la inducción de la germinación por una respuesta de tipo LFR. Nada se conoce sobre los mecanismos fisiológicos y su regulación por los fitocromos en la germinación promovida por una VLFR o inhibida por una HIR.

#### *Hormonas: giberelinas y ácido abscísico*

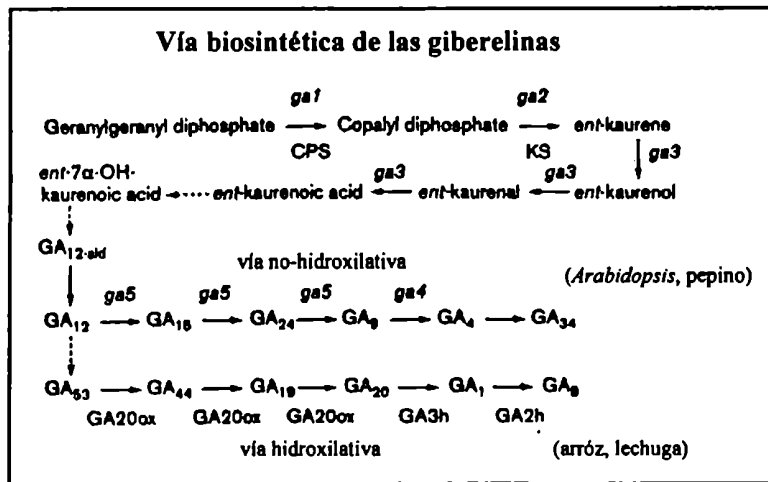
El requerimiento de luz de muchas semillas para germinar puede ser superado aplicando giberelinas (GAs) de forma exógena (Carpita *et al.*, 1979a). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos realizados sobre el papel del fitocromo en la inducción de la germinación, los mecanismos moleculares que subyacen a la participación hormonal en este proceso son escasamente conocidos.

El clonado de genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de las GAs en lechuga y *Arabidopsis*, en relación con la germinación, ha permitido el estudio de parte de estos mecanismos (Kamiya y García-Martínez, 1999). En lechuga, el contenido endógeno de GA<sub>1</sub> aumenta luego de un tratamiento con R (Toyomasu *et al.*, 1993). La GA<sub>1</sub> se

sintetiza a partir de la GA<sub>53</sub> por la acción consecutiva de dos enzimas, la GA 20 oxidasa y la GA 3β-hidroxilasa (Fig. I. 5). En estas semillas, previamente a la extrusión de la radícula, se produce un aumento en el nivel de mensajeros para GA 3β-hidroxilasa, *Ls3h1*, y una reducción de nivel de transcritos para una GA 20 oxidasa, *Ls20ox2*, en respuesta al Pfr (Toyomasu *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que el Pfr promueve un aumento en el nivel de GA<sub>1</sub>, mediante la inducción de la expresión de *Ls3h1*. En *Arabidopsis*, existen al menos dos genes para GA 3β-hidroxilasas, *GA4* y *GA4H*, la expresión de ambos se induce por irradiación de las semillas con R. La expresión de *GA4H* se encuentra bajo control del PHYB, mientras que la de *GA4* estaría regulada por otros fitocromos (Toyomasu *et al.*, 1998).

El ácido abscísico (ABA) ha sido asociado con la dormición de semillas, debido a que puede ser detectado tanto en semillas en desarrollo como maduras, y que aplicado de forma exógena inhibe la germinación (De Greef y Fredericq, 1983; Koorneef *et al.*, 2002). La existencia de mutantes deficientes en ABA o insensibles al mismo, así como la manipulación genética del contenido de ABA en semillas, han llevado a la hipótesis de que la ausencia o la insensibilidad al mismo durante el desarrollo de las semillas, determina la producción de semillas que no presentan dormición. El ABA actúa también después de la madurez de semillas, inhibiendo la germinación (Koorneef *et al.*, 2002).

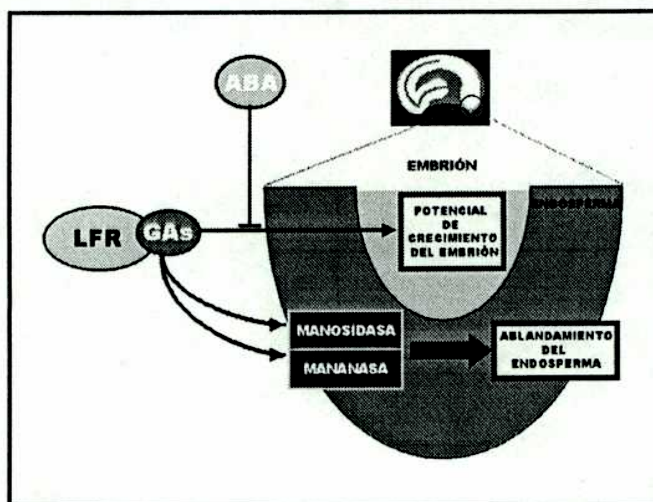
En el caso de semillas con dormición impuesta por los tejidos que rodean al embrión, la inhibición de la germinación por ABA puede estar relacionada tanto con el bloqueo del crecimiento del embrión como con el ablandamiento del endosperma. En *D. ferox* la acción del ABA bloquea el potencial de crecimiento del embrión sin interferir con el proceso de ablandamiento del endosperma (de Miguel L *et al.*, 1999; Sánchez y de Miguel, 1985). En tomate, la información existente de los efectos del ABA sobre el ablandamiento del endosperma es contradictoria. Mientras que unos trabajos señalan a este proceso como el blanco del bloqueo por el ABA de la germinación (Groot y Karssen, 1992; Ni y Bradford, 1993; Toorop *et al.*, 2000), otros contradicen estas observaciones (Chen y Bradford, 2000; Toorop *et al.*, 1996).



**Figura I. 5. Ruta biosintética de las giberelinas.** Las abreviaturas significan: CPS, copalil difosfato sintetasa; KS, *ent*-kauqueno sintetasa; GA20ox, GA 20 oxidasa; GA3h, GA 3β-hidroxiilasa; GA2h, GA 2β-hidroxiilasa (GA 2 oxidasa). *ga1*, *ga2*, *ga3*, *ga4* y *ga5* son mutantes biosintéticos de *Arabidopsis* (Kamiya, Y. y García-Martínez, J.L.; 1999).

### *Hidrolasas de polisacáridos*

En *D. ferox* la dureza del endosperma se encuentra relacionada con el contenido de mananos de las paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1990). El ablandamiento del endosperma micropilar, necesario para que se produzca la germinación, se encuentra relacionado con la movilización de estos polímeros (Sánchez *et al.*, 1990), debido a la acción de hidrolasas de pared, endo-β-mananasa y β-manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997). La actividad de estas enzimas promovida por el Pfr mediante una LFR, antes de que se produzca la extrusión de la radícula, requiere de la síntesis de GAs en el embrión (Sánchez y de Miguel, 1997), y no es inhibida por la aplicación de ABA (de Miguel L *et al.*, 1999). Los datos existentes hasta el momento sugieren que en *D. ferox* el Pfr promovería la producción de un factor embrionario, probablemente una GA, el cual se movilizaría al endosperma micropilar promoviendo el ablandamiento del mismo, a través de las actividades endo-β-mananasa y β-manosidasa (Fig. I. 6).



**Figura I. 6.** Esquema las acciones conocidas del Pfr, GAs y ABA en la germinación de semillas de *D. ferox* inducida por una LFR.

En tomate, a diferencia de *D. ferox*, la germinación se induce por la sola imbibición de las semillas en oscuridad. En las mutantes *gib-1* de tomate, que requieren la aplicación de GAs para germinar, se observa previamente a la emergencia de la radícula un incremento de las actividades de endo- $\beta$ -manosidasa,  $\beta$ -manosidasa y galactosidasa en respuesta a las GAs (Groot *et al.*, 1988). Se demostró que la actividad de endo- $\beta$ -mananasa también aumenta en el endosperma micropilar en semillas tipo salvaje (Nomaguchi *et al.*, 1995; Nonogaki y Morohashi, 1996). El aumento en actividad de estas enzimas es inhibido por RL (Nomaguchi *et al.*, 1995) indicando la participación del fitocromo en el proceso. En tomate se han detectado múltiples isoformas electroforéticas de endo- $\beta$ -mananasa, las cuales se expresan primero en el endosperma micropilar, y luego en el resto del endosperma y el embrión (Nonogaki y Morohashi, 1996; Nonogaki *et al.*, 1998; Toorop *et al.*, 1996; Voigt y Bewley, 1996). En 1997 se clonó la primera endo- $\beta$ -mananasa de plantas, proveniente de semillas germinadas de tomate, *LeMAN1* (Bewley *et al.*, 1997). El análisis por *Southern Blot* reveló la existencia de por lo menos cuatro genes para mananasas en el genoma de tomate (Bewley *et al.*, 1997). Posteriormente, en 2000, se aisló un nuevo ADNc que codificaba para otra endo- $\beta$ -mananasa de tomate, siendo esta vez una forma pre-germinativa, *LeMAN2* (Nonogaki *et al.*, 2000). *LeMAN2* se expresa únicamente en el endosperma micropilar previamente a la emergencia de la radícula, en semillas tipo

salvaje y en mutantes *gib-1* estimuladas por GAs. En ambos casos, la aplicación de ABA no afecta el nivel de mensajeros para esta enzima (Nonogaki *et al.*, 2000), siendo los efectos del ABA sobre la actividad de endo- $\beta$ -mananasa en tomate contradictorios como se discutió anteriormente. Debido a que no se han detectado cambios en el contenido de mananos en las paredes celulares del endosperma, y a que el aumento en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa se produce muy cerca de la emergencia de la radícula, el papel de esta enzima durante la germinación de semillas de tomate es aún incierto (Bewley, 1997a; Dahal *et al.*, 1996).

Otras hidrolasas de pared cuya expresión o actividad se ha detectado en semillas de tomate previamente a la emergencia de la radícula, y por lo que podrían estar relacionadas con la germinación, son celulasas, polygalacturonasas, arabinosidasas, xiloglucano endo-transglicosilasas (XETs), quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas (Bradford, 2000). En semillas de tabaco el nivel de mensajero, proteína y actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa presentan un patrón coherente con el posible papel de esta enzima en la degradación y ablandamiento del endosperma micropilar, que permitiría la germinación (Leubner-Metzger *et al.*, 1995). Incluso existe una correlación entre el nivel de dormición de las semillas y el nivel de actividad para esta enzima (Leubner-Metzger y Meins, 2000). Sin embargo, la naturaleza y presencia de los sustratos para estas enzimas en las paredes celulares del endosperma y la relación de las mismas con la germinación aún debe ser demostrada.

### *Expansinas*

Si bien existen hidrolasas de pared (XETs) (Bradford, 2000) muy posiblemente relacionadas con la expansión y ablandamiento de tejidos, estas enzimas por si mismas no son capaces de aumentar la extensibilidad de las paredes celulares en ensayos *in vitro*. Las únicas proteínas hasta ahora conocidas capaces de producir un aumento en la extensibilidad de las paredes son las **expansinas** (McQueenmason *et al.*, 1992). Estas proteínas extracelulares posiblemente actúan desestabilizando uniones no covalentes entre los componentes de la pared celular (McQueenmason, 1995). Las expansinas se encuentran altamente conservadas entre gimnospermas, monocotiledóneas y dicotiledóneas. En las especies estudiadas (tomate, *Arabidopsis*, pepino y arroz, entre otras) se encuentran codificadas por familias multigénicas (Cosgrove, 2000b). La gran cantidad de genes que

codifican para las distintas expansinas (en *Arabidopsis* son al menos 22 y en tomate ya han sido identificados 11 ) sugiere la existencia de múltiples funciones para estas proteínas, dependiendo del tejido y del estado del desarrollo. Se ha propuesto su intervención en diversos procesos en relación con la formación, modificación y desmantelamiento de paredes celulares (Cosgrove, 2000a).

En la germinación las expansinas podrían encontrarse mediando tanto el proceso de ablandamiento del endosperma como el crecimiento del eje embrionario. En este sentido, en un trabajo realizado en semillas de tomate, se observó la acumulación de mensajeros para una determinada expansina, *LeEXP4*, únicamente en el endosperma micropilar, siguiendo el patrón de ablandamiento de ese tejido al modificar el potencial agua del medio (Chen y Bradford, 2000). Respecto del crecimiento del embrión, muy recientemente se ha publicado un trabajo donde se observa la acumulación de transcritos para dos expansinas, *LeEXP8* y *LeEXP10*, en embriones de semillas de tomate en forma coherente con la germinación (Chen *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta la fecha no existe información sobre la regulación de estos genes por la luz en semillas.

## **OBJETIVOS DE ESTA TESIS**

El objetivo general de este proyecto fue mejorar el conocimiento existente sobre las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares del control de la germinación por el sistema de los fitocromos en semillas que presentan dormición impuesta por las cubiertas.

En particular, utilizando como sistema experimental semillas de *D. ferox* se estudiaron:

**(a) las características fotobiológicas y los efectos a nivel fisiológico-bioquímico de la inhibición por irradiaciones prolongadas de RL de la germinación inducida por una LFR o una VLFR**

Primeramente se analizó si la inhibición de la germinación de semillas de *D. ferox*, observada bajo irradiaciones prolongadas de RL, cumplía con los requerimientos fotobiológicos de una HIR. Posteriormente, se estudió el efecto de la HIR sobre el potencial

de crecimiento del embrión y el ablandamiento del endosperma, así como sobre la actividad de enzimas hidrolíticas relacionadas con el proceso de ablandamiento, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa. Estos procesos fueron estudiados tanto para la inhibición por RL continuo de la germinación inducida por una LFR, como por una VLFR.

**(b) la relación entre la inducción de la germinación por una LFR, o una VLFR, y el nivel de acumulación de transcritos de genes presuntamente relacionados con la germinación.**

Se estudiaron los efectos de la LFR y la VLFR sobre la acumulación de mensajeros para enzimas clave de la ruta de biosíntesis de GAs, GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, debido a que estas hormonas estimulan tanto el ablandamiento del endosperma como el potencial de crecimiento del embrión. Se determinaron los cambios que se producen en la sensibilidad de las semillas como consecuencia de la LFR, a las GAs aplicadas exógenamente. Como posibles blancos de la acción de la LFR, la VLFR y las GAs se analizaron: en el endosperma micropilar el nivel de acumulación de mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, en relación con el ablandamiento de este tejido, y en embriones el nivel de transcritos para expansinas, posiblemente asociadas con el potencial de crecimiento de los mismos.

**(c) los efectos del antagonismo LFR-HIR y VLFR-HIR sobre el nivel de acumulación de transcritos de genes presuntamente relacionados con la germinación.**

En los experimentos realizados durante esta etapa se utilizaron como punto de referencia los resultados de los ensayos descritos en las etapas anteriores. Se analizó el nivel de mensajeros para las mismas enzimas y proteínas anteriormente mencionadas con el fin de dilucidar parte del mecanismo involucrado a nivel molecular en la inhibición por una HIR de la germinación inducida por una LFR o una VLFR .

En el esquema de la figura I. 7 se representan (con fechas de líneas llenas) las relaciones conocidas entre los procesos que determinan la germinación de semillas de *D. ferox* mediada por una LFR. Las fechas de líneas punteadas ejemplifican, para la LFR, las relaciones que se estudiaron en este trabajo de tesis.



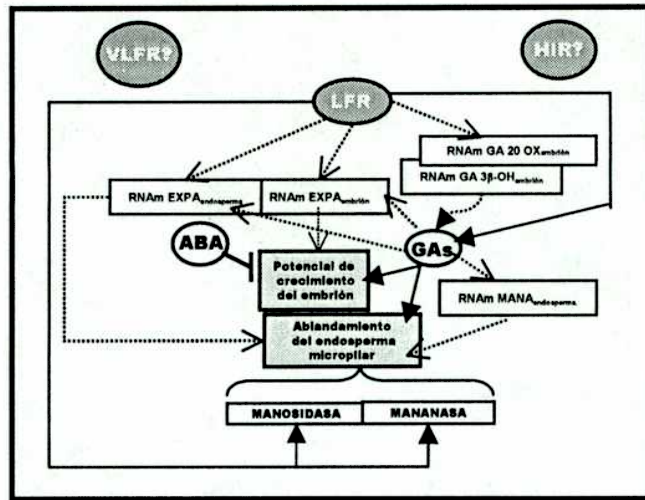


Figura I. 7. Esquema de los efectos del del Pfr, GAs y ABA en la germinación de semillas de *D. ferox*. El esquema de la figura resume las acciones conocidas del Pfr, GAs y ABA, en las flechas de líneas llenas, mientras que las flechas de líneas punteadas ejemplifican para la LFR el tipo de relaciones que se estudiarán en esta tesis.

## Capítulo II

***Estudio a nivel fisiológico de la acción antagónica de los modos de acción LFR y HIR en el control de la germinación de semillas de Datura ferox***

## INTRODUCCIÓN

La luz tiene influencia sobre la germinación de semillas de un gran número de especies (Bewley y Black, 1982; Taylorson y Hendricks, 1977). Este efecto puede ser promotor o inhibidor dependiendo de la composición espectral, la irradiancia, el momento de la irradiación, la disponibilidad de agua, así como del estado fisiológico de las semillas (Frankland y Taylorson, 1983). La promoción de la germinación muchas veces presenta una relación bifásica con el flujo de luz R (Blaauw-Jansen y Blaauw, 1975; Cone *et al.*, 1985). La primera fase se conoce como respuesta a muy bajos flujos, **VLFR**, ya que se satura a muy bajos flujos de luz R, o bien por un único pulso de RL. La segunda fase se observa a mayores flujos de R y se denomina respuesta a bajos flujos, **LFR**. Un pulso de RL dado inmediatamente después del pulso de R, en el rango de la LFR, es capaz de revertir el efecto promotor del R hasta el nivel inducido por el RL. Si se demora la aplicación del pulso de RL, se observa entonces una disminución gradual del efecto inhibitorio del mismo sobre la respuesta inducida por el pulso de R (Casal y Sánchez, 1998; Mancinelli, 1994). En *Arabidopsis* la VLFR se encuentra mediada por el PHYA, y la LFR por el PHYB y PHYE (Botto *et al.*, 1995; Casal *et al.*, 1998; Henning *et al.*, 2002; Poppe y Schafer, 1997; Shinomura *et al.*, 1996).

Entre aquellas semillas que responden a la luz muchas especies presentan dormición impuesta por los tejidos que rodean al embrión (Bewley y Black, 1982). El control de la germinación en estas semillas se encuentra en el balance entre la fuerza expansiva del embrión y la resistencia que oponen, a esta expansión, los tejidos circundantes (Bewley, 1997). En la LFR, ambos procesos están bajo regulación del Pfr. En semillas de **lechuga**, el Pfr produce aumento del potencial de crecimiento del embrión (Carpita *et al.*, 1979a) y modificaciones en la estructura interna de las células del endosperma micropilar (Psaras *et al.*, 1981). Sin embargo, aún no queda claro si la germinación de lechuga involucra, o no, cambios en las paredes de estas células (Dutta *et al.*, 1994; Halmer y Bewley, 1979; Nonogaki, 1999). En semillas de **tomate** el Pfr promueve el ablandamiento del endosperma, la actividad de enzimas hidrolíticas y la germinación (Nomaguchi *et al.*, 1995). Durante la germinación de semillas de *D. ferox* el Pfr promueve tanto un aumento en la fuerza expansiva del embrión como una disminución en la resistencia mecánica del endosperma micropilar (De Miguel y Sánchez, 1992; Sánchez *et al.*, 1986). En esta especie

el ablandamiento del endosperma involucra el aumento de las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (De Miguel y Sánchez, 1992; Sánchez *et al.*, 1990), relacionadas con la degradación del principal componente de las paredes celulares: un manano  $\beta$ , 1-4 (Sánchez *et al.*, 1990). Los cambios observados en las paredes van acompañados de la movilización de las reservas proteicas e importantes modificaciones de la ultra-estructura celular. El conjunto de estos procesos se conoce como síndrome de pre-extrusión radicular, el cual se encuentra confinado casi completamente a la región del endosperma micropilar (Mella *et al.*, 1995; Sánchez y de Miguel, 1997; Sánchez *et al.*, 1990).

Por otro lado, la promoción de la germinación de semillas en muchas especies a través de una LFR puede ser inhibida por una irradiación prolongada con RL, incluso cuando un pulso de RL ya no es capaz de revertir el efecto promotor del R (Bewley y Black, 1982; Hartmann, 1966; Negbi y Koller, 1964). Este efecto de la luz RL continua (RLc) se conoce como respuesta a altas irradiancias, HIR. Las longitudes de onda más eficientes en producir la inhibición de la germinación se encuentran entre los 710-720 nm (Frankland y Taylorson, 1983). Muy recientemente se ha identificado al PHYA como el fotorreceptor responsable de la inhibición de la germinación de semillas por la HIR, utilizando mutantes de tomate (Shichijo *et al.*, 2001).

Cabe notar que durante el proceso de de-etiolación la VLFR, la LFR y la HIR tienen efectos en la misma dirección. Es decir, que los tres modos de acción inhiben el alargamiento del hipocotilo y promueven la apertura de los cotiledones, entre otras respuestas. En cambio, la germinación de semillas es promovida por la VLFR y la LFR (con unas poquísimas excepciones), mientras que la HIR la inhibe (Casal y Sánchez, 1998). Una de las características más sobresalientes de la HIR es la falta de reciprocidad entre una irradiación con RLc y pulsos horarios de RL de igual flujo total (Casal *et al.*, 1998). Esta característica no ha sido testeada en ninguna de las especies donde el RLc inhibe la germinación (Casal y Sánchez, 1998).

Los experimentos descritos en este capítulo están dirigidos a estudiar la inhibición de la germinación de semillas de *D. ferox* por RLc. Primeramente, se estudian las características fotobiológicas de la inhibición por RLc de la germinación de *D. ferox*, y seguidamente sus efectos sobre los mecanismos fisiológicos-bioquímicos involucrados en la germinación: el potencial de crecimiento del embrión, el ablandamiento del endosperma

y la actividad de enzimas hidrolíticas, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Semillas*

Las semillas de *D. ferox* fueron colectadas de plantas que invadían cultivos de soja en Junín, provincia de Buenos Aires. Las semillas fueron almacenadas en frascos oscuros de vidrio a temperatura ambiente.

### *Fuentes de luz*

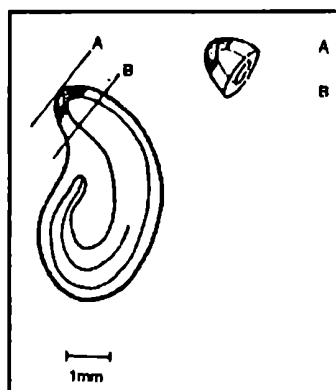
La fuente de luz roja (R) estaba compuesta de tubos fluorescentes Philips 40715 de 40 W (Philips, Eindhoven, Holanda). La fuente de luz rojo lejano (RL) constaba de un conjunto de lámparas reflectoras incandescentes de 150 W en combinación con dos filtros de acetato rojo, seis filtros acrílicos azules de 2 mm de espesor (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires) y un filtro de agua de 10 cm. La proporción calculada de Pfr/P fue de 0.87 y 0.1 para las fuentes de R y RL, respectivamente.

### *Condiciones de incubación*

Las semillas fueron embebidas sobre un algodón saturado con agua destilada en cajas de plástico transparente, envueltas en hojas de plástico negro, e incubadas en oscuridad durante 24-48 hs en ciclos de temperaturas alternadas (9 hs 30 °C y 15 hs 20 °C). Las cubiertas de las semillas fueron removidas bajo luz blanca, e inmediatamente irradiadas con un pulso saturante de R, o R seguido de RL. Luego fueron incubadas en oscuridad a 20-30 °C por aproximadamente 45 hs antes de ser expuestas a los tratamientos de luz específicos de la HIR. La imbibición de las semillas previa a la remoción de las cubiertas, es un paso necesario debido a la dureza de las mismas, de esta forma es posible removerlas sin causar daño a las semillas. Por otra parte, las semillas peladas presentan una germinación más uniforme, lo que permite obtener una definición temporal mayor del momento de la emergencia de la radícula a través del endosperma.

### *Diseción de las semillas*

La región del endosperma micropilar la definimos como la porción de 0.5 mm de longitud, de forma cónica que incluye el extremo de la radícula (Fig. II. 1). El extremo de la radícula dentro de esta pequeña porción del endosperma puede ser removido de ser necesario. Las células de esta porción del endosperma son más pequeñas, presentan paredes celulares más delgadas y contienen menos cuerpos de reserva que las del resto del endosperma, el cual se denomina endosperma lateral. La disección de las distintas partes fue realizada bajo lupa binocular.



**Figura II. 1.** Esquema de la disección de las diferentes partes de la semilla de *D ferox*. La porción micropilar del endosperma usada para las preparaciones enzimáticas se muestra como una zona cónica sombreada.

### *Medida del potencial de crecimiento del embrión*

Para ensayar el potencial de crecimiento del embrión, fue disectada la porción del endosperma micropilar bajo luz verde, de forma tal de remover el obstáculo a la expansión del eje embrionario. La capacidad de crecimiento de los embriones fue testada en condiciones de limitada disponibilidad de agua (Carpita *et al.*, 1979a; De Miguel y Sánchez, 1992), incubando las semillas a 25 °C en soluciones acuosas de polietilenglicol 6000 (PEG) (Sigma, St. Louis, USA) de forma tal de obtener un rango amplio de potenciales agua. La longitud del eje embrionario que sobresalía del endosperma fue medida 24 hs más tarde del inicio de la incubación en las distintas soluciones de PEG.

### *Extracción y medición de las actividades enzimáticas*

Las extracciones fueron realizadas a 4 °C. Cada muestra se encontraba compuesta por 20 porciones de endosperma micropilar (conos). Las muestras fueron homogeneizadas en morteros pre-enfriados con 300 µl de buffer citrato 0.1 M pH 5,4. El extracto fue centrifugado 20 min a 27.000 g. A partir del sobrenadante así obtenido fue ensayada la actividad endo-β-mananasa. El precipitado fue resuspendido en 1 ml de buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 6, 1 M NaCl, e incubado en un baño de hielo durante 30 min. Luego de una centrifugación de 20 min a 27.000 g, el sobrenadante obtenido fue utilizado para ensayar la actividad β-manosidasa.

La actividad de endo-β-mananasa fue determinada por cambios en la viscosidad de soluciones de galactomanano purificado a partir de *Ceratonia stigua*. La actividad de la β-manosidasa fue ensayada usando *p*-nitrofenil-β-D-manopiranosido, como se describe en Sánchez y de Miguel, 1997.

## **RESULTADOS**

### *Promoción de la germinación por una LFR*

La población de semillas de *D. ferox* utilizada en estos experimentos mostró una respuesta germinativa de tipo LFR y no de tipo VLFR, en las condiciones en las que fueron realizados los ensayos. Las semillas germinaron un 90-100 % cuando fueron estimuladas por un pulso de R, pero un pulso de RL no estimuló la germinación más allá de un 5 %. Los porcentajes de germinación 72 hs después del R fueron aproximadamente del 80 % (Fig. II. 2 A). Un pulso de RL dado inmediatamente después del R, canceló completamente el efecto promotor del R (Fig. II. 2 B). Sin embargo, si un período de incubación en oscuridad se intercala entre los pulsos de R y RL, los porcentajes de germinación final se incrementan a medida que se prolonga el tiempo de incubación en oscuridad. En este caso se comenzaron a observar los efectos a partir de las 24 hs de incubación en oscuridad después del pulso de R. Para las 45 hs la mayoría de las semillas había escapado al control por el fitocromo (Fig. II. 2 B).

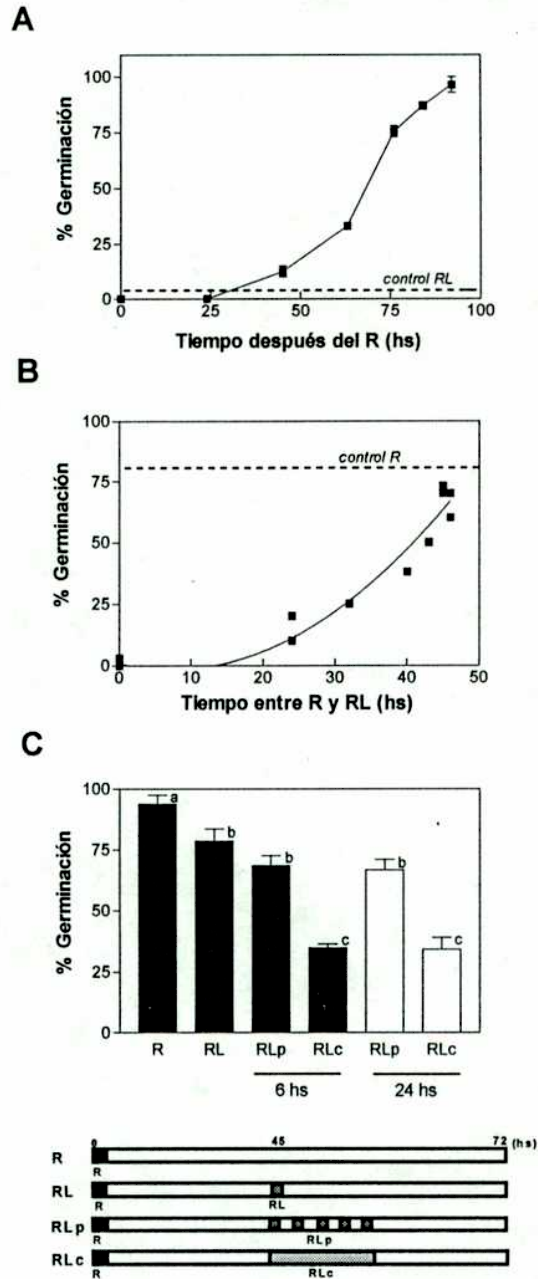
### ***Inhibición de la germinación por una HIR***

A pesar de que un pulso de RL, dado 45 hs después del R, no canceló el efecto promotor sobre la germinación producido por el R en un porcentaje elevado de las semillas (Fig. II. 2 B y C), una exposición prolongada a RL (6 hs) (RLc) inhibió rotundamente la germinación. No se observó un efecto inhibitorio mayor al aumentar a 24 hs el tiempo de exposición al RLc (Fig. II. 2 C). Pulsos horarios de RL de igual flujo total que la irradiación con RLc, no produjeron mayor inhibición que un único pulso de RL (Fig. II. 2 C). Así, aún después de que la germinación de las semillas se ha independizado del control por el Pfr, superando el tiempo de escape, esta puede ser bloqueada por una exposición prolongada a RLc. Esta inhibición de la germinación de semillas de *D. ferox* presenta las características fotobiológicas de una respuesta de tipo HIR (Casal y Sánchez, 1998).

### ***Una nueva LFR puede abolir el efecto inhibitorio de la HIR***

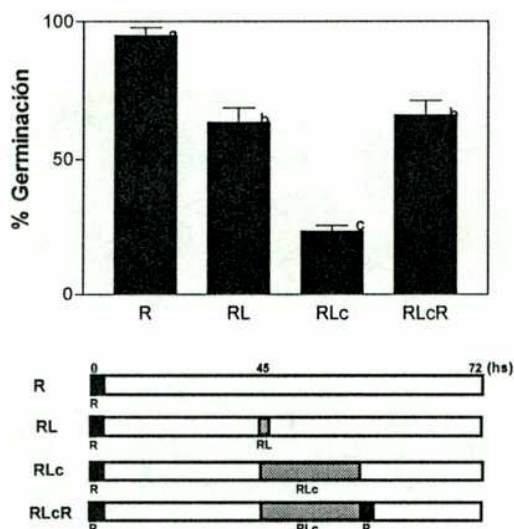
En semillas expuestas a un primer pulso de R, incubadas en oscuridad durante 45 hs y luego irradiadas durante 6 hs con RLc, un segundo pulso de R (al finalizar estos tratamientos) fue capaz de producir un aumento en el porcentaje de germinación en comparación con aquellas semillas que no recibieron este segundo pulso de R (Fig. II. 3). Los resultados obtenidos indican que mientras una HIR puede bloquear la promoción de la germinación inducida por un pulso de R, un nuevo LFR puede restaurar la respuesta germinativa.





**Figura II. 2. Inhibición de la germinación semillas de *D. ferox* por una HIR.** Germinación de semillas peladas en función del tiempo que fueron estimuladas por un pulso de R e incubadas a 20-30 °C (A). Un pulso de RL canceló el efecto del R, dado inmediatamente después de este. Al intercalar un período de incubación en oscuridad entre ambos pulsos de luz, gradualmente la inhibición causada por el pulso de RL fue perdiendo efectividad (B). La germinación de semillas de *D. ferox* peladas e inducidas por un pulso de R, incubadas 45 hs en oscuridad (20-30 °C) fue inhibida por una exposición de 6 o 24 hs a RLc (RLc) (15  $\mu$ mol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mientras que un único pulso de RL (RL) (30 min,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) o pulsos horarios de RL (RLp) ( $3 \text{ min h}^{-1}$ ,  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) no produjeron esta inhibición. Las semillas control no fueron expuestas a ningún tratamiento de RL (R). Al término de los tratamientos de luz, todas las semillas fueron incubadas en completa oscuridad hasta completar 72 hs a partir del pulso inicial de R ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Los datos en la figura son las medias y el error estándar de 4-5 experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ .



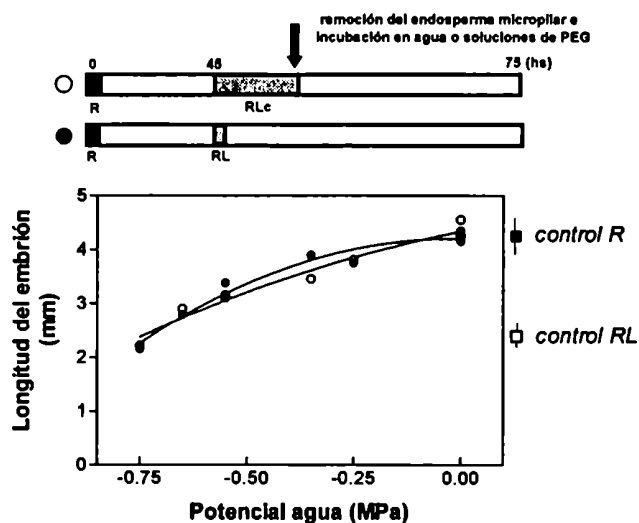
**Figura II. 3. La inhibición de la germinación impuesta por RLc es superada por un nuevo pulso de R.** Una vez peladas, las semillas fueron expuestas a un pulso de R, incubadas en oscuridad durante 45 hs ( $20\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y posteriormente recibieron un único pulso de RL (RL), 6 hs de RLc (RLc), 6 hs de RLc seguidas de un pulso de R (RLcR), o ningún tratamiento con RL (R). Luego, todas las semillas fueron incubadas en completa oscuridad hasta completar 72 hs a partir del pulso inicial de R ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ .

***El potencial de crecimiento del embrión no está involucrado en la inhibición de la germinación por una HIR.***

En semillas de *D. ferox* la germinación depende del balance entre la fuerza expansiva del embrión y la resistencia mecánica que opone el endosperma. Para determinar

si la HIR involucraba, o no, cambios en el potencial de crecimiento del embrión se utilizaron semillas inducidas por un pulso de R y posteriormente expuestas a 6 hs de RLc o a un único pulso de RL, sobre las cuales se ensayó el potencial de crecimiento del embrión (Fig. II. 4). Una vez disectada la porción micropilar del endosperma las semillas fueron transferidas a soluciones con limitada disponibilidad de agua, de forma tal de poner en evidencia las posibles diferencias en el potencial de crecimiento de los embriones. La longitud de los embriones fue medida luego de 24 hs de incubación en oscuridad en estas soluciones. Las semillas utilizadas como controles fueron expuestas a un pulso de R o de RL, incubadas 51 hs en oscuridad antes de disectar la porción micropilar del endosperma y continuar la incubación en agua por 24 hs más.

No se encontraron diferencias significativas en el potencial de crecimiento de embriones de semillas tratadas con RLc o un pulso de RL dado a las 45 hs, y aquellas semillas control expuestas solamente al pulso inductor de R (Fig. II. 4). Entonces, mientras que la LFR promueve la germinación y el potencial de crecimiento del embrión, la HIR inhibe la germinación pero sin afectar el potencial de crecimiento de los embriones de *D. ferox*.



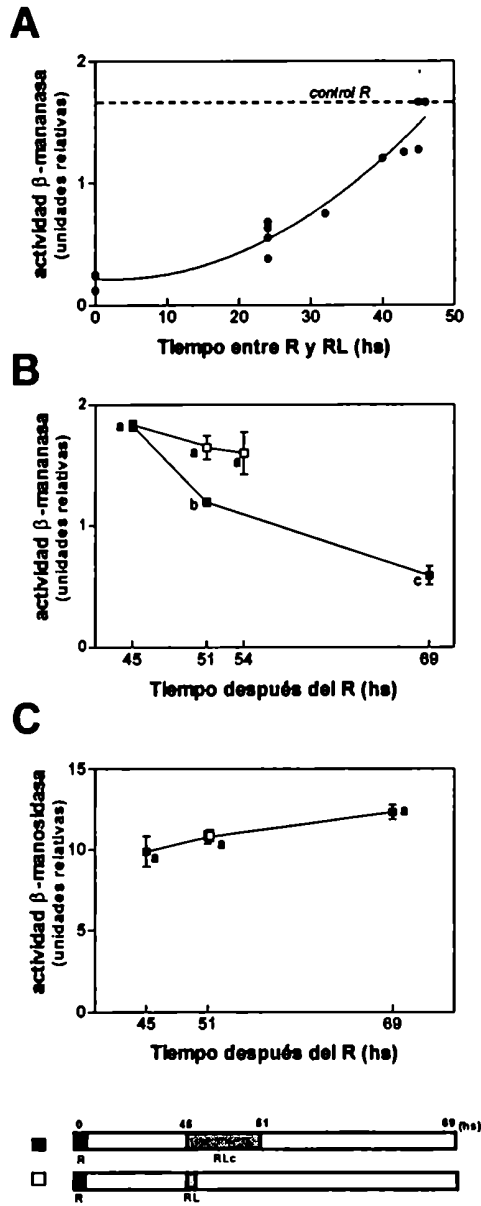
**Figura II. 4.** La irradiación con RLc no reduce el potencial de crecimiento del embrión. Las semillas peladas, tratadas con un pulso de R e incubadas durante 45 hs (20-30 °C) fueron expuestas a un pulso de 30 min de RL seguido de una incubación de 5,5 hs en oscuridad (●) o a 6 hs de RLc (○). En este punto, bajo luz

verde fue disectada la porción del endosperma micropilar. Las semillas fueron transferidas a soluciones de polietilenglicol (PEG) con distintos valores de potencial agua, e incubadas en oscuridad (25 °C). La longitud de los embriones fue medida 24 hs más tarde. Cada dato puntual corresponde al promedio de 10 embriones. La longitud de los embriones control que recibieron solamente un pulso de R (■) o de RL (□) seguido de 51 hs de incubación en oscuridad se indica en la figura.

### ***La HIR inhibe la actividad de endo-β-mananasa***

En la LFR en *D. ferox*, el ablandamiento del endosperma se encuentra relacionado con la hidrólisis de los mananos β, 1-4 de las paredes celulares, y un incremento en las actividades de endo-β-mananasa y β-manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997; Sánchez *et al.*, 1990). El tiempo necesario para que la promoción por el R de la actividad endo-β-mananasa “escape” a la reversión por RL es de aproximadamente 45 hs (Fig. II. 5 A). Para testear los efectos del RLc sobre la actividad endo-β-mananasa, las semillas fueron expuestas a un pulso de R seguido de una incubación en oscuridad de 45 hs, luego expuestas a RLc o a un único pulso de RL, y nuevamente incubadas en oscuridad. Las mediciones de la actividad de endo-β-mananasa mostraron una reducción significativa luego de 6 hs de RLc. Esta disminución continuó profundizándose aún después de que las semillas fueron transferidas a oscuridad al finalizar las 6 hs de RLc (Fig. II. 5 B). Semillas que habían recibido un único pulso de RL no presentaron diferencias significativas en la actividad de endo-β-mananasa (medida hasta 9 hs después del pulso de RL) en comparación a los valores obtenidos para las mismas antes de haber recibido el pulso de RL (Fig. II. 5 B; ver 45 y 54 hs). Debido a que las semillas inducidas por R que recibieron solo un pulso de RL a las 45 hs, comienzan a germinar a partir de las 48 hs no fue posible realizar mediciones de las actividades enzimáticas mucho más allá de este tiempo (Fig. II. 2 A).

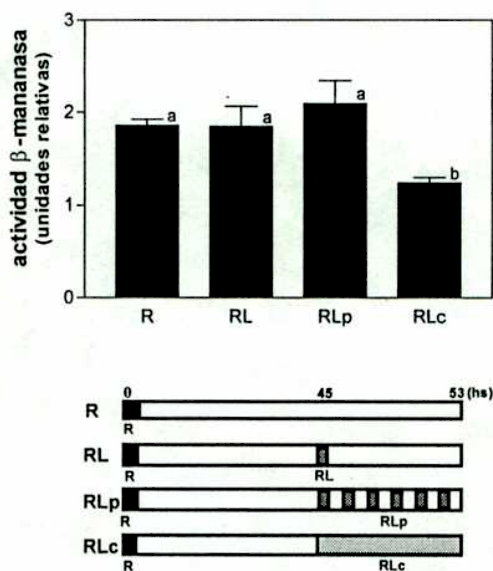
Las mediciones sobre la actividad de β-manosidasa mostraron que los niveles de la actividad de esta enzima no se modifican por ninguno de los tratamientos realizados (Fig. II. 5 C).



**Figura II. 5.** Tiempo de escape de la actividad de endo-β-mananasa a la reversión por RL (A) y efecto del RLc sobre la actividad de endo-β-mananasa (B) y β-manosidasa (C). En (A) las semillas peladas fueron expuestas un pulso de R y luego otro de RL, intercalándose un período de incubación en oscuridad de duración cada vez mayor entre ambos tratamientos. La actividad de endo-β-mananasa fue medida 45 hs después del pulso inicial de R. La línea punteada horizontal indica el nivel de actividad enzimática en semillas control que solo recibieron el pulso de R. En (B) y (C) las semillas peladas que habían recibido un pulso de R, fueron incubadas 45 hs en oscuridad (20-30 °C), expuestas a 30 min a RL (□) o a 6 hs de RLc

(■), e incubadas nuevamente en oscuridad (25 °C). A los distintos tiempos indicados en la figura fueron realizadas las mediciones de actividad enzimática para endo- $\beta$ -mananasa (B) y  $\beta$ -manosidasa (C). Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ .

Finalmente se estudió si la disminución observada en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa en respuesta al RLc correspondía, o no, a una respuesta de tipo HIR. Para lo cual fueron utilizadas semillas tratadas RLc o con pulsos horarios de RL (de igual flujo total que el tratamiento con RLc). La actividad de endo- $\beta$ -mananasa en semillas que habían recibido pulsos horarios de RL, no presentó diferencias significativas con la observada en semillas tratadas con un único pulso de RL o aquellas que solo habían sido expuestas al pulso inductor de R. Indicando así que la reducción en la actividad de esta enzima se debe efectivamente a una HIR (Fig. II. 6).



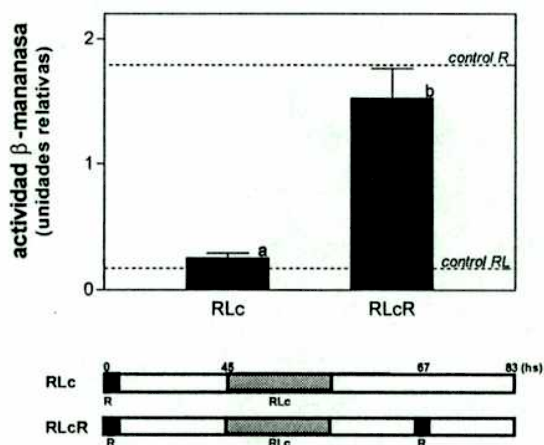
**Figura II. 6. La actividad de endo- $\beta$ -mananasa disminuye por RLc pero no por pulsos horarios de RL.** Las semillas tratadas con un pulso de R e incubadas en oscuridad 45 hs (20-30 °C), fueron expuestas a un único pulso de RL ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) seguido de 7,5 hs de incubación en oscuridad (RL), a 8 hs de pulsos horarios de RL ( $3 \text{ min h}^{-1}$ ,  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (RLp), a 8 hs de RLc (RLc) ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o a ningún tratamiento de RL (R). En este punto fue disectada la porción del endosperma micropilar, y realizada la



determinación de actividad de endo- $\beta$ -mananasa. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ . Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos independientes.

***Un pulso de R restaura la actividad de endo- $\beta$ -mananasa reducida por el tratamiento con RLc***

La germinación de semillas de *D. ferox* inducida por una LFR puede ser inhibida por una HIR y restaurada por una segunda LFR. La actividad de endo- $\beta$ -mananasa también es inducida por una LFR e inhibida por una HIR. Para investigar si una segunda LFR podía restaurar los niveles de actividad de esta enzima reducidos por una HIR, las semillas inducidas por R fueron incubadas en oscuridad, irradiadas durante 8 hs con RLc y luego incubadas nuevamente en oscuridad durante 14 hs (para permitir una disminución profunda en la actividad de esta enzima). Al finalizar estos tratamientos las semillas recibieron un segundo pulso de R y fueron incubadas 16 hs más en oscuridad, antes de realizar las mediciones de actividad. Este último pulso de R restauró la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, llevándola a niveles comparables con aquellos observados en semillas control que no recibieron ningún tratamiento de RL (Fig. II. 7).



**Figura II. 7. La inhibición de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa causada por RLc puede ser revertida por un pulso de R.** Las semillas peladas fueron expuestas a un pulso de R, incubadas en oscuridad 45 hs (20-30 °C) y expuestas durante 8 hs a RLc. Al término de estos tratamientos, las semillas fueron nuevamente incubadas en oscuridad (25°C) durante 30 hs (RLc), o bien esta incubación fue interrumpida por un pulso de

R, dado a las 14 hs (RLcR). Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ . Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 3-4 experimentos independientes. Las líneas punteadas muestran los niveles de actividad enzimática en semillas control que fueron expuestas a un único pulso de R o RL, e incubadas en oscuridad durante 45 hs (20-30 °C).

## DISCUSIÓN

La transformación del Pr en Pfr pone en marcha una serie de procesos que culminan en la germinación. En semillas que presentan dormición impuesta por las cubiertas, algunos de estos procesos tienen lugar en el embrión, mientras que otros se localizan en el endosperma micropilar. El tiempo requerido para que el Pfr complete su acción es diferente para cada uno de estos procesos. En semillas de *D. ferox* el tiempo de escape del potencial de crecimiento del embrión es de aproximadamente 24 hs (De Miguel y Sánchez, 1992), mientras que para el ablandamiento del endosperma y la germinación, este se encuentra alrededor de las 45 hs (De Miguel y Sánchez, 1992), Fig. II. I B). Aún cuando aparentemente el Pfr ya ha completado su acción, una irradiación prolongada (6 hs) con RLc puede inhibir la germinación (Fig. II. 2 C). Este efecto de RLc, el cual va más allá de convertir el Pfr presente en Pr, se conoce como una HIR: respuesta a altas irradiancias. En las HIR, pulsos horarios de RL no reproducen los efectos del RLc. La inhibición de la germinación por RLc ha sido observada en varias especies (Casal y Sánchez, 1998), entre las cuales hay semillas que presentan dormición impuesta por las cubiertas (ej.: lechuga) donde la luz RLc actúa tardíamente bloqueando el proceso germinativo (Frankland y Taylorson, 1983). En ningún caso se ha demostrado utilizando el método de comparar el efecto de irradiaciones continuas de RL con pulsos horarios de la misma longitud de onda a igual flujo total, que la inhibición de la germinación observada en respuesta al RLc sea consecuencia de una HIR. En este trabajo se muestra que en semillas de *D. ferox* la irradiación con RLc bloquea la germinación aún 45 hs después del pulso inductivo de R (Fig. II. 2). En ese momento ya han ocurrido profundos cambios en las semillas tanto a nivel fisiológico como a nivel estructural y bioquímico. La actividad de las hidrolasas de mananos han estado altas al menos durante 15 hs, la movilización de los cuerpos proteicos y la formación de vacuolas en el endosperma micropilar es profusa, así como el



ablandamiento de este tejido es claramente perceptible (Mella *et al.*, 1995; Sánchez y de Miguel, 1997). En este punto, las semillas están muy cerca de completar la germinación, sin embargo, 6 hs de exposición al RLc inhibe la germinación y reimpone la necesidad de altos niveles de Pfr para reiniciar los procesos que culminarán en la misma (Fig. II. 3), a pesar de todos los cambios ocurridos.

Uno de los posibles blancos para esta acción de último momento de la HIR podría ser el potencial de crecimiento del embrión, sin embargo la irradiación con RLc no tuvo efecto sobre este proceso en *D. ferox* (Fig. II. 4). Este resultado no coincide con lo observado en semillas *Raphanus sativus* donde existe una reducción significativa en el potencial de crecimiento del embrión asociada al tratamiento con RLc (Schopfer y Plachy, 1993). Cabe remarcar que en *R. sativus* el efecto de la exposición al RLc no fue comparado con tratamientos control, como un único pulso de luz RL o mejor aún pulsos horarios de luz RL de igual flujo total. En ese caso, no se puede determinar si la inhibición de germinación por RLc se debe a una HIR o a la reversión de una LFR.

La irradiación con RLc produce una disminución significativa en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, lo cual sugiere que la HIR podría estar interfiriendo con la movilización de los mananos y el ablandamiento del endosperma. El hecho de que la inhibición de la germinación y la disminución de la actividad de la endo- $\beta$ -mananasa, como resultado de la irradiación con RLc, puedan ser restauradas por un nueva LFR apoyan esta idea (Fig. II 3 y 7). La irradiación con RLc es efectiva aún cuando el proceso de ablandamiento del endosperma micropilar se encuentra considerablemente avanzado (De Miguel y Sánchez, 1992; Sánchez y de Miguel, 1997), pero todavía no ha alcanzado su máximo (ej.: cuando el contenido de mananos es del 30-40 % de su valor original) (de Miguel, 1999). Para que se produzca la extrusión de la radícula se requiere una degradación extensiva de los mananos de las paredes celulares del endosperma micropilar, de forma tal de reducir suficientemente la resistencia mecánica que opone este tejido. Dentro de este esquema una interrupción en el proceso de ablandamiento, aún en un estado avanzado del mismo, podría bloquear la germinación.

Por otro lado, no se encontró una respuesta de tipo HIR para la actividad de la  $\beta$ -manosidasa (Fig. II. 5 B). Considerando que la acción de la endo- $\beta$ -mananasa precede la de  $\beta$ -manosidasa, la falta de HIR en esta última, no impediría la inhibición de la movilización

de los mananos producida por el RLc. Estos resultados indican claramente la existencia de controles independientes para la actividad de cada enzima, donde la regulación ejercida por el sistema de los fitocromos no operaría a través de una única reacción de orden superior. De hecho, en *D. ferox* el ABA bloquea la promoción de la germinación por el Pfr, inhibiendo el aumento del potencial de crecimiento del embrión, sin interferir con el ablandamiento del endosperma (de Miguel, 1999; Sánchez y de Miguel, 1985). También se ha observado que el ablandamiento del endosperma se inhibe a determinados valores de potencial agua que no disminuyen, o incluso promueven, el potencial de crecimiento del embrión (De Miguel y Sánchez, 1992). Por otro lado, bajos potenciales agua inhiben el ablandamiento del endosperma y disminuyen la actividad de  $\beta$ -manosidasa sin afectar la de endo- $\beta$ -mananasa (de Miguel *et al.*, 1999). Se puede pensar entonces, que más allá de la serie de procesos necesarios para la germinación que desencadena el Pfr, el resultado final (germinación o inhibición de la misma, en este caso) depende de la interacción con otras señales tanto internas como ambientales, que se resuelven en distintos puntos de esta compleja red de reacciones.

En el presente capítulo se ha descrito una HIR que antagoniza la acción promotora de la germinación de la LFR. La actividad de endo- $\beta$ -mananasa es uno de los procesos blanco donde este antagonismo se evidencia. Es interesante destacar que las semillas permanecen sensibles a ambas acciones de los fitocromos hasta un punto muy cercano a la culminación de la germinación. El sentido opuesto (promotor o inhibidor) de los modos de acción LFR y HIR sobre las distintas respuestas estudiadas parece ser específico de la germinación. Mientras que durante la de-etiolación de plántulas los procesos como el alargamiento del hipocotilo, la apertura de los cotiledones y la expresión de algunos genes fotosintéticos, son regulados por la LFR y la HIR no solo en el mismo sentido sino incluso de forma sinérgica (Casal y Sánchez, 1998; Casal, 1995; Cerdán *et al.*, 1999; Henning *et al.*, 1999).

### Capítulo III

***Estudio de la acción antagónica de los modos de acción LFR y HIR, en semillas de *Datura ferox*, sobre el nivel de transcriptos de algunos genes relacionados con la germinación***

## INTRODUCCIÓN

Una vez maduras, las semillas de *D. ferox* se encuentran en un estado de profunda dormición, impuesto por los tejidos que rodean al embrión, en particular el endosperma (Bewley y Black, 1982). En *D. ferox*, como en otras especies que presentan este tipo de dormición, la germinación puede ser estimulada (Soriano *et al.*, 1964) o inhibida por la luz, mediante el sistema de los fitocromos (Casal y Sánchez, 1998, Capítulo II). Como se mencionó anteriormente, los fitocromos promueven la germinación a través de dos de sus tres modos de acción: LFR y VLFR, mientras que la HIR la inhibe (Casal y Sánchez, 1998). La VLFR requiere para su inducción niveles extremadamente bajos de Pfr, mientras que la LFR actúa en un rango de Pfr/P que va desde los niveles de Pfr producidos por un pulso de RL hasta aquellos alcanzados por pulso saturante de R, en consecuencia muestra reversibilidad R-RL (Casal *et al.*, 1998). La HIR en cambio, requiere de exposiciones prolongadas a RL, encontrándose las longitudes de onda más eficientes para su inducción entre los 710-720 nm (Frankland y Taylorson, 1983; Casal *et al.*, 1998). La VLFR se encuentra mediada por el PHYA y la LFR por el PHYB/E (Hennig *et al.*, 2002). Muy recientemente, se ha determinado que es el PHYA, el fitocromo involucrado en la inhibición de la germinación por una HIR (Casal *et al.*, 1998).

Todo lo que se conoce en la actualidad sobre los mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados en control de la germinación por la luz, está centrado en la LFR. En semillas que presentan dormición impuesta por las cubiertas, el mecanismo por el cual el Pfr puede terminar la dormición e inducir la germinación, involucra cambios en el balance entre la fuerza expansiva del embrión y la resistencia que oponen los tejidos circundantes (Bewley y Black, 1994). En semillas de lechuga, la inducción de la germinación mediante una LFR produce un marcado aumento del potencial de crecimiento del embrión, debido aparentemente a una acumulación de osmolitos en el mismo (Carpita *et al.*, 1979 a y b). El papel del ablandamiento del endosperma, en la germinación de estas semillas aún no está claro (Bewley, 1997). En el caso de *D. ferox*, el Pfr mediante una LFR, promueve el potencial de crecimiento del embrión (Sánchez y de Miguel, 1985) y el ablandamiento del endosperma micropilar (Sánchez y de Miguel, 1992). La dureza del endosperma en *D. ferox*, está dada por la presencia de un polímero

de manosa, probablemente un manano  $\beta$ , 1-4, principal componente de las estas paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1990). Una vez formado el Pfr, pero mucho antes que se produzca la extrusión de la radícula, se produce una importante reducción en el contenido de mananos en el endosperma micropilar (Sánchez *et al.*, 1990), relacionada con el aumento de la actividad de hidrolasas de pared, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, en ese tejido (Sánchez y de Miguel, 1997).

El ablandamiento del endosperma también se encuentra involucrado en la inducción de la germinación por giberelinas (GAs) (Groot y Karssen, 1987; Watkins y Cantliffe, 1983). En la germinación de semillas tomates wt en oscuridad (Nonogaki *et al.*, 1992; Toorop *et al.*, 1996) o mutantes *gib-1* en respuesta a GAs (Groot y Karssen, 1987), se observa en el endosperma micropilar un marcado aumento de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa. Recientemente, en esta especie se ha clonado un gen que codifica para una endo- $\beta$ -mananasa, *LeMAN2* (Nonogaki *et al.*, 2000), que se expresa en el endosperma micropilar previamente a la extrusión de la radícula, en semillas wt en oscuridad y en mutantes *gib-1* inducidas por GAs. Hasta el momento, no hay información sobre el posible papel de los fitocromos en la regulación de la expresión de este gen. A pesar del aumento en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, en el endosperma micropilar durante la germinación de tomate, no se han detectado cambios en el contenido de mananos de las paredes celulares de tejido (Dahal *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que otras enzimas, o proteínas, estarían involucradas en el proceso de ablandamiento del endosperma (Bewley, 1997). En consecuencia, tanto el papel de la endo- $\beta$ -mananasa, como la participación de otras enzimas, o proteínas, en este proceso deben ser estudiados en mayor profundidad.

En los últimos años se ha descrito una familia de proteínas cuya acción se encuentra asociada a cambios en las propiedades de la paredes celulares: las expansinas . Se ha sugerido que estas proteínas podrían estar involucradas mediando procesos de expansión celular, en tejidos en crecimiento, o de desmantelamiento de paredes celulares, en tejidos que no se encuentran en crecimiento (Cosgrove, 2000b; McQueenmason *et al.*, 1992). La expresión de los distintos genes para expansinas presentan patrones espaciales y temporales específicos para cada tejido, que dejan entrever la diversidad de las posibles funciones de estas proteínas durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cosgrove,

2000a). Durante la germinación de semillas de tomate *gib-1* por GAs, o wt en oscuridad, se ha observado una buena correlación entre el nivel de mensajeros para una determinada expansina, *LeEXP4*, y la disminución de la resistencia mecánica del endosperma micropilar (Chen y Bradford, 2000). Es posible que las expansinas estén también involucradas en el aumento del potencial de crecimiento del embrión. Muy recientemente, se ha observado en embriones de tomate la acumulación de mensajeros para dos tipos de expansinas, *LeEXP8* y *LeEXP10*, durante la germinación (Chen *et al.*, 2001). Sin embargo, hasta el momento no hay información sobre la posible regulación por luz de la expresión de estos genes, y su relación con el potencial de crecimiento del embrión.

Por mucho tiempo se ha sabido que la aplicación exógena de GAs puede reemplazar el requerimiento de luz de muchas semillas para germinar (Bewley y Black, 1994). Los fitocromos podrían estimular la germinación tanto mediante un aumento de la síntesis de GAs, como incrementando la sensibilidad de las semillas a estas hormonas, o bien por una combinación de ambos procesos (Hilhorst y Karssen, 1988; Yang *et al.*, 1995). En los últimos años, varios genes que codifican para enzimas de la vía de síntesis de las GAs han sido clonados y caracterizados (Kamiya y García-Martínez, 1999). Dos enzimas claves de esta ruta de síntesis son: la GA 20 oxidasa y la GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, las cuales catalizan los últimos pasos de la síntesis, convirtiendo precursores inactivos en GAs biológicamente activas (Kamiya y García-Martínez, 1999). En semillas de lechuga, se ha observado un aumento el contenido de GAs bioactivas en respuesta a un pulso de R, el cual aparentemente no va acompañado de un aumento en la sensibilidad de las semillas a las GAs (Toyomasu *et al.*, 1993). En esta especie, se han clonado dos genes que codifican para GA 20 oxidasas, *Ls20Ox1* y *Ls20Ox2*, y dos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasas, *Ls3h1* y *Ls3h2*, los cuales se expresan durante la germinación (Toyomasu *et al.*, 1998). Los niveles de mensajeros de *Ls3h1* aumentan en respuesta al R, mediante una LFR, mientras que la acumulación de los transcritos de *Ls20Ox1* y *Ls20Ox2* se produce por la sola incubación de las semillas en oscuridad. En *Arabidopsis*, el Pfr sí produce un aumento en la sensibilidad de semillas a las GAs (Hilhorst y Karssen, 1988; Yang *et al.*, 1995). En esta especie existen también al menos dos genes que codifican para GA 3 $\beta$ -hidroxilasas: *GA4* (Chiang *et al.*, 1995) y *GA4H* (Yamaguchi, *et al.*, 1998). *GA4H* se

expresa predominantemente durante la inducción de la germinación bajo el control del PHYB (Yamaguchi, *et al.*, 1998). La especificidad de tejido para la expresión de estos genes durante la germinación no ha sido reportada en ninguna especie.

La luz no solo promueve la germinación de muchas especies, sino que bajo ciertas condiciones también puede inhibirla (Casal *et al.*, 1998; Capítulo II). En muchas especies la exposición al RLC inhibe la germinación, sin embargo, en la gran mayoría de los casos se desconoce si esta inhibición corresponde, o no, a una respuesta de tipo HIR. De aquí, que la información sobre mecanismos de inhibición de la germinación, por una HIR, sea tan escasa como confusa. En el capítulo II, se ha demostrado que la germinación de semillas de *D. ferox* promovida por R es inhibida por RLC, mediante una HIR. Esta inhibición se observa aún si el tratamiento con RLC comienza cuando las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa han permanecido altas durante varias horas, de forma tal que el ablandamiento del endosperma se encuentra bastante avanzado (Sánchez y de Miguel, 1997). La HIR no afecta el potencial de crecimiento del embrión, ni la actividad de  $\beta$ -manosidasa, pero sí la de endo- $\beta$ -mananasa. Correspondiéndose la reducción en actividad de esta enzima, con los porcentajes de germinación observados (Capítulo II). Estos resultados muestran que durante la germinación de *D. ferox* la LFR y la HIR presentan acciones antagónicas, donde el control sobre la actividad endo- $\beta$ -mananasa es uno de los puntos de regulación donde ese antagonismo se establece (Capítulo II).

Considerando la importancia de las GAs durante la germinación, es posible pensar que el mecanismo de inhibición de la HIR pudiera estar relacionado con la regulación de los niveles de mensajeros para GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa. Hasta el presente no ha habido ningún reporte sobre los efectos de la HIR sobre la expresión de estos genes, ni se conoce su especificidad de tejido durante la germinación. Prácticamente no existe información sobre la regulación por la LFR, y la HIR, sobre la expresión de genes presumiblemente relacionados con la germinación, y blancos de las GAs, como son aquellos que codifican para mananasas y expansinas.

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización de los efectos de la LFR sobre los niveles de transcritos para GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, y el efecto que antagonismo LFR-HIR presenta sobre el nivel de dichos mensajeros, en semillas de *D. ferox*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Origen de las semillas y condiciones de incubación*

Las semillas de *D. ferox* fueron colectadas de plantas que invadían cultivos de soja en Junín, provincia de Buenos Aires. Las semillas fueron almacenadas en frascos oscuros de vidrio a temperatura ambiente.

Para realizar los distintos ensayos las semillas fueron embebidas sobre un algodón saturado con agua destilada, en cajas de plástico transparente, envueltas en hojas de plástico negro, e incubadas en oscuridad durante 24-48 hs en ciclos temperaturas alternadas, 9 hs 30 °C y 15 hs 20 °C. Las cubiertas de las semillas fueron removidas bajo luz blanca, inmediatamente después irradiadas con un pulso saturante de R o RL (20 min,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e incubadas en oscuridad a 20-30 °C por aproximadamente 45 hs antes de ser expuestas a otros tratamientos de luz o realizar la toma de muestras.

### *Fuentes de luz*

La fuente de luz roja (R) estaba compuesta de tubos fluorescentes Philips 40715 de 40 W (Philips, Eindhoven, Holanda). La fuente de luz rojo lejana (RL) constaba de un conjunto de lámparas reflectoras incandescentes de 150 W en combinación con dos filtros de acetato rojo, seis filtros acrílicos azules de 2 mm de espesor (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires) y un filtro de agua de 10 cm. La proporción calculada de Pfr/P fue de 0.87 y 0.1 para las fuentes de R y RL, respectivamente.

### *Disección de las semillas y mediciones de actividad enzimática*

El procedimiento de disección de las distintas partes de la semilla y las mediciones de las distintas actividades enzimáticas fueron realizadas como se describe en la misma sección del Capítulo II.

### *Amplificación por RT-PCR de endo- $\beta$ -mananasa (DfMan), expansinas (DfExpa.), GA 20 oxidasa (DfGA20-ox) y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa (DfGA3 $\beta$ -hy)*

Las extracciones de ARN total fueron realizadas a partir de distintas partes de las semillas. Primeramente, fue disectada la región del endosperma micropilar (de las cuales



fue removido el extremo de la radícula), luego el resto de la semilla fue cortado longitudinalmente en dos mitades de donde fue separado el embrión del resto del endosperma. Fue realizada entonces a la extracción del ARN de muestras que contenían 30 partes de semillas por el método de TRIZOL (Gibco, 15596). En ARN provenientes de las mismas fue resuspendido siempre en 50  $\mu$ l de agua MiliQ. El ARN extraído de embriones fue cuantificado por espectrofotometría, mientras que el ARN obtenido de endosperma micropilar no pudo ser cuantificado debido a la bajísima eficiencia de extracción a partir de este tejido. Seguidamente alícuotas de 3  $\mu$ g ARN total (o 12  $\mu$ l en el caso del endosperma micropilar) fueron tratadas con DNAsa (DNase I, RNase free, Boehringer, 776 785) y convertidas a ADNc usando 300 U de M-MLV Transcriptasa Reversa (Promega, M1705 WI, USA), 20 U RNAsin (RNAsin, Promega, N2511), 1 mM DDT, 10 mM dNTPs (Promega, U1330) y 3.3  $\mu$ M oligo dT (Biodynamics, P100S), e incubándose 10 min 20 °C y luego durante 1 h a 35 °C. La reacción fue detenida por inactivación por calentamiento a 95 °C durante 5 min. El ADNc así obtenido fue amplificado por PCR (4 min 94 °C seguido por 25-35 ciclos de 30 seg., 94 °C; 30 seg a la temperatura de *annealing*, 30 seg 72 °C). Fueron determinadas las temperaturas óptimas de *annealing* para cada par de *primers*, que permitieron la amplificación de un único fragmento. Estas fueron: 60°C para los *primers* diseñados para amplificar mensajeros de expansinas, 45 °C para los de endo- $\beta$ -mananasa, 55 °C para los de actina, 53 °C y 48 °C para los de GA 3 $\beta$ -hidroxilasa y GA 20 oxidasa, respectivamente.

El diseño de los *primers* se describe en la sección de resultados correspondiente, y la secuencia de los mismos se muestra en la Tabla III. I. Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, fotografiados y cuantificados.

**Tabla III. I.** Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de los distintos transcritos.

Transcripto a amplificar	<i>Lower primer</i>	<i>Upper primer</i>
<b>Expansinas</b>	CGCGGATCCATGGGNGGWGCKTGTGGKTA	CGCGGATCCTGCCARTTTTGYCCCA
<b>endo-<math>\beta</math>-mananasa</b>	CGCGGATCCACAATTATGGCATGGGA	CGCGGATCCATGGATAGTAGCAAATC
<b>GA 3<math>\beta</math>-hidroxilasa</b>	CTTTTTTCGATAAGCTCATGTGG	CTTAGTTCCTCAAATACTCACTCC
<b>GA20 oxidasa</b>	GGTTTTCATCTAAGTTGCCTTGG	GTTTACCACTGCTCTATGCAA
<b>actina</b>	TGGCATCATACCTTTTACAA	TCCGGGCATCTGAACCTCTC

*Clonado, secuenciación y análisis de secuencias de DfMan, DfExpas, DfGA20-ox y DfGA3 $\beta$ -hy*

La identidad de los productos de PCR obtenidos con los diferentes pares de primers fue determinada por secuenciación directa de los productos de PCR o de estos previamente clonados en el vector pGEM-T (pGEM-T Vector System kit, Promega, A3600). Las secuenciaciones fueron realizadas por la Unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Bioquímicas (Fundación Campomar) o por la unidad de secuenciación de la Universidad de Cornell. Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el Genbank: *DfMan*, AF323949, *DfExpal*, AF442773, *DfExpal2*, AF442772, *DfGA20-ox*, AF32108 y *DfGA3 $\beta$ -hy*, AF323950.

La búsqueda de homología de secuencias en las bases de datos fueron realizadas utilizando el programa BLAST. Para los alineamientos de secuencias fueron utilizados los programas MULTIALIN y CLUSTAL W.

*Análisis por Southern Blot*

15  $\mu$ g ADN genómico extraído de hojas de *D. ferox* fue cortado con enzimas de restricción y separado por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, tratado

sucesivamente con HCl 250 mM 20 min, NaOH 0,5 N-CINa 1,5 M 30 min y Tris-HCl pH 8 1,5 M 30 min; y transferido a una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) como se describe en *Currents Protocols in Molecular Biology* (Fred M. Ausubel, 1994), la cual fue horneada a 80 °C durante 2 hs. Para generar las sondas específicas, fueron amplificados por PCR los distintos fragmentos utilizando los distintos pares de *primers* descritos en la sección de resultados (Tabla III. I) sobre los productos de la reacción de RT. Posteriormente, estos fragmentos fueron marcados con P<sup>32</sup> por *random priming* (Labeling System, Promega U1100). La pre-hibridación y la hibridación fueron realizadas en una solución que contenía SSPE 5x, SDS 0,1 %, solución *Denhart* y HS ADN 10 mg/ml (HS DNA, Promega) a 60 °C. Los lavados de las membranas fueron realizados a la misma temperatura usando soluciones de SSC 2x, 0.1 % SDS, SSC 1x, 0.1 % SDS y SSC 0.5x, 0.1 % SDS. La señal fue detectada utilizando placas para rayos-X.

#### *Análisis por Northern Blot*

Muestras de 20 µg de ARN total fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa 1.5 % formaldehído, 37 %, y buffer MOPS, transferidas a una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) como se describe en *Currents Protocols in Molecular Biology* (Fred M. Ausubel, 1994), la cual fue horneada a 80 °C durante 2 hs. La amplificación de las sondas y la marcación fueron realizadas como se describe en la sección anterior. La pre-hibridación y la hibridación fueron realizadas en una solución que contenía formamida 50 %, SSPE 5x, SDS 0,1 %, solución *Denhart* y HS ADN 10 mg/ml (HS DNA, Promega) a 42 °C. Los lavados de las membranas fueron realizados a la misma temperatura de hibridación usando soluciones de SSC 2x, 0.1 % SDS, SSC 0.5x, 0.1 % SDS y SSC 0.1x, 0.1 % SDS. La señal fue detectada utilizando placas para rayos-X, el tiempo de exposición para *DfGA3β-hy* fue de aproximadamente 7 días y para actina de 24 hs.

#### *Análisis de la expresión de DfMan, DfExpa, DfGA20-ox y DfGA3β-hy por RT-PCR.*

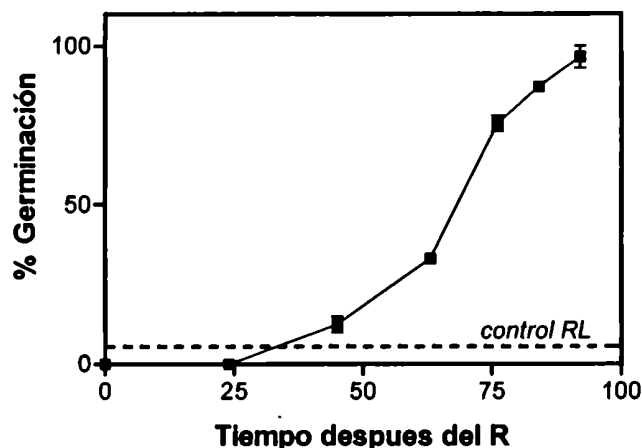
Para asegurar que todas las reacciones de PCR fueron realizadas dentro del rango lineal de la reacción se usaron distintos números de ciclos (25 a 35) con los diferentes *primers*. La abundancia de los transcritos fue calculada en base a la intensidad de las

bandas de los productos obtenidos por RT-PCR, analizada utilizando el programa MULTIANALIST (Fluor-S MultiImager, BioRad, Hércules, California, USA). La amplificación de actina fue usada como control interno y de contaminación con ADN genómico, utilizando un par *primers* cedidos por el laboratorio del Dr. Iuseim, que permitía la amplificación de una banda de 500 pb si la amplificación se realizaba a partir de ADNc y de 800 pb sobre ADN genómico.

## RESULTADOS

### ***Germinación en función del tiempo después de un pulso de R***

Cerca del 100 % de la población de semillas de *D. ferox* utilizada para estos ensayos germinó 72 hs después de dado un pulso inductor y saturante de R. Sin embargo, menos del 3 % de la población germinó cuando las semillas fueron expuestas a un pulso de RL (Fig. III. 1). Por otro lado, las semillas que recibieron un pulso de RL inmediatamente después del R apenas alcanzaron un 5 % de germinación final (Capítulo II, Fig. 1). Al intercalar un período de oscuridad de 45-48 hs entre los tratamientos de R y RL, los porcentajes de germinación final obtenidos fueron prácticamente los mismos que los alcanzados por semillas control que sólo habían recibido R (Capítulo II, Fig. 1). Se puede decir entonces, a partir de las 45 hs la germinación ha escapado al control por el Pfr, es decir por la LFR.



**Figura III. 1. Germinación en el tiempo de semillas de *D. ferox* inducidas por R.** Las semillas una vez peladas fueron expuestas a un pulso saturante de R ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y luego a otro de RL ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), intercalando entre estos pulsos un período de incubación en oscuridad de duración cada vez mayor. Seguidamente, las semillas fueron incubadas en oscuridad hasta completar 72 hs (20-30 °C) a partir del pulso inicial de R. La germinación de semillas control tratadas con R seguido inmediatamente de RL se representa en la figura con una línea punteada.

***Estrategia de clonado y caracterización de DfMan, DfExp1, DfExp1\2, DfGA20-ox y DfGA3β-hy ADNc***

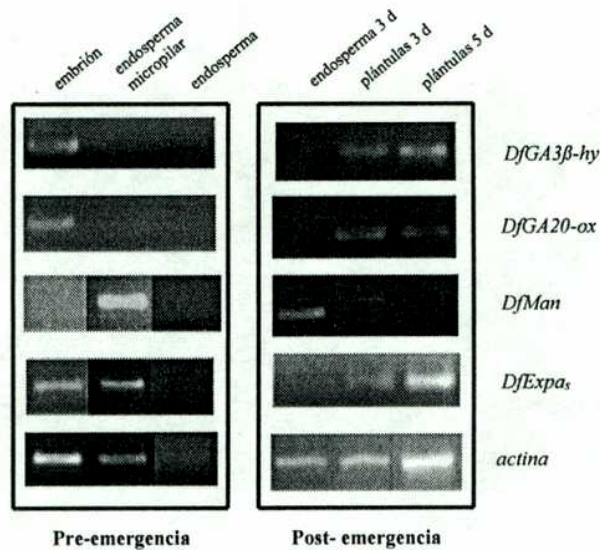
Sobre la base de las secuencias publicadas en el GeneBank se diseñaron primers específicos, para amplificar mediante RT-PCR una región de los mensajeros para endo-β-mananasa, expansinas, GA 20 oxidasa y GA 3β-hidroxilasa. El diseño de los primers se basó en las secuencias conservadas de aminoácidos. En el caso de endo-β-mananasa se utilizaron para el diseño: secuencias para endo-β-mananasas de hongos y la secuencia de gen ortólogo de tomate LeMAN1, dado que en ese momento no se encontraban disponibles otras secuencias en plantas. Esperándose la ampliación de un fragmento de aproximadamente 250 pb.

Los primers para amplificar mensajeros de expansinas fueron diseñados por la Dra. Alejandra Mella a partir de secuencias para α-expansinas asociadas tanto a

maduración de frutos como a procesos de crecimiento de tejidos (Cosgrove, 2000a; Cosgrove, 1998). Estos procesos presentan semejanzas con el ablandamiento del endosperma y con el crecimiento del embrión durante la germinación. El fragmento que se esperaba amplificar en este caso era de aproximadamente 500 pb.

El diseño de los primers para obtener la ampliación de los mensajeros para GA 20 oxidasa se basó en secuencias para esta enzima de tabaco y tomate. En el caso de GA 3 $\beta$ -hidroxilasa se usaron para el diseño de los primers, secuencias disponibles de tomate, lechuga, Pisum y Arabidopsis. Esperándose la ampliación de fragmentos de aproximadamente 500 y 600 pb para GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, respectivamente.

Utilizando los distintos pares de primers (Tabla III. I) se obtuvieron los productos de RT-PCR del peso molecular esperado, amplificados a partir del ARN total extraído de embriones y del endosperma micropilar, 46 después del pulso de R inductor de la germinación, previamente a la extrusión de la radícula (Fig. III. 2). La identidad de los fragmentos obtenidos fue determinada por secuenciación. El análisis de las secuencias obtenidas reveló que una porción de la región codificante para una endo- $\beta$ -mananasa y una expansina, *DfMan* y *DfExpa1*, fueron amplificadas a partir de ARN proveniente del endosperma micropilar. A partir del ARN extraído de embriones, usando los *primers* para amplificar mensajeros para expansinas, se obtuvo un único producto de PCR, al que denominamos *DfExpa1/2*, ya que contenía fragmentos codificantes para dos tipos de expansinas, *DfExpa1* y *DfExpa2*. Por último, una porción del mensajero para una GA 20 oxidasa, *DfGA20-ox*, y una GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, *DfGA3 $\beta$ -hy*, fueron amplificados a partir del ARN extraído de embriones utilizando los *primers* correspondientes. Las secuencias obtenidas fueron publicadas en el GeneBank (*DfMan*: AF323949, *DfExpa1*: AF442773 y *DfExpa2*: AF442772, *DfGA20-ox*: AF321085, *DfGA3 $\beta$ -hy*: AF323950 (Fig. III. 3)).



**Figura III. 2.** Patrón de expresión de *GA3β-hy*, *DfGA20-ox*, *DfMan* y *DfExpa1* y *DfExpa1/2* antes y después de la emergencia de la radícula en semillas *D. ferox* inducidas por R. El nivel de los distintos transcritos fue evaluado previamente a la emergencia de la radícula (pre-emergencia) en embriones y en el endosperma micropilar y lateral, a 46 hs del pulso de R (20-30 °C). Una vez concluida la germinación (post-emergencia) el nivel de los distintos mensajeros fue evaluado en el endosperma completo (3 d) y en plántulas a los 3 y 5 d a partir del pulso de R. Un fragmento del mensajero para actina fue amplificado como control interno. En la figura se observa un gel representativo teñido con bromuro de etidio de los productos de RT-PCR obtenidos.

La comparación de las secuencias obtenidas con otras ya publicadas, mostró que *DfMan* presenta un 83 % y un 86 % de identidad con *LeMAN2* y *LeMAN1*, endo-β-mananasas de tomate pre- y post-germinativas, respectivamente (Fig. III. 3 A). Por un lado, *DfExpa1* localizado tanto en el endosperma micropilar como en el embrión de *D. ferox*, muestra una identidad del 89 % con *LeEXP4* de tomate. *LeEXP4* se expresa durante la germinación únicamente en la región micropilar del endosperma (Chen y Bradford, 2000) (Fig. III. 3 B). Por otro lado, *DfExpa2* que en *D. ferox* sólo se expresa en embrión presenta una identidad del 87 % con respecto a *LeEXP10*, que también se expresa en embriones de tomate previamente a la emergencia de la radícula (Chen *et al.*, 2001) (Fig. III. 3 B). *DfGA20-ox* muestra una identidad de aproximadamente el 90 % con las GA 20 oxidasas de tomate y tabaco, y del 85-81 % con GA 20 oxidasas de lechuga,



*Ls20ox1* y *Ls20ox2* (Fig. III. 3 C). Por último, *DfGA3 $\beta$ -hy* presenta una identidad del 85 al 80 % con las GA 3 $\beta$ -hidroxilasas de tomate, lechuga y *Arabidopsis* (Fig. III. 3 D).

## A

```

>DfMan      1 .....C CCGATCC ACAATTATGGCATGGGAAC TATGAATGAGCCTCGCTG
>LeMan1    480 AGTTGCTTACAAAGATGATCCGACAATTATGGCATGGGAAC CATGAATGAGCCTCGCGA
>LeMan2    601 AATGACATAAAAGATGATTCNACTATCATGGCATGGGAAC CATGAATGAGCCTAGCAA
Consensus  387 A T C TA AAAGATGATCC ACAATTATGGCATGGGAAC CATGAATGAGCCTCGC A

>DfMan      48 CAATGCTGATTATTC TGC AAAAC AGTTAATGGATGGC TTCAAGAGATGGCAAGTTTG
>LeMan1    540 TCAAGCTGATATTTCAGGAAAAC TTTAATGC TGGG TTCAAGAAATGGCAAGTTTG
>LeMan2    661 CCAAGCTGATTATTCAGGAAA ACTCTTAA C CATGGG TTCAAGAAATGGCAAGTTTG
Consensus  440 CCAAGCTGATTATTCAGGAAAAC TTTAATGGATGGG TTCAAGAAATGGCAAGTTTG

>DfMan      108 TGAATCAGTAGACAA AAGCACTTGTGGAGATAGGAATGGAAGGATTTATGCC GATT
>LeMan1    599 TGAATCAGTAGACAACAACACTTGT TGGAGT TGGAAATGGAAGGATTTATGGTGATT
>LeMan2    720 TGAATCAGTAGA AACAACA TTTGCTGGAA ATAGGAATGGAAGGATTTATGGTGATT
Consensus  499 TGAATCAGTAGACAACAACACTTGT TGGAGATAGGAATGGAAGGATTTATGGTGATT

>DfMan      168 CAATGCCGAAA GAAGCAAGTTAATCCTGGTTCCAAGTTGGAACAGATTTTATCAGTA
>LeMan1    659 CAAT CCTGAAAGGAAGTCAGTTAATCCTGGTTATCAAGTTGGAACAGATTTTATAGTA
>LeMan2    780 CAATGCCGAAA GAAGTCAGTTAATCCTGGTATCAAGTTGGAACAGATTTTATAGTA
Consensus  559 CAATGCCGAAA GAAGTCAGTTAATCCTGGTTATCAAGTTGGAACAGATTTTATAGTA

>DfMan      228 GCCATCTTATAGGGAGATTGATTTGCTACTATCCATGCAT CCGG .....
>LeMan1    719 ACCATCTTATCAAGATTGATTTGCTACTATCCATGCATACACTGACCAATGGCTGT
>LeMan2    840 ACCATCTATCAAGAGATTGATTTGCTACTATCATGCATACACTGACCAATGGCTAT
Consensus  619 ACCATCTTATCAAGATTGATTTGCTACTATCCATGCATACACTGACCAATGGCTAT
  
```

## B

```

>DfExpa2    1 .....ATCC
>LeExp10   160 GG.....ATGGATTGAAGCTCATGCAACTTCTATGGAGGTGGTGATGCTTCCGGAACT
DfExpal1   1 .....
>LeExp4    179 GGGGACCATGGCAAACCGCCACCCCTCTACGGTGGCTCTGAGGCATCTGGAACT
Consensus  1 .....AACT

>DfExpa2    5 ATGGCGCGCTTGTGGTAAAGGGGATTGTACAGCCAAGGATAAGCACAAACAGAGCA
>LeExp10   214 ATGGTGGAGCTGTGGTTATGGGAATTGTACAGCCAAGGATAAGCACAAACAGAGCA
DfExpal1   1 ATGGCGCGCTTGTGGTATGGGAATTGTACAGCCAAGGATACGGAGTGAACAATGCA
>LeExp4    239 ATGGTGGAGCTTGTGGTATGGGAATTGTACAGCCAAGGATACGGAGTGAACAATGCA
Consensus  5 ATGGTGGAGCTTGTGGTATGGGAATTGTACAGCCAAGGATACGGAACAACAAGCA

>DfExpa2    65 GCATTAGCACAGCACTGTTCAACAATGGGTTAGCTGGGNCCTGTTTGGACTTAAAG
>LeExp10   274 GCATTAGCACAGCACTGTTCAACAATGGGTTAGCTGGGNCCTGTTTGGACTTAAAG
DfExpal1   61 GCGTAAGCACAGCTGCTATTCAACAATGGGTTAGCTGGGAGCTTGCTTTGAGTAAAG
>LeExp4    299 GCGTAAGCACAGCTGCTATTCAACAATGGGTTAGCTGGGAGCTTGCTTTGAGTAAAG
Consensus  65 GCATTAGCACAGCACTATTCAACAATGGGTTAGCTGGGAGCTTGCTTTGAGTAAAG

>DfExpa2    125 TGGCGGGCGATTCCAAAGTGGTGCCTTCCAGG.....TCCATAGTGGTACTGGCCACT
>LeExp10   334 TGTGTGGCGATTCCAAAGTGGTGCCTTCCAGG.....TCCATAGTGGTACTGGCTACT
DfExpal1   121 TGTGTAAAGATGCCAAATGGTGCCTTCCGAAACCCATCCATTTTGTGACGGCGACA
>LeExp4    359 TGTGATAACGATGCCAAATGGTGCCTTCCGAAACCCATCCATTTTGTGACGGCGACA
Consensus  125 TGTGTAAAGATGCCAAATGGTGCCTTCCAGG.....TCCATAGTGGTACTGGCGACA

>DfExpa2    179 AATTTTGGCCACCAAAATATGCCCTTCCGAACAAGCTGGTGGTGGTGCACCCCTCC
>LeExp10   388 AATTTTGGCCACCAAAATATGCCCTTCCGAACAAGCTGGTGGTGGTGCACCCCTCC
DfExpal1   181 AATTTTGGCCACCAAACTTCGCTTCCGAAACCCGAGCGGATGGTGCACCCCTCC
>LeExp4    419 AATTTTGGCCACCAAACTTCGCTTCCGAAACCCGAGCGGCGGTGGTGCACCCCTCC
Consensus  178 AATTTTGGCCACCAAACTTCGCTTCCGAAACAAGCTGGTGGTGGTGCACCCCTCC

>DfExpa2    239 CCGCACCCTTGACCTCCGAGCCTGTTTCAAATAATGGCTCAGTACAGAGCTGGG
>LeExp10   448 TTGCACCCTTGACCTCCGAGCCTGTTTCAAATAATGGCTCAGTACAGAGCTGGG
  
```



DfExpa1 241 CGTCTCAATTTCGATCTCGCCATGCCTATGTTCCGAAAATGGACAGTATCGTGCCCGGA  
 >LeExp4 479 CGTCTCAATTTCGATCTCGCCATGCCTATGTTCCGAAAATGGACAGTATCGTGCCCGGA  
 Consensus 238 CGGCACCACCTTCGACCTCGCCACGCTATGTTCCAAAAATGGCAGTACAGAGCCCGGA

>DfExpa2 299 ATGTCCCTGTGCTTATCGAAGGGTACGGTGCAGAAAAAGGGGGAGATCAGATTACA  
 >LeExp10 508 ATGTCCCTGTGCTTATCGAAGGGTACGGTGCAGAAAAAGGGGGAGATCAGATTACA  
 DfExpa1 301 ATGTCCCTGTGACCTACCCCGGAGTACCATGCAGAAAAGCAAGGAGGGATCGATTACA  
 >LeExp4 539 ATGTCCCTGTGACCTACCCCGGAGTACCATGCAGAAAAGCAAGGAGGGATCGATTACA  
 Consensus 298 ATGTCCCTGTGACCTACCCGAGGAGTACCATGCAGAAAAAGGAGGATCAGATTACA

>DfExpa2 359 ATGAACGGTCACTCATACTCAACTTGGTGTAGTGACCAACGTGGCAGGTTCAGGAGAT  
 >LeExp10 568 ATGAACGGTCACTCATACTCAACTTGGTGTAGTGACCAACGTGGCAGGTTCAGGAGAT  
 DfExpa1 361 ATAAACGGTTCCTTACTTTAACTTGGTGTAGTGACCAACGTTCGGGTGCAGGGGAC  
 >LeExp4 599 ATAAACGGTTCCTTACTTCAATTTCTTATGGTGTAGTACAAACGTTCGGGTGCAGGGGAT  
 Consensus 358 ATAAACGGTCACTTACTTCAACTTGGTGTGGTGTAGTACAAACGTTCGGGTGCAGGAGAT

>DfExpa2 419 GTAAATGCAAGTTTCGGTTAAAGGTTCCAGAACTGACTGGATCTTATCTCGCAATTGG  
 >LeExp10 628 GTAAATGCAAGTTTCGGTTAAAGGTTCCAGAACTGACTGGATCTTATCTCGCAATTGG  
 DfExpa1 421 ATCCAGAAAGGTTCTCATTAAAGGAACAAAACACACAGTGGATAGCAATGAGCCGTAACCTGG  
 >LeExp4 659 ATCCAGAAAGGTTCTCATTAAAGGAACAAAACACACAGTGGATAGCAATGAGCCGTAATTGG  
 Consensus 418 ATAAAGAAAGTTTCGATTAAAGGAACAAAACACAGTGGATAGCAATGACTCGCAATTGG

>DfExpa2 479 GGCAAAACCTGGCAGGATCCGC .....  
 >LeExp10 688 GGCAAAACCTGGCAGGCAATGCATTACTTGATGGTCAAATTCATCATTTAAAGTAATC  
 DfExpa1 481 GGCAAAACCTGGCAGGATC .....  
 >LeExp4 719 GGCAAAACCTGGCAACTAATCCACCTTTAGTGGGTCAAAGCCCTTCTATTTCGGGTAAAG  
 Consensus 478 GGCAAAACCTGGCAGGCAATGC .....  
 Consensus 478 GGCAAAACCTGGCAGGCAATGC .....

## C

>DfGA20-ox 1 .....GGTTTTTCATCTAAGTTCCTTGGAAAGAGACACTCTCTTTTCGATACTCTGCT  
 >Le20ox1 513 ACTGCAAGGTTTTCATCTAAGCTACCTTGGAAAGAGACACTCTCTTTTCGATACTCTGCT  
 >Ls20ox2 541 ACTGCAAGGTTTTCATCTAAGCTACCTTGGAAAGAGACACTCTCTTTTCGATACTCTGCT  
 >Nt20-ox 418 ACTGCAAGGTTTTCATCTAAGCTACCTTGGAAAGAGACACTCTCTTTTCGATACTCTGCT  
 Consensus 218 ACTGCAAGGTTTTCATCTAAGCTACCTTGGAAAGAGACACTCTCTTTTCGATACTCTGCT

>DfGA20-ox 54 CAAAAGACTCATCTCACATAGTTGAAGAGTATTTCCAAAGGACATTTGGGAGAAAGTTT  
 >Le20ox1 573 CAAAAGACTCATCTCACATAGTTGAAGAGTATTTCCAAAGGACATTTGGGAGAAAGTTT  
 >Ls20ox2 601 CAAAAGACTCATCTCACATAGTTGAAGAGTATTTCCAAAGGACATTTGGGAGAAAGTTT  
 >Nt20ox 478 CAAAAGACTCATCTCACATAGTTGAAGAGTATTTCCAAAGGACATTTGGGAGAAAGTTT  
 Consensus 275 CAAAAGACTCATCTCACATAGTTGAAGAGTATTTCCAAAGGACATTTGGGAGAAAGTTT

>DfGA20-ox 114 AACCATCTTGGGAATGTTTATCAAGAATATTGCAATTCATGAGCACACTTTCCTTGGG  
 >Le20ox1 633 AACCATCTTGGGAATGTTTATCAAGAATATTGCAATTCATGAGCACACTTTCCTTGGG  
 >Ls20ox2 661 AACCATCTTGGGAATGTTTATCAAGAATATTGCAATTCATGAGCACACTTTCCTTGGG  
 >Nt20-ox 538 AACCATCTTGGGAATGTTTATCAAGAATATTGCAATTCATGAGCACACTTTCCTTGGG  
 Consensus 334 AACCATCTTGGGAATGTTTATCAAGAATATTGCAATTCATGAGCACACTTTCCTTGGG

>DfGA20-ox 174 ATCATGGAACCTTTGGGATGAGCCTAGGCGTAGAGAAGAACCACTTCAAAGAATTTTTT  
 >Le20ox1 693 ATCATGGAACCTTTGGGATGAGCCTAGGCGTAGAGAAGAACCACTTCAAAGAATTTTTT  
 >Ls20ox2 721 ATCATGGAACCTTTGGGATGAGCCTAGGCGTAGAGAAGAACCACTTCAAAGAATTTTTT  
 >Nt20-ox 598 ATCATGGAACCTTTGGGATGAGCCTAGGCGTAGAGAAGAACCACTTCAAAGAATTTTTT  
 Consensus 393 ATCATGGAACCTTTGGGATGAGCCTAGGCGTAGAGAAGAACCACTTCAAAGAATTTTTT

>DfGA20-ox 234 GAAGAAAATGAATCGATAATGAGACTCAACTACTATCCGCGGTGCCAGAAACCAGAGCTG  
 >Le20ox1 753 GAAGAAAATGAATCGATAATGAGACTCAACTACTATCCGCGGTGCCAGAAACCAGAGCTG  
 >Ls20ox2 781 GAAGAAAATGAATCGATAATGAGACTCAACTACTATCCGCGGTGCCAGAAACCAGAGCTG  
 >Nt20-ox 658 GAAGAAAATGAATCGATAATGAGACTCAACTACTATCCGCGGTGCCAGAAACCAGAGCTG  
 Consensus 451 GAAGAAAATGAATCGATAATGAGACTCAACTACTATCCGCGGTGCCAGAAACCAGAGCTG

>DfGA20-ox 294 ACCTTAGGAACGGGGCCTCATTGTGATCCAACATCATTAACCATCTACATCAAGATTGT  
 >Le20ox1 813 ACCTTAGGAACGGGGCCTCATTGTGATCCAACATCATTAACCATCTACATCAAGATTGT  
 >Ls20ox2 841 ACCTTAGGAACGGGGCCTCATTGTGATCCAACATCATTAACCATCTACATCAAGATTGT  
 >Nt20-ox 718 ACCTTAGGAACGGGGCCTCATTGTGATCCAACATCATTAACCATCTACATCAAGATTGT  
 Consensus 510 ACCTTAGGAACGGGGCCTCATTGTGATCCAACATCATTAACCATCTACATCAAGATTGT

>DfGA20-ox 354 GTTGGGGACTTCAAGTTTTTGTGGACAATGAATGGCGCTCCATCAGTCCAAATTTCAAC  
 >Le20ox1 873 GTTGGGGACTTCAAGTTTTTGTGGACAATGAATGGCGCTCCATCAGTCCAAATTTCAAC  
 >Ls20ox2 901 GTTGGGGACTTCAAGTTTTTGTGGACAATGAATGGCGCTCCATCAGTCCAAATTTCAAC



>Nt20-ox 778 GTTGC GGGCTTCAAGTTTTTGTGGACAA CGAATGGCGCTCCGTCAGTCCAAATTTCAAC  
 Consensus 570 GTTGC GGACTTCAAGTTTTTGTGGACAATGAATGGCGCTCCATCAGTCCAAATTTCAAC

>DfGA20-ox 414 GCTTTTGTGGTTAACATAGGCGACACATTTATGGCGCTTTCAAATGGAAGATACAAAAGT  
 >Le20ox1 933 GCATTTGTGGTTAAATAGGCGACACATTTATGGCGCTTTCAAATGGAAGATACAAAAGT  
 >Ls20ox2 961 RCTTTTGTAGTAAACATCGCTGATACATTGATGGCGCTTTCAAATGGAACAATACAGAAGT  
 >Nt20-ox 838 GCTTTCTGTGGTTAACATAGGCGATACATTTATGGCTTTCAAATGGAAGATACAAAAGT  
 Consensus 629 GCTTTTGTGGTTAACATAGGCGACACATTTATGGCGCTTTCAAATGGAAGATACAAAAGT

>DfGA20-ox 474 TGCTTGCATAGAGCAGTGGTAAA .....  
 >Le30H-2 993 TGCTTACAAGAGCGGTGTAAACAACAAGAATCTAGGAAATCACTTGCTTTCTTTCTT  
 >Ls20ox2 1021 TGCTTACATAGAGCTGTGGTAAACAACAAGATCTAGGAAATCACTTGCTTTCTTTCTA  
 >Nt20-ox 898 TGCTTGCATAGAGCAGTGGTAAACAACAAGAATCTAGGAAATCACTTGCTTTCTTTCTT  
 Consensus 689 TGCTTGCATAGAGCAGTGGTAAACAACAAGAATCTAGGAAATCACTTGCTTTCTTTCTT

D

>DfGA3-hy 1 .....CT  
 >Le30H-2 319 TTAAGAAGCACTGAGCGTCCGATGGCTCCGCTGGCTATGGAGTCGGTCCGAATTTGTTCT  
 >Ls3h1 350 CTTAAAGCTGCTAGCACCAGAGGGTCTCTGGCTATGGCGTTCGAAGATATCGTCTG  
 >At3h 350 CTCAGGGCGCTGGCTCAGAGAAATGGCTCTCCGGCTAGGGCTAGCTCGATTCTCTCTG  
 Consensus 115 TAA GC GCT C C . . . . A GG . TC C GGCTA GG . GI . GC . G . AT . C . TCT

>DfGA3-hy 3 TTTTTCGATAAGCTCATGTGGTCCGAAGGGTTACAAATTTTG . TCCCTCTTGAACAC  
 >Le30H-2 379 TTTTTCGATAAGCTCATGTGGTCCGAAGGATTCACAATTTTGGATCCCTCTGGAAAT  
 >Ls3h1 410 TTTTTCGAACTCATGTGGTCCGAAGGATTCACAATTTTGGATCCCTCTGGAAAT  
 >At3h 410 TTTTTCGATAAGCTCATGTGGTCCGAAGGTTTCCACTTATTGGCTCTCCCTCTCCAGAT  
 Consensus 449 TTTTTCGATAAGCTCATGTGGTCCGAAGGTTTCCACTTATTGGCTCTCCCTCTGAACAT

>DfGA3-hy 2 GCCCGTCAACTTGGCCACATGATTACAACATTATTCTGTGACGTAATGCGGARTACGAA  
 >Le30H-2 439 GCCCGTCAACTTGGCCATACGATTACAATAAATCTGTGACGTCATCGAAGAGTACGAA  
 >Ls3h1 470 GCCTGTAACCTTGGCCACACCTTATAGTAGATTCTGTGATGTAATCGAAGGATATAAA  
 >At3h 470 TCCGTAACCTTGGCCACCCACTCAAAATCTGTGAAATATTGAAGAGTATGAA  
 Consensus 206 GCCCGTCAACTTGGCCACGATTACAACAATTCTGTGACGTAATTGAAGAGTACGAA

>DfGA3-hy 122 AATGAGRTGGAAAAGCTAGCAGGAAGACTGATGTTCTGATGCTTGGGTCCTTGGAAAT  
 >Le30H-2 499 AATGAAATGGAAAAGCTAGCAGGAAGATTAATGCTTTAATGCTTGGGTCCTTGGAAAT  
 >Ls3h1 530 CACGAGATGAACTTAGCTCAAGACTGATGTTCTGATGCTCGGATCTTGGGTTA  
 >At3h 530 GAACAATATCAAAAAGCTAGCAGGAAGCTGATGTTCTGATGCTCGGATCTTGGGTTA  
 Consensus 264 AATGAGATGGAAAAGCTAGCAGGAAGACTGATGTTCTGATGCTTGGGTCCTTGGAAAT

>DfGA3-hy 182 ACAAGGAGGACATCTGAATTTGGAC . . . . . GGCCCAAGAGGCGGATGCTGCTGCC  
 >Le30H-2 559 GCAAAAGGAGAGTGTAAATGGGCC . . . . . TTGGCCCAAGAGGCGGATGCTGCTGCC  
 >Ls3h1 590 ACAAGGAGGACATAAATGGGA . . . . . TGGATCAGAGGATCTGCTCGAGCT  
 >At3h 590 GAAAGGAGGACATCAATGGGCCGGCTTAATTCAGACTTTCAGGAAACCCAGCAGCT  
 Consensus 324 ACAAGGAGGACATTAATGGG . . . . . GGCCCAAGAGGCGGATGCTGCTGCC

>DfGA3-hy 234 CTACAACATAAATCTTACCCGGCTTGTCCGGATCCGGATCGGGCCATGGGCCTTGTGCA  
 >Le30H-2 610 CTACAACATAAATCTTACCCGGCTTGTCCGGATCCGGATCGGGCATGGGCCTTGTGCA  
 >Ls3h1 638 TTACAGTAAATCTTACCCGGCTTGTCCGGATCCGGATCGGGCATGGGCCTTGTGCA  
 >At3h 650 ATCCAACATAAATCTTACCCGGCTTGTCCGGATCCGGATCGGGCCATGGGCCTTGTGCA  
 Consensus 369 CTACAACATAAATCTTACCCGGCTTGTCCGGATCCGGATCGGGCCATGGGCCTTGTGCA

>DfGA3-hy 294 CATACGGATTCTACCTATTAACCATCCTTACCACAAACAACAAGTGGCTTACAAGTT  
 >Le30H-2 670 CATACGGATTCTACCTATTAACCATCCTTACCACAAACAACAAGTGGCTTACAAGTT  
 >Ls3h1 698 CATACGGATTCTACCTATTAACCATCCTTACCACAAACAACAAGTGGCTTACAAGTT  
 >At3h 710 CATACGGATTCTACCTATTAACCATCCTTACCACAAACAACAAGTGGCTTACAAGTT  
 Consensus 429 CATACGGATTCTACCTATTAACCATCCTTACCACAAACAACAAGTGGCTTACAAGTT

>DfGA3-hy 354 TTTTCGAGAGGGCAACGGTGGGTGACGGTTCCCTCCACTTTGTGGCGGTTGGTTATCAAC  
 >Le30H-2 730 TTTTAAGAGGAAACGGTGGGTAAACGGTTCCTCTCCTTCCGGCGCATTTAGTTATCAAC  
 >Ls3h1 758 CACAGGAGAGGACCGGTTGGGTGACAGTCCACCGGATACCTGGTCCCTTGTGGTCAAT  
 >At3h 770 TTTCCGGATGACCTGGCTGGGTAAACCGGCACTGTCCCTGGCTCCGTGGTGGTCAAC  
 Consensus 488 TTTTCGAGAGGGCAACGGTGGGTGACGGTTCCCTCCACTTTGTGGCGGTTGGTTATCAAC

>DfGA3-hy 414 GTAGGCGACCTTCTCCACATAGTGTCAAACGGGTTGTACCCGAGTGTCTACATCGGGCG  
 >Le30H-2 790 GTGGGTGATTTGTTACACATATTGTCAAACGGGTTGTACCCGAGTGTCTACATCGGGCG  
 >Ls3h1 818 GTAGGTGACCTCTCCACATATTGTCAAACGGGTTGTACCCGAGTGTCTACATCGGGCG  
 >At3h 830 GTGGGTGACCTCTCCACATTTTAAACCAACGGGATTTCCCGAGGCTCTTACCCAGCC  
 Consensus 546 GTAGGTGACCTTCTCCACATATTGTCAAACGGGTTGTACCCGAGTGTCTACATCGGGCG

>DfGA3-hy 474 GTGGTAAACCGGACCCGACATCGTCTCTCTGTGGCTATCTGTACGGGCCACCGTCAGGC  
 >Le30H-2 850 ATAGTGAACGGACTCGACATCGTCTCTCAGTGGCTATCTATAAGGGCCACCGTCAGGC

```

>Ls3h1      878 ATGGTGAACCGAACCCACACCGCTGTCAGTGGCTATCTCTACGGACCACCTTCTAAT
>At3h      890 AGGGTTAACCACCTCCGATCTCGGTCTCTCAATGGCTACCTGTGGCTCCACCATCCGAT
Consensus  604 ATGGTAAACCGACCCGACATCGTCTCTCAGTGGCTATCTGTACGGGCCACCGTCAGG.

>DfGA3-hy  533 GTGAAAATTCACCCCTCTCGAAATGGTAGACCAAAGAACCCTCCAATGTATCGTCCA
>Le3OH-2   910 GTGAAAATTCACCCCTATCGAAATGGTAGACCAAAGCAACCCTCAATGTATAGGCCA
>Ls3h1     938 GTTCAAAATCTACCTCTTTCAAAATTAACGGATCATGTTACCCACCTCTTTACCGACCA
>At3h      950 GTAAATGATCTCTCCACTTCCCAAAGTGGTTGATCTCTCCAAATCTCCCTCTACCCATCT
Consensus  662 GTGAAAATTCACCCCTCTCGAAATGGTAGACCAAAGCAACCCTCCAATGTATCGCCA

>DfGA3-hy  593 RTGGGGTGGAGTGAGTATTTGGGAACTAAG.....
>Le3OH-2   970 GTGACGTGGAGTGAGTATTTGGGAACTAAGGCAAAACATTTGATAAAGCAGTTTGATCT
>Ls3h1     998 GTTACATGGAGCGAGTATCTTGGCACAAAAGCAAAACACTTCAACAAGGCTTTGCTTCG
>At3h      1010 CTCACATGGAGACAAATACCTTGGTACCAAAGCTACTCAATTTAATCAATCTCTTCCATT
Consensus  719 .TGACGTGGAGTGAGTATTTGGGAACTAAGGCAAAACATTTGATAAAGCAGTTTGATCT

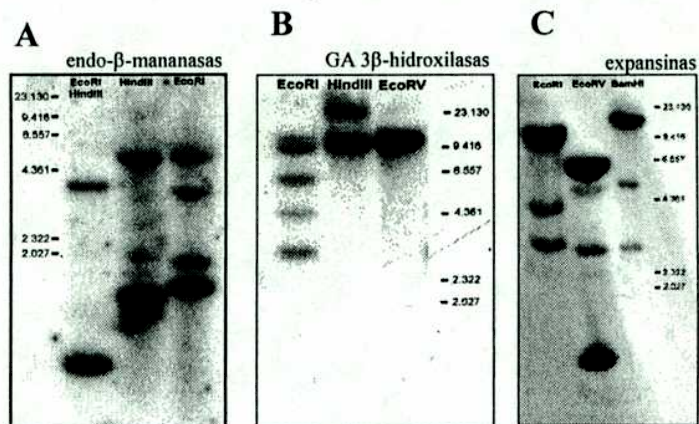
```

Figura III. 3. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de *DfMan* (A), *DfExpa1* y *DfExpa2* (B), *DfGA20-ox* (C) y *DfGA3 $\beta$ -hy* (D) de semillas *D. ferox* con genes ortólogos de otras especies. *DfMan* fue alineada con *LeMAN2* (AF184238) y *LeMAN1* (AF017144) (A), *DfExpa1* y *DfExpa2* con *LeEXP4* (AF059488) y *LeEXP10* (AF184233) (B), *DfGA20-ox* fue alineada con GA 20 oxidasas de tomate (AF049898), lechuga (AB012204) y tabaco (AB012856) (C), y *GA3 $\beta$ -hy* fue alineada con GA 3 $\beta$ -hidroxilasas de tomate (AB010991), lechuga (AB012206) y *Arabidopsis* (AF070937) (D).

#### Análisis por Southern Blot

Para realizar una aproximación al número de copias de genes codificantes para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, presentes en el genoma de *D. ferox*, se llevó a cabo un ensayo de *Southern Blot* utilizando distintas enzimas de restricción. Se utilizaron como sondas los distintos fragmentos obtenidos por RT-PCR: *DfMan*, *DfExpa1/2* y *DfGA3 $\beta$ -hy*. Las sondas hibridaron con distintos fragmentos revelando la existencia de pequeñas familias de genes en el genoma de *D. ferox* para endo- $\beta$ -mananasas, expansinas y GA 3 $\beta$ -hidroxilasas (Fig. III. 4).





**Figura III. 4.** Análisis por *Southern Blot* del ADN genómico de *D. ferox* utilizando como sondas *DfMan* (A), *GA3β-hy* (B) y *DfExpal/2* (C). El ADN genómico de *D. ferox* (10 µg) fue digerido con distintas enzimas de restricción y posteriormente hibridado con *DfMan* (A), *GA3β-hy* (B) y *DfExpal/2* (C) como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

***Patrón de expresión y especificidad de tejido de DfMan, DfExpal, DfExpal/2, DfGA20-ox y DfGA3β-hy***

Se estudio el patrón de expresión y la especificidad de tejido en condiciones de pre- y post-emergencia de la radícula para *DfMan*, *DfExpal*, *DfExpal/2*, *DfGA20-ox* y *DfGA3β-hy*. Se realizaron ensayos de RT-PCR utilizando por un lado ARN total proveniente de embriones y endosperma, tanto micropilar como lateral, de semillas inducidas por un pulso de R, antes de que concluyera el proceso de germinación. Para analizar el patrón de expresión una vez concluida la germinación se extrajo ARN del endosperma completo y de plántulas provenientes de semillas recientemente germinadas (Fig. III. 2).

Previamente a la emergencia de la radícula se detectaron mensajeros de *DfGA20-ox* y *DfGA3β-hy* en embriones. Nunca se detectaron los mismos en el endosperma micropilar o lateral (Fig. III. 2). En el caso de *DfMan*, se observó expresión en la región del endosperma micropilar (Fig. III. 2). Los mensajeros para expansinas fueron detectados en embriones y en el endosperma micropilar previamente a que se completara la germinación (Fig. III. 2). Debido a las características del endosperma lateral, antes de la emergencia de la radícula, la extracción de ARN a partir de este tejido presentó una

eficiencia bajísima que escasamente permitió detectar mensajeros para actina, pero ningún otro transcripto.

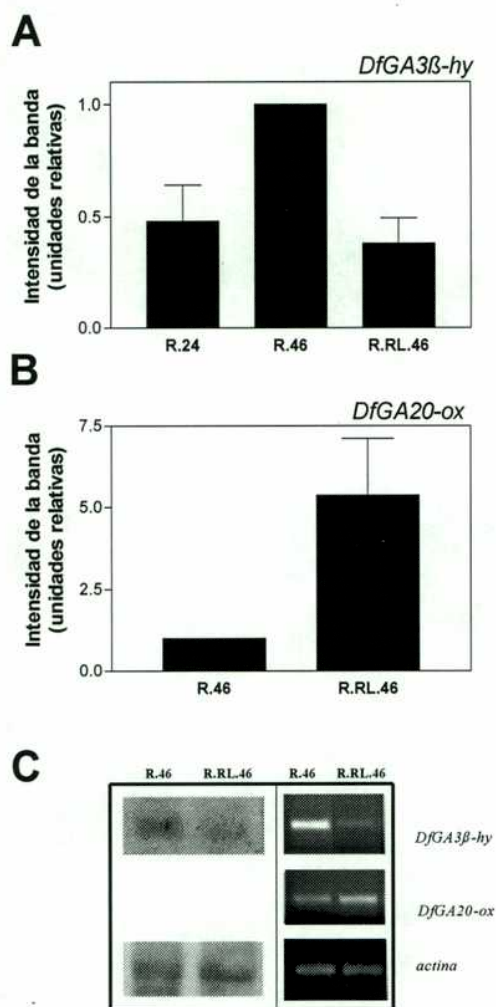
Posteriormente a la emergencia de la radícula, se analizaron los productos de amplificación generados por los distintos pares de *primers*. Utilizando los *primers* para amplificar mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa se detectó un fragmento del peso molecular correspondiente a *DfMan* en el endosperma total y también en plántulas. Se detectó también un fragmento del tamaño esperado para expansinas en plántulas, no observándose amplificación en el endosperma. Por último, únicamente en plántulas se obtuvieron productos de RT-PCR del tamaño correspondiente a mensajeros para GA 20 oxidasas y GA 3 $\alpha$ -hidroxilasas (Fig. III. 2). El patrón de expresión en su conjunto en la etapa de post-emergencia, para los distintos mensajeros estudiados, fue coherente con los resultados obtenidos en la etapa pre-germinativa.

***El nivel de los transcriptos de DfGA3 $\beta$ -hy aumenta cuando se promueve la germinación por una LFR mientras que el de DfGA20-ox disminuye***

La promoción por el fitocromo de la actividad de enzimas que degradan mananos, involucradas en el ablandamiento del endosperma de *D. ferox* requiere de la síntesis de GAs (Sánchez y de Miguel, 1997).

En semillas de *D. ferox* estimuladas por una LFR se estudió el comportamiento de los niveles de transcriptos de *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox*. Se encontró que en embriones, previamente a la emergencia de la radícula, los niveles de *DfGA3 $\beta$ -hy* aumentaban significativamente en semillas inducidas por R (Fig. III. 5 A (R.46)) en comparación con los observados en embriones provenientes de semillas control expuestas a un pulso de R seguido de RL (Fig. III. 5 A (R.RL.46)). 24 hs después del pulso de R, se detectó un nivel de acumulación de *DfGA3 $\beta$ -hy* menor al observado a las 46 hs (Fig. III. 5 A). Estos resultados fueron corroborados mediante un ensayo de *Northern Blot* donde se utilizó como sonda el fragmento obtenido por RT-PCR de *DfGA3 $\beta$ -hy* (Fig. III. 5 C)

El patrón de expresión de *DfGA20-ox* fue completamente distinto al obtenido para *DfGA3 $\beta$ -hy*. El nivel de los transcriptos de *DfGA20-ox* fue menor en embriones de semillas estimuladas por un pulso de R, que en aquellas que habían recibido R seguido de RL (Fig. III. 5 B).

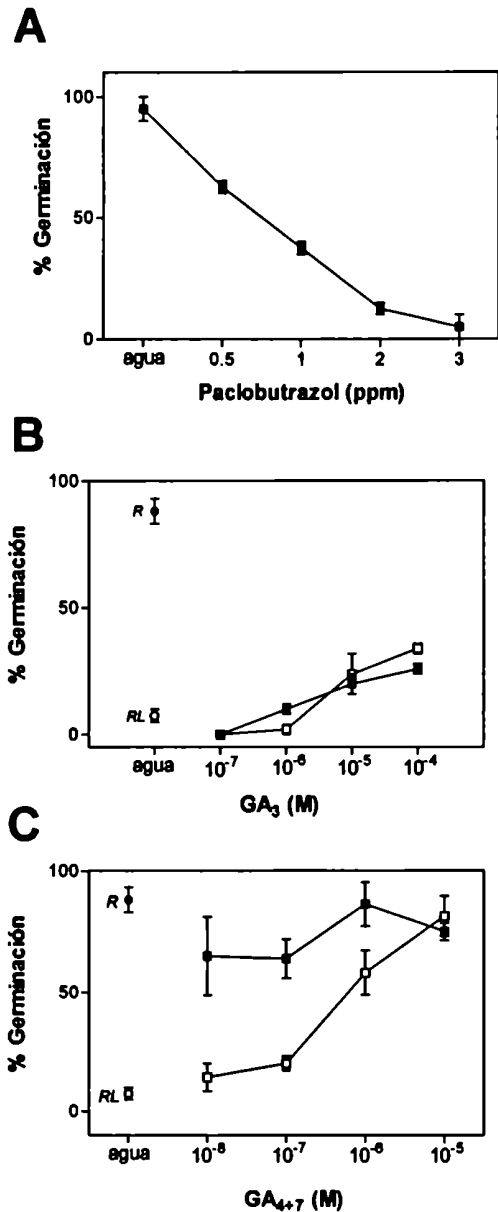


**Figura III. 5.** La LFR produce en embriones de *D. ferox* un aumento en el nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* y una disminución en los de *DfGA20-ox*. Las semillas fueron expuestas a un pulso de R o R seguido de RL y evaluado el nivel de los transcritos en embriones luego de 24 (R.24) y 46 hs (R.46 y R.RL.46) de incubación en oscuridad a 20-30 °C. Los resultados obtenidos para *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox* se muestran en la parte (A) y (B) de la figura, respectivamente. Los datos representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos realizados en forma independiente. En la parte (C) de la figura se muestra, a la derecha, un gel representativo teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos por RT-PCR, y a la izquierda, una autorradiografía de un ensayo por *Northern Blot* conteniendo 20  $\mu$ g de ARN total por calle donde fue utilizado como sonda el producto de RT-PCR *DfGA3 $\beta$ -hy* marcado con P<sup>32</sup>.

### ***La LFR produce un aumento en la sensibilidad de las semillas a las GAs exógenas***

La estimulación por el Pfr de la germinación podría deberse, al menos en parte, tanto a un aumento en los niveles endógenos de las GAs como es el caso de lechuga (Toyomasu *et al.*, 1993), como a un aumento en la sensibilidad de las semillas a las GAs como ocurre en *Arabidopsis* (Yang *et al.*, 1995).

Se estudió si en semillas de *D. ferox* se producía un cambio en la sensibilidad a las GAs relacionado con los niveles de Pfr. Primeramente, se procedió a determinar la concentración óptima para inhibir la germinación de un agente bloqueante de la síntesis de GAs, el paclobutrazol (Fig. III. 6 A). El cual actúa inhibiendo los primeros pasos de la vía de síntesis de las GAs (Izumi *et al.*, 1985). Las semillas que habían sido expuestas a un pulso de R, o de R seguido de RL, se incubaron en presencia de paclobutrazol en distintas concentraciones de GA<sub>3</sub> (Fig. III. 6 B) o GA<sub>4+7</sub> (Fig. III. 6 C). A las 72 hs se evaluó la respuesta germinativa. Aquellas semillas que habían recibido un pulso de R presentaron una sensibilidad significativamente mayor a GA<sub>4+7</sub> (de por lo menos dos ordenes de magnitud), comparadas con aquellas que habían recibido un pulso de R seguido de RL (Fig. III. 6 C). La efectividad de GA<sub>3</sub> en promover la germinación de las semillas tratadas con R y paclobutrazol fue muy reducida (Fig. III. 6 B), siendo el porcentaje de promoción de la germinación por GA<sub>3</sub> el mismo para semillas tratadas con un pulso de R o R seguido de RL (Fig. III. 6 B).



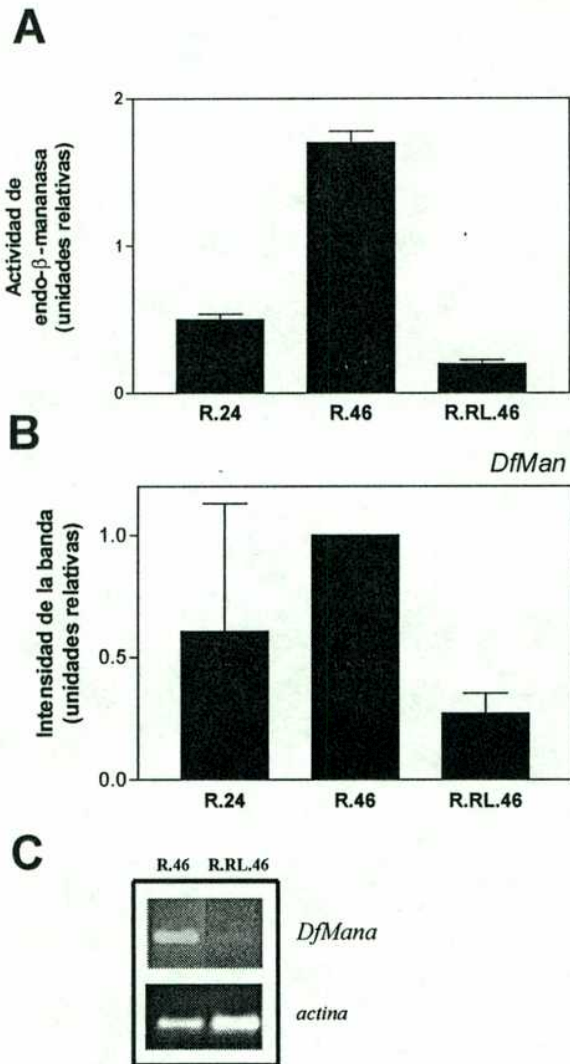
**Figura III. 6.** Inhibición por paclobutrazol de la germinación de semillas de *D. ferox* inducidas por R (A) y reversión de la misma por aplicación de GA<sub>3</sub> (B) GA<sub>4+7</sub> (C). Las semillas fueron expuestas a un pulso de R e incubadas en soluciones con distintas concentraciones de paclobutrazol (A). En (B) y (C) las semillas fueron expuestas a un pulso de R (símbolos llenos) o R seguido de RL (símbolos vacíos) e incubadas en soluciones conteniendo paclobutrazol 3 ppm y distintas concentraciones de GA<sub>3</sub> o GA<sub>4+7</sub>. Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 3 experimentos realizados en forma independiente.



***En respuesta a la LFR se produce un aumento en el nivel de los mensajeros de DfMan***

En semillas de *D. ferox* el ablandamiento del endosperma inducido por un pulso de R, o GAs, se encuentra relacionado con la hidrólisis de un manano  $\beta$ , I-4, principal componente de las paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1990) y el aumento de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997).

24 hs después del pulso de R, se observó un aumento en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa en el endosperma micropilar, que para las 46 hs fue significativamente mayor en semillas tratadas con un pulso de R, respecto a aquellas control que hablan recibido un pulso de R seguido de RL (Sánchez y de Miguel, 1997; Fig. III. 7 A). Se estudió entonces la posibilidad de que el incremento en la actividad endo- $\beta$ -mananasa estuviera relacionado con un aumento del nivel de mensajeros de *DfMan*, en respuesta al Pfr. En respuesta a un pulso de R, se observó un aumento significativo del nivel de transcritos de *DfMan* en el endosperma micropilar, previamente a la extrusión de la radícula. Este efecto del R, pudo ser revertido por un pulso de RL, dado inmediatamente después del pulso de R, mostrando la característica clásica del modo de acción LFR del fitocromo. A sólo 24 hs del pulso de R se encontró un nivel de mensajeros de *DfMan* variable, menor o igual al observado a las 46 hs (Fig. III. 7 B). Los efectos observados de la LFR sobre el nivel de los mensajeros de *DfMan* concuerdan con los datos de actividad de esta enzima y los valores de germinación.

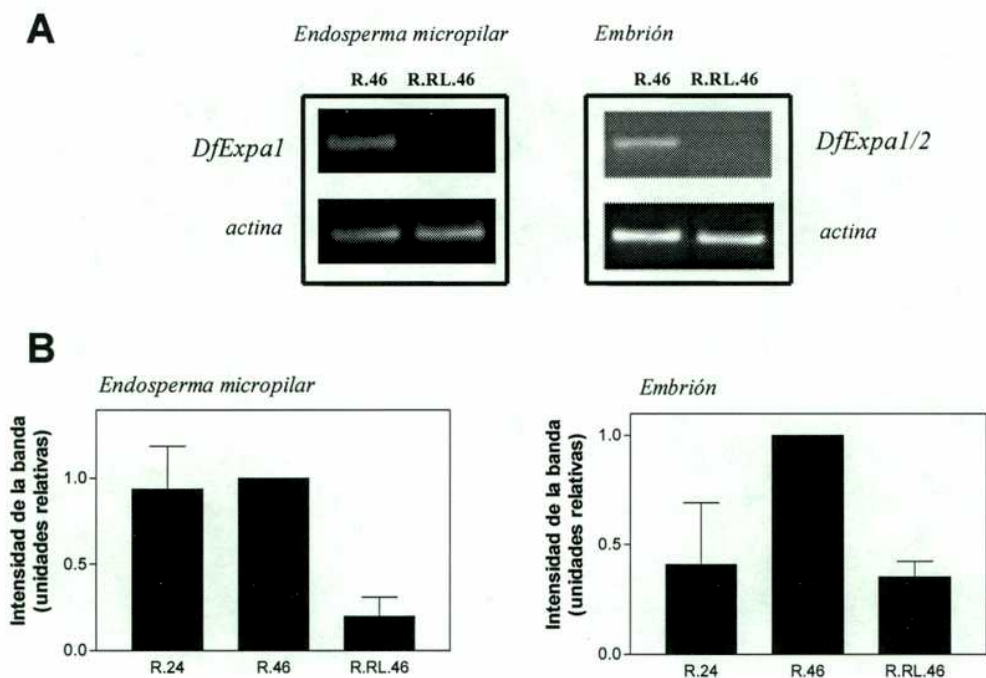


**Figura III. 7. Aumento del nivel de mensajeros de *DfMan* en el endosperma micropilar en respuesta a la LFR.** La actividad de endo-β-mananasa (**A**) y el nivel de mensajeros de *DfMan* (**B**) fueron evaluados en semillas que habían sido expuestas a un pulso de R o R seguido de R, luego de 24 (R.24) y 46 hs (R.46 y R.RL.46) de incubación en oscuridad a 20-30 °C. Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos realizados en forma independiente. En la parte (**C**) de la figura se muestra un gel representativo teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos por RT-PCR. Un fragmento del mensajero para actina fue amplificado como control interno.

***La LFR produce un aumento en el nivel de mensajeros para expansinas tanto en el embrión como en el endosperma micropilar***

Se ha propuesto que las expansinas estarían involucradas en el crecimiento de tejidos mediando procesos de expansión celular, así como también en el ablandamiento otros que no se encuentran en crecimiento, como ocurre durante la maduración de los frutos (Cosgrove, 1998). Estas proteínas podrían desempeñar un papel importante durante la germinación interviniendo tanto en el crecimiento del eje embrionario, como en el ablandamiento de los tejidos que circundan al embrión.

En semillas de *D. ferox* estimuladas por un pulso de R, previamente a la extrusión de la radícula (46 hs), se detectó un aumento significativo del nivel de transcritos para expansinas en el endosperma micropilar y en el embrión, comparado con los observados en semillas control que habían recibido un pulso de R seguido de RL (Fig. III. 8). En el caso del endosperma micropilar, el nivel de acumulación de mensajeros para estas proteínas fue a las 24 hs tan alto como el observado a las 46 hs luego de la exposición de las semillas al R (Fig. III. 8), en forma coherente con el aumento de *DfMan* (Fig. III. 7) y el posible papel de estas proteínas en el proceso de ablandamiento.



**Figura III. 8.** La LFR produce un aumento en el nivel de mensajeros para expansinas tanto en el embrión como en el endosperma micropilar. Las semillas fueron expuestas a un pulso de R o R seguido de RL y evaluado el nivel de los transcritos para expansinas luego de 24 (R.24) y 46 hs (R.46 y R.RL.46) de incubación en oscuridad a 20-30 °C. En (A) se muestra un gel representativo teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos por RT-PCR. Un fragmento del mensajero para actina fue amplificado como control interno. En (B) los datos de los histogramas representan las medias y el error estándar de 4-5 experimentos realizados en forma independiente.

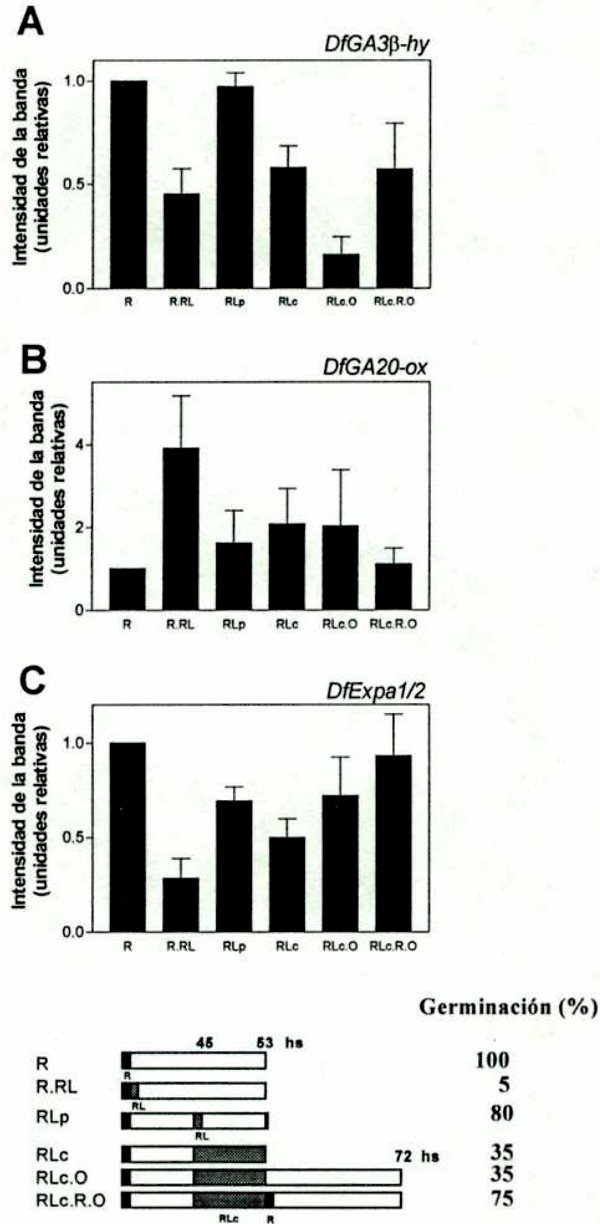
***La inhibición de la germinación por RLc se encuentra asociada al descenso del nivel de mensajeros de DfGA3β-hy***

Se investigó la posibilidad de que el antagonismo entre la HIR y la LFR se encontrara relacionado con alteraciones en el nivel de transcritos de *DfGA3β-hy*., de existir un efecto de la HIR sobre los mensajeros de *DfGA3β-hy*, los niveles endógenos de GAs podrían descender, afectando la expresión de *DfMan*, *DfExpal* y *DfExpal/2*.

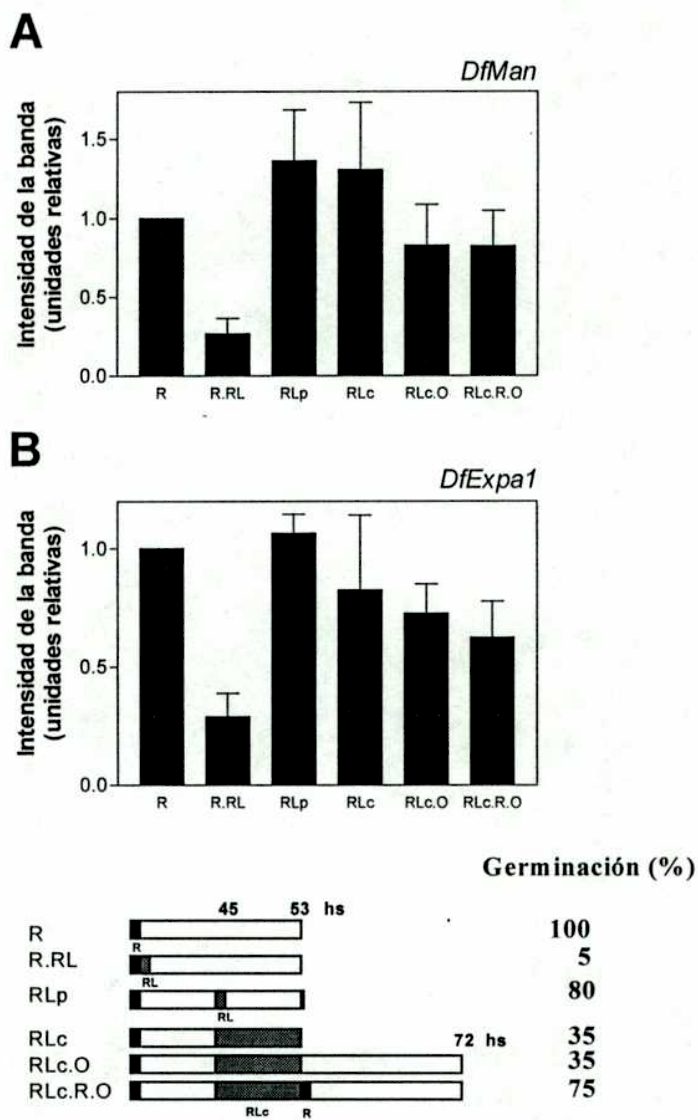
Eventualmente, los niveles de *DfGA20-ox* podrían también verse afectados, como consecuencia de la regulación dentro de la vía de síntesis de las GAs.

Bajo tratamientos de luz que conducen a una HIR, se observó que el nivel de los transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy* siguió un patrón similar al de la germinación (Fig. III. 9 A, Capítulo II, Fig. 1). Un pulso de RL dado 45 hs después del pulso inductivo de R, no afectó la acumulación de los transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy*, mientras que una exposición de 6 hs a RLc resultó en una reducción significativa de los mismos. La caída en el nivel de transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy* continuó profundizándose cuando al finalizar el tratamiento de RLc las semillas fueron incubadas en oscuridad, alcanzando valores similares a los observados en semillas control, que habían recibido un pulso inicial de R seguido de RL (Fig. III. 9 A). Un segundo pulso de R dado al término de del RLc, produjo un nuevo aumento en el nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* (Fig. III. 9 A). Estos resultados muestran que el antagonismo entre la LFR y la HIR controla en embriones los niveles de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* en forma coherente con su efecto sobre en la germinación.

Por otro lado, los niveles de acumulación de mensajeros de *DfGA20-ox* y *DfExpa1/2* en el embrión, y los de *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar, no se vieron afectados por el tratamiento con RLc (Fig. III. 9 B, C; y 10 A , B).



**Figura III. 9.** Efecto del RLc sobre el nivel de mensajeros de *GA3 $\beta$ -hy*, *DfGA20-ox* y *DfExpa1/2* en embriones de semillas de *D. ferox* inducidas por una LFR. El nivel de los distintos transcritos fue evaluado en embriones de semillas de *D. ferox* al término de los distintos tratamientos de luz que se esquematizan al pie de la figura. Los resultados obtenidos para *DfGA3 $\beta$ -hy*, *DfGA20-ox* y *DfExpa1/2* se muestran en las partes (A), (B) y (C), respectivamente. Los datos presentados en los histogramas representan las medias y el error estándar de 4 experimentos realizados en forma independiente.



**Figura III. 10.** Efecto del RLc sobre el nivel de mensajeros de *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar de semillas de *D. ferox* inducidas por una LFR. Los datos que se muestran en los histogramas fueron obtenidos como se describe en la figura 9. Los resultados obtenidos *DfMan* y *DfExpa1* se muestran en las partes (A) y (B), respectivamente. Los datos presentados en los histogramas representan las medias y el error estándar de 4 experimentos realizados en forma independiente.



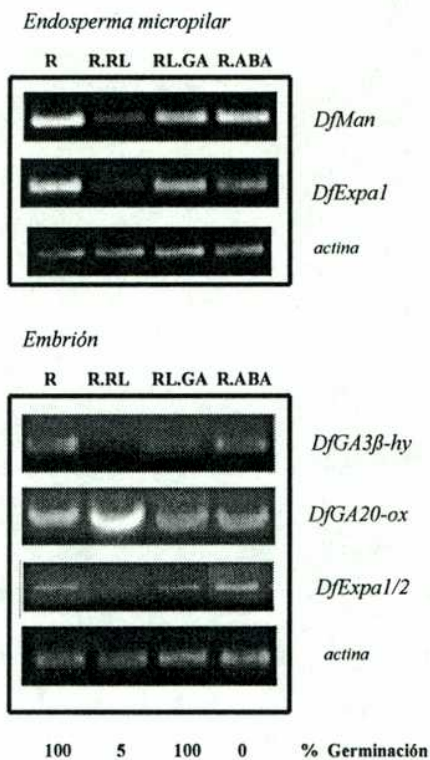
### ***Regulación de DfMan, DfExpal, DfExpal/2, DfGA20-ox y DfGA3β-hy por ABA y GAs***

La inhibición y la promoción de la germinación de semillas por la aplicación de ABA y GAs, respectivamente, son respuestas ampliamente documentadas (Bewley y Black, 1994). A pesar de lo cual, los mecanismos moleculares que subyacen a los efectos de estas hormonas aún son inciertos. El clonado de algunos de los genes, involucrados en la vía de síntesis de las GAs, en lechuga y *Arabidopsis*, ha posibilitado el estudio de parte de esos mecanismos (Kamiya y García-Martínez, 1999). Sin embargo, en estos sistemas experimentales no se ha estudiado el efecto del ABA y las GAs sobre sus presuntos genes blanco, involucrados en el proceso del germinativo.

En semillas de *D. ferox* tratadas con RL, la aplicación exógena de GAs ( $GA_{4+7}$   $10^{-6}$  M) estimuló la germinación hasta alcanzar valores de germinación comparables a semillas tratadas con un pulso de R (100 %) (Fig. III. 11). En estas semillas la acumulación de los transcritos de *DfGA3β-hy*, *DfGA20-ox*, *DfMan*, *DfExpal* y *DfExpal/2*, fue muy semejante a la observada en embriones y en el endosperma micropilar de semillas estimuladas por un pulso de R e incubadas en agua (Fig. III. 11).

El efecto del ABA fue ensayado en semillas tratadas con un pulso de R. La inducción de la germinación por un pulso de R, fue completamente bloqueada por la aplicación de ABA  $10^{-4}$  M (Fig. III. 11). Sin embargo, en estas semillas no se encontraron diferencias significativas en la abundancia de los transcritos de *DfGA3β-hy*, *DfGA20-ox*, *DfMan*, *DfExpal* y *DfExpal/2*, en comparación a los observados en semillas control tratadas únicamente con un pulso de R (Fig. III. 11).



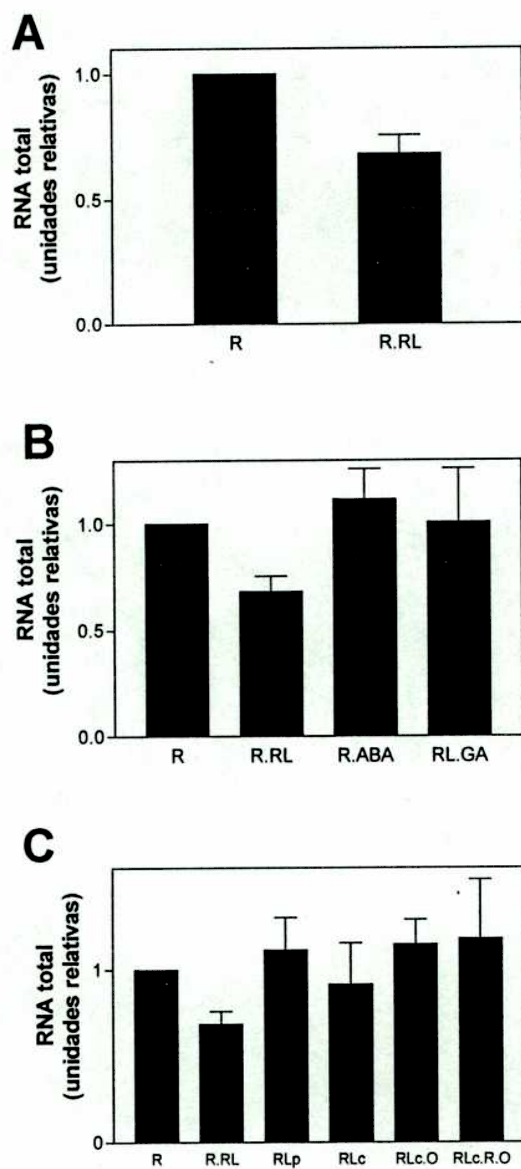


**Figura III. 11.** Efecto del ABA y las GAs sobre los niveles de mensajeros de *DfMan*, *DfExpa1*, *DfExpa1/2*, *DfGA20-ox* y *DfGA3β-hy*. El nivel de los distintos transcritos fue evaluado en la región del endosperma micropilar y en embriones de semillas de *D. ferox* expuestas a un pulso de R e incubadas en ABA  $10^{-4}$  M (R.ABA) o expuestas a un pulso de RL e incubadas en  $10^{-6}$  M GAs ( $GA_{4+7}$ ) (RL.GAs). Todas las semillas fueron incubadas en oscuridad durante 46 hs (20-30 °C) antes de realizar la toma de muestras. En la figura se muestra un gel representativo teñido con bromuro de etidio de los productos obtenidos por RT-PCR. Un fragmento del mensajero para actina fue amplificado como control interno.

#### **Contenido de ARN total en embriones de semillas de *D. ferox***

Se analizaron las cantidades de ARN total, extraídas de embriones bajo los distintos tratamientos realizados. Al comparar las cantidades de ARN obtenidas a partir de embriones provenientes de semillas tratadas con un pulso de R, o R seguido de RL, se observó que en estas últimas la cantidad de RNA total fue significativamente menor, aproximadamente un 75 % que la obtenida en semillas tratadas con un pulso de R (Fig. III. 12 A). Sin embargo, en otros tratamientos inhibitorios de la germinación (ABA y

RLc) no se observó relación entre la cantidad de ARN extraída y los valores de germinación obtenidos (Fig. III. 12 B, C).



**Figura III. 12. Contenido de ARN en embriones de *D. ferox* bajo distintos tratamientos.** Los valores de la figura fueron obtenidos por cuantificación espectrofotométrica del ARN extraído de embriones provenientes de semillas de *D. ferox* expuestas a un pulso de R, o R seguido de RL, e incubadas en oscuridad 46 hs (R.46 y R.RL.46) (A), tratadas con R y ABA o RL y GAs como se describe en la figura 11

(B), y bajo tratamientos de luz conducentes a una HIR como se describe en la figura 10 (C). Los datos presentados en los histogramas representan las medias y el error estándar de 12 experimentos realizados en forma independiente en (A) y 4 en (B) y (C).

## DISCUSIÓN

### *Inducción de la germinación por una LFR: Pfr y giberelinas*

En semillas cuyo embrión se encuentra rodeado por un endosperma rígido la germinación se encuentra precedida por profundos cambios en la región del endosperma que se opone a la radícula (Bewley, 1997). Las modificaciones de este ejido, son de particular importancia debido a su relación con la disminución de la resistencia mecánica del mismo, permitiendo así la extrusión de la radícula. La promoción de la germinación de semillas de *D. ferox* por el fitocromo, a través de una LFR, se encuentra asociada a la hidrólisis del principal componente de las paredes celulares del endosperma: un manano  $\beta$ , 1-4 (Sánchez *et al.*, 1990), y al aumento de la actividad de enzimas hidrolíticas, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997). En tomate, durante la germinación también se ha observado un incremento de la actividad endo- $\beta$ -mananasa en el endosperma micropilar previamente a la extrusión de la radícula (Bewley, 1997).

El aumento de la actividad de enzimas que degradan mananos en el endosperma micropilar en *D. ferox* y en tomate, es dependiente de la síntesis de GAs en el embrión (Groot *et al.*, 1988; Sánchez y de Miguel, 1997), la cual puede ser remplazada por la aplicación de GAs exógenas, incluso a porciones aisladas de endosperma micropilar en *D. ferox* (Sánchez y de Miguel, 1997). Estos datos han llevado a proponer que ciertos factores promotores de la germinación, como la luz, actuarían estimulando la síntesis de GAs en el embrión y/o aumentando la sensibilidad de respuesta a las mismas. Una vez en el endosperma, las GAs podrían promover tanto la síntesis de *novo*, como la actividad de enzimas pre-existentes involucradas en el ablandamiento de este tejido. Dentro de la literatura existen evidencias que apoyan parte de esta hipótesis. En lechuga, la exposición de las semillas al R resulta en un aumento de los niveles de GA<sub>1</sub> (Toyomasu *et al.*, 1993) y de los transcriptos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, *Ls3h1* (Toyomasu *et al.*, 1998).

Aparentemente en estas semillas no se producen cambios en la sensibilidad a las GAs en respuesta al Pfr (Toyomasu *et al.*, 1998). En *Arabidopsis*, durante la germinación inducida por R, se observa un aumento de los mensajeros de dos genes que codifican para GA 3 $\beta$ -hidroxilasas, *GAA* y *GA4H* (Yamaguchi, *et al.*, 1998). El aumento en respuesta al R de los transcritos de *Ls3h1* y *GA4H*, puede ser revertido por RL (Toyomasu *et al.*, 1998; Yamaguchi, *et al.*, 1998). La expresión de *GA4H* se encuentra mediada por el fitocromo B, mientras que otros fitocromos serían los responsables de la inducción de *GAA* (Yamaguchi, *et al.*, 1998). Por otro lado, en *Arabidopsis* se ha observado un aumento en la sensibilidad, de la respuesta germinativa de las semillas a las GAs, mediado por fitocromos (Yang *et al.*, 1995).

En *D. ferox* el aumento de los niveles de *DfGA3 $\beta$ -hy* en respuesta a la LFR (Fig. III. 5 A) es absolutamente consistente con los datos presentes en la literatura. Además, los resultados presentados en este capítulo muestran que *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox* se expresan exclusivamente en el embrión durante la germinación (Fig. III. 2), lo cual apoya fuertemente la hipótesis de que las GAs son sintetizadas en ese tejido y luego movilizadas al endosperma.

En contraposición a lo que ocurre para *DfGA3 $\beta$ -hy*, un pulso de R produce una disminución del nivel de mensajeros de *DfGA20-ox*, lo cual también se ha observado en semillas de lechuga para *Ls20ox2* (Toyomasu *et al.*, 1998). Es posible que esta reducción sea el resultado de una regulación negativa sobre el nivel de transcritos de este gen, como consecuencia del aumento en el contenido de GAs. La disminución de la acumulación de mensajeros de *DfGA20-ox* en semillas tratadas con R, o con RL y GAs refuerza esta hipótesis (Fig. III. 11), si bien no puede excluirse otro tipo de acción del Pfr sobre este gen.

Cabe destacar, que en semillas de *D. ferox* inducidas por R, el Pfr no solo actúa sobre la vía de síntesis de GAs, sino también aumentando la sensibilidad de las semillas a las mismas (Fig. III. 6 C). Los posibles blancos de las GAs producidas en el embrión serían aquellos procesos que llevan en el endosperma micropilar a una drástica reducción de la resistencia mecánica y en el embrión a un aumento del potencial de crecimiento del mismo.

### ***Ablandamiento del endosperma: endo- $\beta$ -mananasa y expansinas***

En el endosperma de *D. ferox* la degradación de los mananos se ha encontrado estrechamente relacionada al ablandamiento y al aumento de actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1992; Sánchez y de Miguel, 1997; Sánchez *et al.*, 1990). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que otros procesos estén involucrados en el desarrollo de las condiciones necesarias para la emergencia de la radícula. Las expansinas se encuentran entre las proteínas de pared que podrían estar desempeñando un papel importante en el proceso de reducción de la resistencia mecánica del endosperma. Se ha sugerido que estas proteínas podrían aumentar la accesibilidad de los polímeros de la pared a la acción enzimática, acelerando así la hidrólisis de las paredes celulares (Cosgrove, 1998).

En el endosperma micropilar de semillas de *D. ferox* se observa un aumento significativo de la acumulación de los transcritos de *DfMan* y *DfExpal* en respuesta al R, que puede ser revertido por RL (Fig. III. 7 B y 8), indicando la regulación del nivel de estos mensajeros por una LFR. El aumento del nivel de mensajeros para expansinas en forma coherente con la acumulación de transcritos de *DfMan*, incluso antes de que el ablandamiento del endosperma pueda ser percibido (24 hs), apoya la hipótesis de una posible “acción conjunta” entre expansinas y endo- $\beta$ -mananasa, promoviendo el ablandamiento del endosperma micropilar (Cosgrove, 1998). El nivel de acumulación de estos mensajeros se encuentra relacionado con la actividad endo- $\beta$ -mananasa, el ablandamiento del endosperma y la germinación de *D. ferox* (Sánchez y de Miguel, 1992; Sánchez y de Miguel, 1997).

Dos trabajos realizados en tomate, publicados poco después de que fueran comunicados los resultados del presente capítulo en la reunión anual de la *American Society of Plant Physiologists* (Burgin *et al.*, 2000; Mella *et al.*, 2000), muestran que en la germinación de semillas wt en oscuridad, o *gib-1* por GAs se produce en el endosperma micropilar un aumento en la acumulación de mensajeros para una endo- $\beta$ -mananasa, *LeMAN2* (Nonogaki *et al.*, 2000) y una expansina, *LeEXP4* (Chen y Bradford, 2000). En tomate la imbibición de las semillas wt bajo RLc bloquea la germinación y la acumulación de *LeEXP4* (Chen y Bradford, 2000), lamentablemente en ese experimento no se incluyeron los controles necesarios para determinar que tipo de respuesta, LFR o

HIR, se encuentra involucrada en la inhibición observada. Los resultados del presente capítulo conforman en el primer reporte de la acción de una LFR sobre los niveles de mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, en la germinación de semillas.

#### ***Potencial de crecimiento del embrión: expansinas***

Otro posible papel para las expansinas en la germinación se encuentra relacionado con el potencial de crecimiento del eje embrionario (Cosgrove, 2000a; Cosgrove, 1998). Durante la elaboración de esta tesis, fue publicado un trabajo en el cual se muestra la acumulación en embriones de mensajeros para dos tipos de expansinas, *LeEXP8* y *LeEXP10*, durante la germinación de semillas de tomate wt en oscuridad, o *gib-1* inducidas por GAs (Chen *et al.*, 2001). De acuerdo a la localización de la expresión, *LeEXP8* parecería estar involucrada en la elongación de la radícula, mientras que *LeEXP10*, tendría un papel más general en el crecimiento del embrión (Chen *et al.*, 2001). En embriones de *D. ferox*, el nivel de los mensajeros para expansinas aumenta en respuesta al R, mediante una LFR, y también por la aplicación de GAs (Fig. III. 8 y 11), de acuerdo con el aumento observado en el potencial de crecimiento del embrión (Sánchez y de Miguel, 1992). Estos resultados sugieren la posibilidad de que en respuesta a una LFR se produzca en los embriones un aumento en los niveles de expansinas, como resultado del aumento en el nivel de sus mensajeros, probablemente mediado por GAs, promoviendo el potencial de crecimiento del eje embrionario.

#### ***Inhibición de la germinación inducida por R: ABA y HIR***

La inducción de la germinación de *D. ferox* por R puede ser bloqueada por la aplicación de ABA, el cual disminuye drásticamente el potencial de crecimiento del embrión (Sánchez y de Miguel, 1992) sin afectar el ablandamiento del endosperma, ni la actividad de las enzimas que hidrolizan los mananos (de Miguel *et al.*, 1999). Sin embargo, la aplicación de este inhibidor no tiene ningún efecto sobre los niveles de mensajeros para expansinas en el embrión (Fig. III. 8). Descartando así a estas proteínas, como posibles blancos de la inhibición por ABA en la germinación de *D. ferox*. La presencia de ABA, durante la germinación de semillas de tomate en oscuridad, no inhibe en embriones la acumulación inicial de mensajeros para expansinas, *LeEXP8* y *LeEXP10*,

mientras que la incubación prolongada de las semillas bajo esas condiciones finalmente tiene un efecto negativo sobre la abundancia de estos mensajeros (Chen *et al.*, 2001). Cabe destacar, que en ese trabajo el efecto del ABA sobre la acumulación de mensajeros para expansinas se observa a tiempos en los cuales las semillas control han completado y sobrepasado la germinación largamente. No pudiéndose considerar entonces ese proceso como blanco de la acción del ABA en la inhibición de la germinación de semillas de tomate.

La aplicación de ABA tampoco afecta el nivel de los transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy*, ni el de *DfGA20-ox* (Fig. III. 11). De acuerdo con la ausencia de efecto del ABA sobre ablandamiento del endosperma, tampoco se observa efecto alguno de este regulador sobre la acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpal* (Fig. III. 11), de forma semejante a lo que ocurre en tomate (Chen y Bradford, 2000; Nonogaki *et al.*, 2000).

La inducción de la germinación en *D. ferox* por una LFR puede ser antagonizada por una HIR (Capítulo II). El efecto inhibitorio del RLc puede observarse aún cuando este tratamiento comienza 45 hs después del pulso inductor de R (Capítulo II, Fig. 1). Es decir, para cuando en el endosperma micropilar y en el embrión, ya han ocurrido profundos cambios en dirección de la inducción de la germinación.

Por un lado, la HIR produce en embriones una disminución significativa en el nivel de los mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* (Fig. III. 9 A), que se observa al finalizar el tratamiento con RLc y luego continua profundizándose al incubar las semillas tratadas con RLc en oscuridad. Estos datos sugieren que la HIR podría determinar una reducción en la síntesis de GAs biológicamente activas. Un segundo pulso de R, al término del RLc, determina un nuevo incremento del nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* (Fig. III. 9 A), mostrando la reversibilidad de la inhibición causada por el RLc y la persistencia del antagonismo LFR-HIR. Este es el primer reporte de un antagonismo LFR-HIR regulando la expresión de genes, en este caso *DfGA3 $\beta$ -hy*. Sin embargo, aún si la síntesis de GAs se viera afectada por la HIR a través de la disminución del nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy*, aparentemente el contenido de GAs no se reduce lo suficiente como para afectar el nivel de transcritos para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas (Fig. III. 9 C y 10). El hecho de que el nivel de mensajeros de *DfGA20-ox* no aumente con la HIR (Fig. III. 9 B) apoya esta hipótesis. No se puede descartar la posibilidad de que el posible descenso en los

niveles de GAs, como consecuencia de la HIR, pudiera determinar a largo plazo una reducción en la abundancia de los distintos mensajeros analizados.

Por otro lado, la HIR produce una reducción significativa en la actividad endo- $\beta$ -mananasa (Capítulo II, Fig. 4), que no ve reflejada en la abundancia de los mensajeros para esta enzima (Fig. III. 7). Estos resultados sugieren, que la reducción en la actividad endo- $\beta$ -mananasa, como consecuencia de los efectos de la HIR, ocurriría sobre algún proceso posterior e independiente al establecimiento del nivel de sus mensajeros. Suponiendo que las expansinas actuaran en el endosperma micropilar aumentando la accesibilidad a los sustratos (polímeros de la pared) de las hidrolasas (Cosgrove, 1998), entonces la inhibición de estas últimas (como es el caso de endo- $\beta$ -mananasa) sería suficiente para bloquear el proceso de ablandamiento del endosperma independientemente de la acción de las expansinas.

En la HIR de *D. ferox* no se producen cambios en el potencial de crecimiento del embrión (Capítulo II, Fig. 5). Consecuentemente con el posible papel de las expansinas dentro de este proceso, no se observan cambios en el nivel de transcritos para las mismas bajo tratamientos conducentes a una HIR (Fig. III. 9).

La existencia en la literatura de datos sobre la reducción de la sensibilidad de la respuesta germinativa, como consecuencia de irradiaciones prolongadas de RLc, a un posterior pulso de R y a las GAs (Frankland y Taylorson, 1983), conjuntamente con los resultados descritos en el presente capítulo, indican la existencia de otros blancos de la acción de estas hormonas y/o de la HIR desconocidos en la actualidad, como podrían ser factores involucrados en determinar la sensibilidad de las semillas tanto a la luz, como a las GAs.

### ***Modelo propuesto, LFR-HIR***

El mecanismo molecular por el cual las semillas de *D. ferox* germinan en respuesta a la luz involucraría el aumento de la síntesis de GAs. Durante la imbibición en oscuridad aumenta en embriones el nivel de mensajeros para GA 20 oxidasa, lo que determinaría un aumento en el nivel de precursores de las GAs bioactivas. Luego, el tratamiento con R convierte el Pr en Pfr. En respuesta al Pfr se produce en embriones, por un lado, un incremento en el nivel de los transcritos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, el cual



resultaría a su vez en un incremento del contenido de GAs bioactivas, y por otro lado, un aumento en la sensibilidad de las semillas a las GAs. Una vez en el endosperma micropilar, las GAs promueven el ablandamiento de este tejido como resultado, al menos en parte, del aumento en actividad de hidrolasas de pared y posiblemente expansinas, como consecuencia del incremento en el nivel de mensajeros de *DfMan* y *DfExpal*. En el embrión, las GAs promueven el aumento del potencial de crecimiento, proceso que estaría relacionado con la acumulación de transcritos de expansinas.

El blanco de la inhibición de la germinación por una HIR es a nivel fisiológico el proceso de ablandamiento del endosperma. Detectándose como consecuencia de la HIR una fuerte disminución en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, que no se encuentra relacionada con el nivel de mensajeros para esta enzima. Sugiriendo así, la existencia de un control de la HIR sobre la actividad de esta enzima posterior al establecimiento del nivel de sus mensajeros. En la inhibición de la germinación por una HIR se observa también una correspondencia entre el nivel de acumulación de transcritos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa y los valores de germinación. Estos resultados indican la existencia de otros blancos desconocidos de la acción de las GAs y de la HIR, como podrían ser factores que determinen la sensibilidad a estos estímulos.

Parece entonces que tanto en la inducción por una LFR, como en la inhibición de la germinación por una HIR no existe un control central, ni una cadena lineal de eventos, sino una red compleja de interacciones a distintos niveles cuya integración da como resultado la inducción o la inhibición de la germinación.

## Capítulo IV

***Estudio de la acción antagónica de los modos de acción VLFR y HIR, en semillas de Datura ferox, sobre el nivel de transcritos de algunos genes relacionados con la germinación***

## INTRODUCCIÓN

Las semillas de malezas generalmente caen al suelo cuando alcanzan la madurez, pudiendo quedar enterradas, por el uso de implementos de labranza, o bien sobre la superficie bajo canopeos. Durante su permanencia en el suelo, el nivel de dormición de las semillas va reduciéndose gradualmente, ampliando el rango de condiciones donde estas son capaces de germinar. El conjunto de los procesos asociados a la pérdida gradual de la dormición se conoce como “post-maduración” y depende de las condiciones de humedad, temperatura y ambiente gaseoso que rodea a las semillas. Luego de transcurrido cierto tiempo de post-maduración, en muchas especies, aún una proporción importante de las semillas requiere luz para germinar. La luz actúa como factor terminador de la dormición y/o inductor de la germinación (Benech-Arnold R L, 2000; Sauer y Struik, 1964; Wesson y Wareing, 1969 a y b).

La germinación de semillas que quedan bajo un canopeo (un ambiente rico en RL), puede ser estimulada por la luz a través de una respuesta de tipo LFR, cuando se generan claros en la vegetación, es decir, por una alta relación R/RL (Botto *et al.*, 1995; Casal y Sánchez, 1998). La inhibición de la germinación bajo la luz de un canopeo puede deberse: a la reversión de la inducción de una LFR (debida a bajos niveles de Pfr), o a la inhibición por una HIR de la germinación inducida tanto por una LFR, como por una VLFR (Casal y Sánchez, 1998).

El laboreo de campos agrícolas puede determinar el entierro de una importante proporción de semillas de malezas. Luego de transcurrido cierto tiempo de permanencia en el suelo, la germinación de algunas especies puede ser estimulada por bajísimos flujos de luz (Benech-Arnold R L, 2000). Esta sensibilidad extrema a la luz, permite que las semillas sean capaces de germinar cuando son expuestas muy brevemente a este estímulo, durante las labranzas, como es el caso de *D. ferox* (Scopel *et al.*, 1991). En algunas especies, la sensibilidad a la luz puede manifestar cambios estacionales (Derkx y Karssen, 1993). La adquisición de una muy alta sensibilidad a la luz también puede ser alcanzada mediante pre-tratamientos de laboratorio, tales como frío (VanDerWoude, 1985; VanDerWoude y Toole, 1980), calor, o cambios de temperaturas (Cone *et al.*, 1985). La germinación de semillas altamente sensibles puede ser inducida, en condiciones de laboratorio, por muy bajos flujos de la luz e incluso la respuesta puede ser saturada por un pulso de RL, de modo

que no se observa reversión por RL (Casal y Sánchez, 1998; Casal *et al.*, 1998). A este tipo de respuestas a la luz, se denominan VLFRs, por *Very Low fluence Responses*. Las VLFRs se encuentran mediadas por el PHYA en su forma activa, Pfr<sub>A</sub> (Botto *et al.*, 1998; Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996).

El mecanismo de la inducción de la germinación por una VLFR, así como las causas de la reducción de los niveles de dormición y del aumento en la sensibilidad a la luz, son procesos prácticamente desconocidos. Considerando que la inducción de la germinación en la LFR se encuentra mediada por el PHYB/E (Botto *et al.*, 1995; Hennig *et al.*, 2002); mientras que en la promoción de la germinación por una VLFR, es el PHYA el fitocromo involucrado (Botto *et al.*, 1998; Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996), los caminos de transducción desencadenados por de los mismos, que culminan en la germinación, bien podrían no ser idénticos. De la misma manera, cabe preguntarse si los procesos blanco de la VLFR y su regulación, son los mismos, o no, que para la LFR.

Irradiaciones prolongadas con RL (RLc) inhiben la germinación de muchas semillas, sin embargo, en casi todos los casos, se desconoce bajo que modo de acción del sistema de los fitocromos se produce esta inhibición (Casal y Sánchez, 1998). En el caso de *D. ferox*, la germinación inducida por una LFR puede ser inhibida por RLc, con las características correspondientes a una respuesta de tipo HIR (Capítulo II). Muy recientemente, se ha demostrado utilizando mutantes de tomate, que el fitocromo que media la inhibición de la germinación de semillas, vía una HIR, es el PHYA (Shichijo *et al.*, 2001). En el caso de la inducción de la germinación por una VLFR, no se ha descrito si esta puede ser antagonizada, o no, por una HIR.

La germinación, y en particular la de *D. ferox*, brinda una oportunidad muy interesante para el estudio de los procesos desencadenados por los modos de acción del PHYA, ya que podría ser tanto inducida (VLFR) como inhibida (HIR) por el mismo. Cabe destacar, que pese al gran desarrollo de *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental, lamentablemente hasta el momento, no se ha observado en este sistema inhibición de la germinación por una HIR. Si a esta característica se suma la imposibilidad de realizar muchos de los estudios fisiológicos y las dificultades asociadas al tamaño y estructura de las semillas de esta especie, queda claro que este sistema no es propicio para alcanzar los objetivos de esta tesis.

En este capítulo se estudian a nivel fisiológico, bioquímico y molecular los mecanismos involucrados en la reducción de la dormición y la inducción de la germinación por una VLFR en semillas de *D. ferox*. Se analizan los efectos de la VLFR sobre el potencial de crecimiento del embrión y el ablandamiento del endosperma, así como sobre la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa. A nivel molecular, se estudia el efecto de la VLFR sobre los niveles de acumulación de transcritos para GA 20 oxidasa y GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, enzimas claves de la vía de síntesis de las GAs, y el nivel de mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas. Se estudia la presencia de un antagonismo VLFR-HIR sobre la germinación, y sus efectos sobre todas las respuestas anteriormente mencionadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Origen de las semillas y condiciones de incubación*

Las semillas de *D. ferox* fueron colectadas de plantas que invadían cultivos de soja en Junín, provincia de Buenos Aires. Las semillas fueron almacenadas en frascos oscuros de vidrio a temperatura ambiente.

Para inducir una muy alta sensibilidad a la luz, las semillas fueron pre-incubadas en una atmósfera saturada con vapor de agua a 25 °C, en absoluta oscuridad entre 10 y 12 días. A este pre-tratamiento se lo denominó *fase vapor*.

Después del pre-tratamiento de fase vapor las semillas fueron colocadas sobre un algodón saturado con agua destilada, en cajas de plástico transparente en absoluta oscuridad y expuestas a los distintos tratamientos de luz. Luego, las cajas fueron envueltas en hojas plástico negro e incubadas en oscuridad en ciclos de temperaturas alternadas, 9 hs 30 °C y 15 hs 20 °C. Los tratamientos de luz prolongados fueron realizados bajo estos mismos ciclos de temperaturas alternadas. Las cubiertas de las semillas fueron removidas bajo luz blanca, e inmediatamente fueron colectadas las muestras.

### *Fuentes y tratamientos de luz*

La fuente de luz roja (R) estaba compuesta de tubos fluorescentes Philips 40715 de 40 W (Philips, Eindhoven, Holanda). La fuente de luz rojo lejana (RL) constaba de un

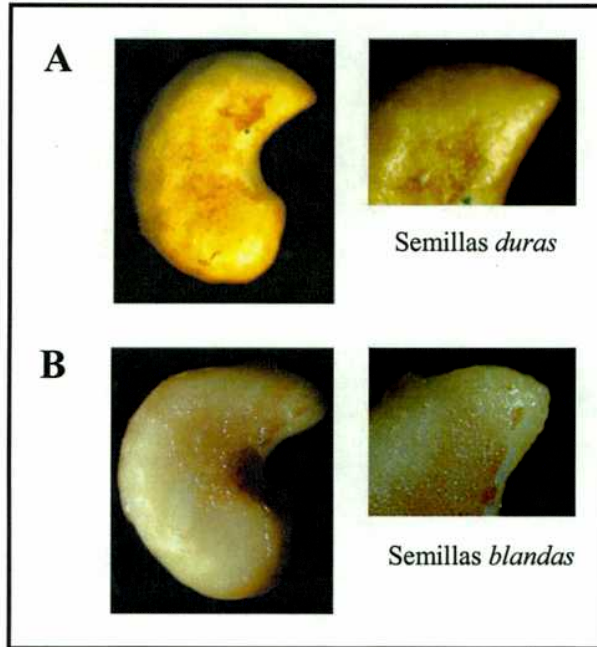
conjunto de lámparas reflectoras incandescentes de 150 W en combinación con dos filtros de acetato rojo, seis filtros acrílicos azules de 2 mm de espesor (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Buenos Aires) y un filtro de agua de 10 cm. La proporción calculada de Pfr/P fue de 0.87 y 0.1 para las fuentes de R y RL, respectivamente.

Los tratamientos de luz realizados fueron los siguientes: un único pulso saturante de RL (20 min,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), un único pulso saturante de R (20 min,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 24 hs de RL continua ( $20\text{-}30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y pulsos horarios de RL (3 min,  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Para los tratamientos prolongados fue utilizada una fuente instalada dentro de la cámara de incubación bajo temperaturas alternadas.

#### *Disección de las semillas y mediciones de actividades enzimáticas*

El procedimiento de disección de las distintas partes de la semilla fue realizado como se describe en la misma sección del Capítulo II.

Previamente a la disección, aquellas semillas que habían recibido RLc fueron divididas en dos grupos, semillas *duras* y semillas *blandas*. El criterio de división fue el aspecto y dureza del endosperma micropilar, antes de realizar la disección a las 45 hs de iniciado el tratamiento con RLc. La dureza del endosperma micropilar fue evaluada bajo lupa, aplicando presión en esta zona con la parte plana de un bisturí. Experiencias previas, realizadas por investigadores de nuestro grupo de trabajo, demostraron que teniendo en cuenta estas características es posible distinguir claramente semillas con el endosperma micropilar suficientemente blando, como para que se produzca la extrusión de la radícula, aplicando una fuerza = 900 g, de aquellas semillas que presentan el endosperma altamente resistente, en las que no se produce la extrusión de la radícula por la aplicación de esta fuerza (de Miguel y Sánchez, comunicación personal). Semillas representativas de estos grupos se muestran en la figura IV. 1.



**Figura IV. 1. Distintos grados de ablandamiento del endosperma micropilar en *D. ferox*: semillas duras y blandas.** Al término el pre-tratamiento de fase vapor las semillas, fueron expuestas a 24 hs de RL continua e incubadas en completa oscuridad hasta completar 45 hs (20-30 °C). En este punto, fueron removidas las cubiertas y separadas las semillas en dos grupos, de acuerdo al grado de ablandamiento del endosperma micropilar: duras y blandas. La fotografías de la figura muestran en (A) una semilla representativa del grupo de duras, en la cual se percibe claramente la integridad y firmeza del endosperma micropilar, mientras que en (B) se observa una semillas representativa del grupo de blandas, en la cual se percibe sin dificultad el avanzado grado de ablandamiento del endosperma micropilar.

*Análisis de la expresión de DfMan, DfExpa<sub>s</sub>, DfGA20-ox y DfGA3β-hy por RT-PCR.*

Las extracciones de ARN total fueron realizadas a partir de distintas partes de la semillas, a las cuales se les habían removido las cubiertas. Primeramente, fue disectada la región del endosperma micropilar (de las cuales fue removido el extremo de la radícula), luego el resto de la semilla fue cortado longitudinalmente en dos, de donde fue separado el embrión del resto del endosperma. Fue realizada entonces a la extracción del ARN de muestras que contenían 30 partes de semillas por el método de TRIZOL (Gibco, 15596). En ARN provenientes de las mismas fue resuspendido siempre en 50 µl de agua MiliQ. El ARN extraído de embriones fue cuantificado por espectrofotometría, mientras que el ARN obtenido de endosperma micropilar no pudo ser cuantificado debido a la bajísima eficiencia

de extracción a partir de este tejido. Seguidamente alícuotas de 3 µg ARN total (o 12 µl en el caso del endosperma micropilar) fueron tratadas con DNAsa (M6101, Promega) y seguidamente convertidas a ADNc, amplificadas por PCR utilizando los distintos pares de *primers* y las condiciones que se describen en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo III.

Los productos obtenidos así por RT-PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio, transferidos a una membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) y fijados a la misma por horneado. Para generar las sondas específicas, la amplificación de los fragmentos fue realizada utilizando los distintos pares de *primers*, descritos en la sección de resultados del Capítulo III, sobre plásmidos donde fueron clonados los distintos productos de RT-PCR. Posteriormente, estos fragmentos fueron marcados con P<sup>32</sup> por *random priming* (Labeling System, Promega U1100). La pre-hibridación y la hibridación se realizaron utilizando solución de hibridación UltraHyb (Ambion) a 65 °C. Los lavados de las membranas se realizaron a la misma temperatura usando soluciones de SSC 2x, 0.1 % SDS, SSC 1x, 0.1 % SDS y SSC 0.1x, 0.1 % SDS. La señal fue detectada utilizando placas para rayos-X.

Para asegurar que las reacciones de PCR fueron realizadas dentro del rango lineal de la misma se usaron distintos números de ciclos (15 a 30) con los diferentes *primers*. La abundancia de los transcritos fue calculada en base a la intensidad de las bandas de los productos obtenidos por RT-PCR analizada utilizando el programa MULTIANALIST (Fluor-S Multilmager, BioRad, Hércules, California, USA). La amplificación de actina fue usada como control interno y de contaminación con ADN genómico, utilizando un par *primers* cedidos por el laboratorio del Dr. Iuseim, que permitía la amplificación de una banda de 500 pb si la amplificación se realizaba a partir de ADNc y de 800 pb sobre ADN genómico.

#### *Análisis por Northern Blot*

El análisis por *Northern Blot* fue realizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo III. La amplificación de las sondas y la marcación fueron realizadas como se describe en la sección anterior. La pre-hibridación y la hibridación fueron realizadas en solución de hibridación UltraHyb (Ambion) a 42 °C, y los



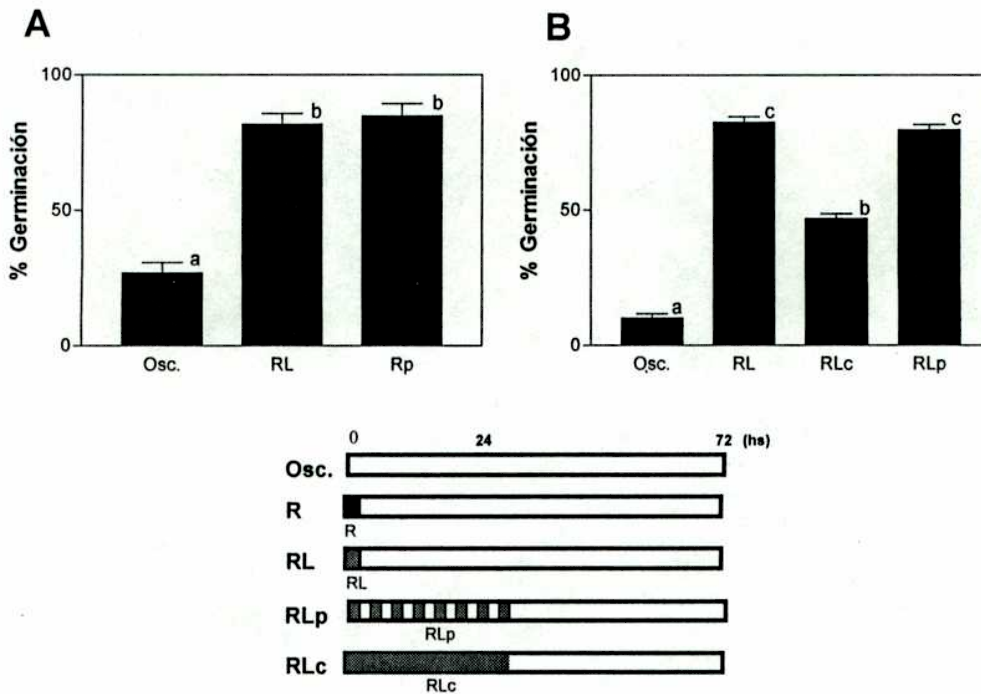
lavados de las membranas realizados a la misma temperatura usando soluciones de SSC 2x, 0.1 % SDS, SSC 1x, 0.1 % SDS y SSC 0.1x, 0.1 % SDS. La señal fue detectada utilizando placas para rayos-X.

## RESULTADOS

### ***La germinación de semillas de *D. ferox* con alta sensibilidad a la luz puede ser inducida por una VLFR e inhibida por una HIR***

Las semillas de *D. ferox* fueron sensibilizadas a la luz mediante un pre-tratamiento de fase vapor, el cual consistió en la incubación de las semillas en completa oscuridad a temperatura constante (25 °C) en una atmósfera saturada con vapor de agua durante 12 días. Luego de esta sensibilización, las semillas germinaron cerca del 85 % en respuesta a un pulso saturante de RL (Fig. IV. 2 A) que establecía un fotoequilibrio Pfr/P calculado del 0.1 %. Cuando las mismas semillas se expusieron a un pulso saturante de R (fotoequilibrio Pfr/P calculado del 0.87 %) el porcentaje de germinación alcanzado fue aproximadamente el mismo, mientras que aquellas semillas que se mantuvieron en absoluta oscuridad solo germinaron un 10-25 % (Fig. IV. 2 A y B). Estos resultados muestran que, mediante el pre-tratamiento de fase vapor, la mayor parte de la población de semillas de *D. ferox* fue capaz de adquirir una altísima sensibilidad a la luz que posibilita la inducción de la germinación mediante una VLFR.

Cuando a continuación del pulso inicial (e inductivo) de RL, en lugar de continuar la incubación en oscuridad, las semillas se mantuvieron bajo RL continuo durante 24 hs (RLc), la germinación inducida por el pulso inicial de RL fue inhibida significativamente (Fig. IV. 2 B). Pulsos horarios de RL, de igual flujo total que el tratamiento de RLc, no reprodujeron este efecto inhibitorio sobre la germinación (Fig. IV. 2 B), indicando la existencia de una respuesta de tipo HIR que bloquea la inducción de la germinación por la VLFR.



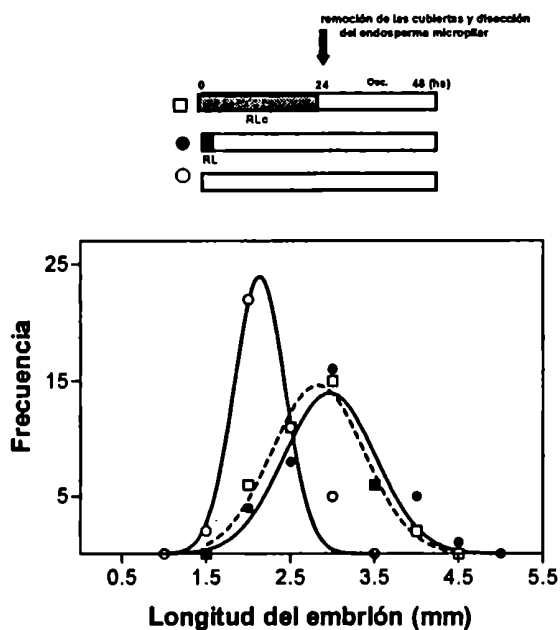
**Figura IV. 2. Inducción de la germinación semillas de *D. ferox* por una VLFR, e inhibición de la misma por una HIR.** En (A) al término del pre-tratamiento de fase vapor, las semillas fueron expuestas a un pulso de R (R), de RL (RL) o mantenidas en completa oscuridad (Osc.). En (B) una vez finalizado el pre-tratamiento de fase vapor, las semillas fueron expuestas durante 24 hs a RL (RLc), a pulsos horarios de RL durante 24 hs (a igual flujo total que el RLc) (RLp), a un único pulso de RL (RL), o a ningún tratamiento de luz (Osc.). Al finalizar los distintos tratamientos de luz, todas las semillas fueron incubadas en completa oscuridad hasta completar los 4 d. Durante esta incubación y los tratamientos prolongados de luz, las semillas fueron mantenidas en ciclos de temperaturas alternadas, 20-30 °C. Se realizó entonces el conteo de la germinación. Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 3-10 experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ .

***La VLFR promueve un aumento en el potencial de crecimiento del embrión, el cual no se modifica bajo el antagonismo VLFR-HIR***

La inducción de la germinación de semillas de *D. ferox* por una LFR depende del balance entre la fuerza expansiva del embrión y la resistencia mecánica que opone el endosperma (Sánchez y de Miguel, 1992). En el caso de la germinación estimulada por una VLFR se desconocía el efecto de la luz sobre estos procesos.

Se estudió entonces el crecimiento del eje embrionario en semillas de *D. ferox* que provenían del pre-tratamiento de fase vapor, y que habían recibido un pulso de RL o que se habían mantenido en completa oscuridad. Luego de una incubación de 24 hs, las cubiertas de las semillas fueron removidas y disectada la región del endosperma micropilar, de forma tal de permitir el crecimiento del embrión eliminando la resistencia que opone este tejido (ver Materiales y Métodos, Capítulo II). 24 hs más tarde se midió la longitud de la porción del embrión que emergía del endosperma. Se observó entonces una diferencia significativa entre el crecimiento del eje embrionario de las semillas que habían recibido un pulso de RL, con respecto al de los controles que habían permanecido en completa oscuridad (Fig. IV. 3). Estos resultados indican, que la promoción de la germinación por RL, mediante una VLFR, involucra un aumento del potencial de crecimiento del embrión.

Seguidamente, se analizó si la inhibición de la VLFR por una HIR se encontraba relacionada con un bloqueo del crecimiento del embrión. Los ensayos se realizaron como se describe anteriormente, pero en este caso, utilizando semillas irradiadas con RLc durante las primeras 24 hs de incubación. Bajo estas condiciones, el potencial de crecimiento del embrión no presentó diferencias significativas con el crecimiento observado en embriones de semillas que solo habían recibido un pulso de RL (Fig. IV. 3). Estos resultados indican que el mecanismo de la inhibición por una HIR, de la germinación inducida por una VLFR, no se encuentra relacionado con el crecimiento del eje embrionario.



**Figura IV. 3. La VLFR promueve un aumento en el potencial de crecimiento del embrión, el cual no es afectado por la HIR. Al término el pre-tratamiento de fase vapor las semillas, fueron expuestas un único pulso RL (●), 24 hs de RL continua (□), o mantenidas en completa oscuridad (○). Al finalizar los distintos tratamientos de luz todas las semillas fueron incubadas en completa oscuridad hasta completar 24 hs. Durante esta incubación y durante los tratamientos prolongados de luz, las semillas fueron mantenidas a en ciclos de temperaturas alternadas, 20-30 °C. En este punto, bajo luz verde fueron removidas las cubiertas y disectada la porción del endosperma micropilar e incubadas en oscuridad por otras 24 hs, al cabo de las cuales la longitud de los embriones fue medida. Los datos en la figura corresponden a 3 experimentos realizados de forma independiente.**

***La VLFR estimula las actividades de endo-β-mananasa y β-manosidasa, mientras que la HIR impide la promoción de las mismas***

Para estudiar los efectos de la VLFR sobre la actividad endo-β-mananasa y β-manosidasa, una vez concluido el pre-tratamiento de fase vapor, las semillas fueron expuestas a un pulso de RL o mantenidas en oscuridad, y luego incubadas en oscuridad hasta completar 46 hs. Bajo estas condiciones, las mediciones de actividad de endo-β-mananasa y de β-manosidasa mostraron un aumento significativo en respuesta al tratamiento de RL (Fig. IV. 4 A y B, Osc. vs RL), acorde a los valores de germinación

obtenidos bajo esos mismos tratamientos (Fig. IV. 2 A). Estos resultados indican que el ablandamiento del endosperma es parte del mecanismo de promoción de la germinación por una VLFR en *D. ferox*.

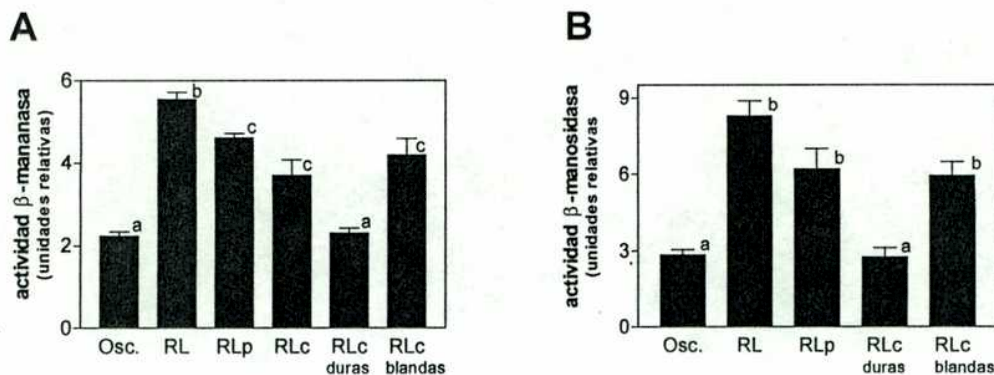
Seguidamente, se estudió si la inhibición de la VLFR por una HIR involucraba, o no, un efecto sobre la actividad de estas hidrolasas de pared. Al término del pre-tratamiento de fase vapor, las semillas fueron irradiadas con RLc o con pulsos horarios de RL (a igual flujo total) durante las primeras 24 hs de incubación, que luego se prolongó en oscuridad hasta completar 46 hs. En este punto se realizó la toma de muestras para realizar las mediciones de actividad enzimática.

El ablandamiento del endosperma es un proceso continuo que se inicia al comienzo de tratamiento con RL, el cual se desarrolla a distintas velocidades en las diferentes fracciones de la población de semillas. La promoción de este proceso fue afectada en aquellas semillas susceptibles a la HIR. La cinética de esta inhibición presentó una gran variación entre semillas, reflejada en los distintos grados de ablandamiento observados a 45 hs del inicio de RLc (datos no mostrados). En ese momento fue posible distinguir y separar de las muestras de semillas bajo RLc dos grupos: uno de los cuales mostraba claros signos del avance del ablandamiento del endosperma, constituido por semillas “blandas”, mientras que el otro grupo conservaba la dureza original de este tejido, formado por semillas “duras”. El porcentaje de semillas *blandas* (25-40 %) en las muestras se correspondía con los porcentajes de germinación observados bajo RLc. Con el objetivo de realizar una mejor aproximación a lo que ocurría dentro de la población de semillas, antes de realizar la toma de muestras, las semillas irradiadas con RLc fueron separadas en los dos grupos anteriormente descritos: semillas *duras* y semillas *blandas* (Fig. IV. 1).

El criterio para realizar esta división se basó, por un lado, en trabajos previos en los cuales queda claro que es posible diferenciar semillas con distinto grado de ablandamiento del endosperma (Sánchez y de Miguel, 1992; Sánchez y de Miguel, 1997). Por otro lado, cuando un tratamiento realizado afecta solo a una porción de la población, entonces esta no se comporta como un única población, sino como dos o más. Si bajo esta situación se analizara la muestra completa, sin sub-división previa, el promedio que se obtendría no representaría a ninguna población en particular, dando información poco clara sobre la respuesta bajo estudio. Tomar muestras que incluyen individuos de comportamientos muy

diferentes, puede llevar a una simplificación excesiva de la complejidad de los mecanismos de una respuesta y en ocasiones, incluso dificultar la interpretación de los resultados (Trewavas, 1999).

La actividad endo- $\beta$ -mananasa, dentro de las semillas que habían sido irradiadas con RLc, fue significativamente menor en las semillas *duras* respecto de la observada en las *blandas*, y también en comparación con aquellas semillas que habían recibido un pulso de RL o pulsos horarios de RL (a igual flujo total que el RLc). Al analizar las semillas que habían recibido RLc sin previa separación en semillas *blandas* y *duras*, la actividad endo- $\beta$ -mananasa no presentó diferencias significativas con la observada en semillas tratadas con pulsos horarios de RL (Fig. IV. 4 A). La actividad de  $\beta$ -manosidasa mostró un patrón similar al de endo- $\beta$ -mananasa (Fig. IV. 4 B). Dentro de las semillas que habían recibido RLc, el grupo de semillas *duras* presentó un nivel de actividad de esta enzima significativamente menor, en comparación con el grupo de semillas *blandas* y también respecto de aquellas que habían recibido un pulso de RL o pulsos horarios de RL (Fig. IV. 4 B). Estos resultados marcan a la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, como blancos de la inhibición por la HIR. Además, ponen en evidencia que el nivel de actividad de estas enzimas presentes en semillas cuya germinación no puede ser inhibida por el RLc, sumado a la variabilidad observada del ablandamiento del endosperma (y por consiguiente de estas actividades enzimáticas), como resultado de la HIR, no permiten detectar los bajos niveles de actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa presentes en semillas cuya germinación sí es susceptible a la inhibición por la HIR.



**Figura IV. 4.** La VLFR produce un aumento de las actividades de endo-β-mananasa y β-manosidasa, que puede ser bloqueado por una HIR. Al término del pre-tratamiento de fase vapor las semillas fueron expuestas un único pulso RL (RL), 24 hs de RL continua (RLc, RLc duras y RLc blandas), pulsos horarios de RL durante 24 hs (RLp), o mantenidas en completa oscuridad (Osc.). Al finalizar los tratamientos de luz, todas semillas fueron incubadas en completa oscuridad hasta completar 46 hs a partir del inicio de los mismos. Durante esta incubación y los tratamientos prolongados de luz, las semillas fueron mantenidas a en ciclos de temperaturas alternadas, 20-30 °C. En este punto, fueron removidas las cubiertas, realizada la disección de la semilla y la toma de muestras. Previamente a la disección, las semillas que habían recibido RLc fueron separadas en dos grupos de acuerdo al grado de ablandamiento del endosperma micropilar: *duras* y *blandas* (RLc duras y RLc blandas), o analizadas sin esta previa división (RLc). Los resultados obtenidos para endo-β-mananasa y β-manosidasa, se muestran en la parte (A) y (B) de la figura, respectivamente. Los datos en la figura representan las medias y el error estándar de 3-6 experimentos independientes. Las diferencias significativas se indican con letras distintas,  $P < 0.05$ .

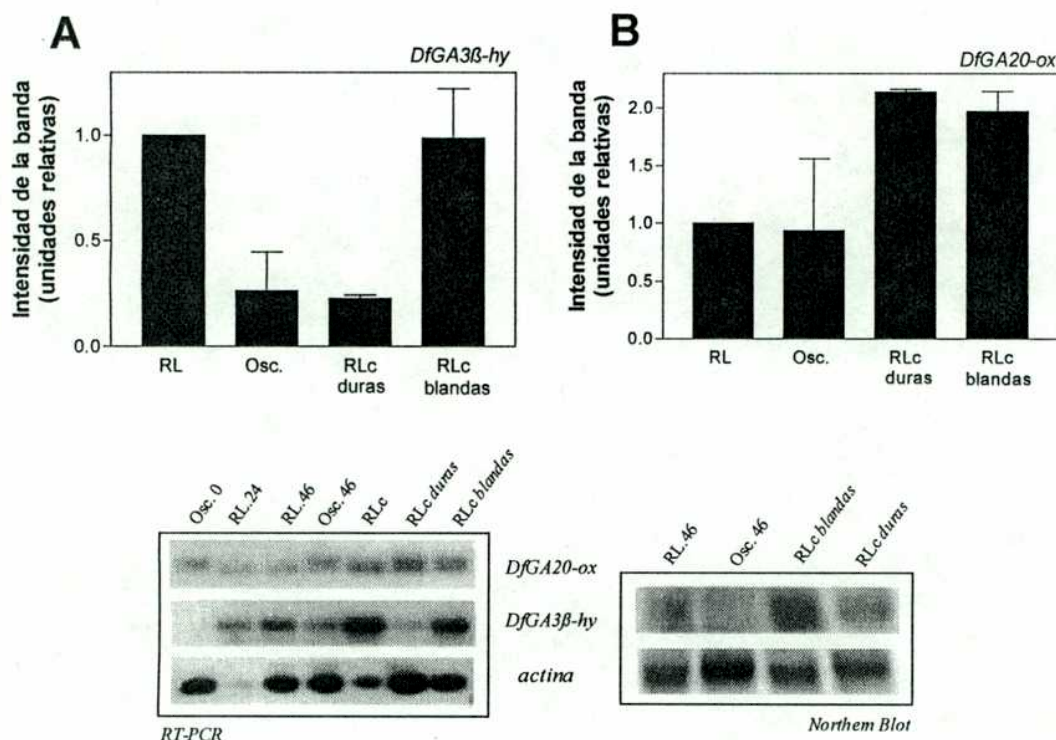
#### ***El nivel de los transcritos de DfGA3β-hy aumenta cuando se promueve la germinación por una VLFR***

Se estudió en la inducción de la germinación de *D. ferox* por una VLFR, el comportamiento de los niveles de mensajeros para GA 20 oxidasa y GA 3β-hidroxilasa, *DfGA20-ox* y *DfGA3β-hy*, enzimas claves en la ruta de síntesis de GAs. Se observó en embriones una acumulación creciente de mensajeros de *DfGA3β-hy* en respuesta al pulso de RL (Fig. IV. 5 C, Osc.0, RL.24 y RL.46). A 46 hs del pulso de RL, el nivel de



transcriptos de *DfGA3 $\beta$ -hy* fue significativamente mayor en embriones de semillas que habían recibido este tratamiento, en comparación con aquellos observados en semillas mantenidas en completa oscuridad (Fig. IV. 5 A). Estos resultados obtenidos por RT-PCR fueron corroborados utilizando la técnica de *Northern Blot* (Fig. IV. 5 C).

Por otro lado, el comportamiento observado para el nivel de mensajeros de *DfGA20-ox* fue completamente distinto al obtenido para *DfGA3 $\beta$ -hy* (Fig. IV. 5 B). Luego de 46 hs de incubación en oscuridad, poco antes de la emergencia de la radícula, tanto las semillas que habían recibido un pulso de RL como las que habían permanecido en completa oscuridad mostraron un nivel similar de acumulación de transcriptos de *DfGA20-ox* (Fig. IV. 5 B).



**Figura IV. 5.** Nivel de acumulación de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox* en la VLFR y en la inhibición de la misma por una HIR. El nivel de los transcriptos fue evaluado en embriones de semillas, que al término del pre-tratamiento de fase vapor, fueron expuestas a un pulso de RL (RL), 24 hs de RLc (RLc, RLc duras y RLc blandas), o mantenidas en oscuridad (Osc.). Seguidamente, incubadas y tratadas

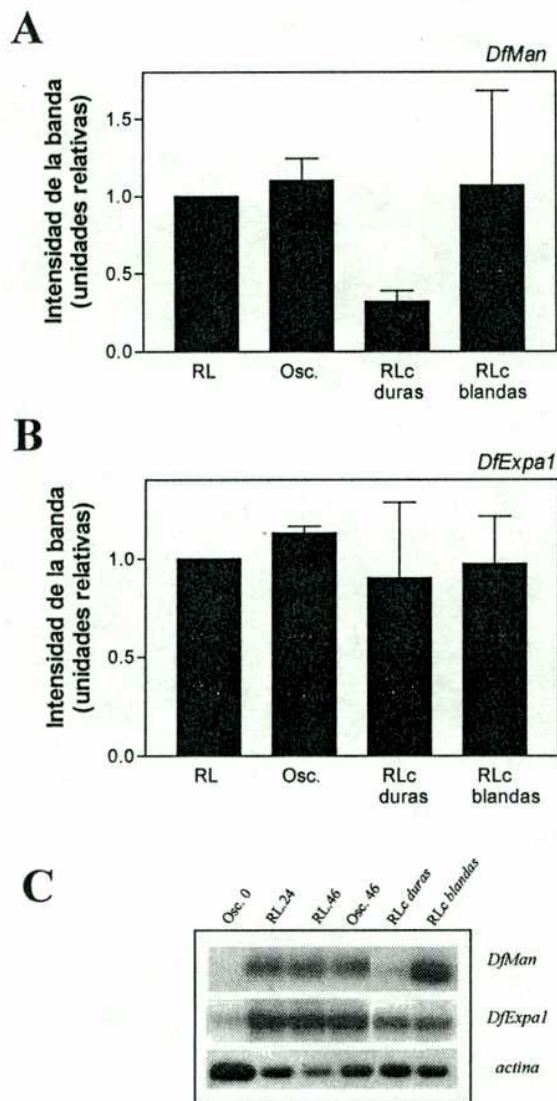


como se describe en la figura 4. Los resultados obtenidos para *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox* se muestran en la parte (A) y (B) de la figura, respectivamente. Los datos representan las medias y el error estándar de 2 experimentos realizados en forma independiente. En la parte (C) de la figura se observa, a la derecha, una autorradiografía de los productos de RT-PCR obtenidos hibridados con sondas específicas (*DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfGA20-ox*). A la izquierda, una autorradiografía de un ensayo por *Northern Blot* conteniendo 20  $\mu$ g de RNA total por calle donde fue utilizada como sonda *DfGA3 $\beta$ -hy*.

***La incubación en oscuridad de las semillas, al término del pre-tratamiento de fase vapor, produce un aumento en el nivel de mensajeros de DfMan y DfExpal en el endosperma micropilar y de DfExpal en el embrión***

De acuerdo a los resultados anteriormente presentados, en *D. ferox* la germinación inducida por una VLFR se encuentra relacionada con el aumento de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Fig. IV. 4). Se estudió entonces en el endosperma micropilar el comportamiento del nivel de transcriptos para endo- $\beta$ -mananasa, *DfMan*, y expansinas, *DfExpal*, posiblemente también involucradas en el proceso de ablandamiento.

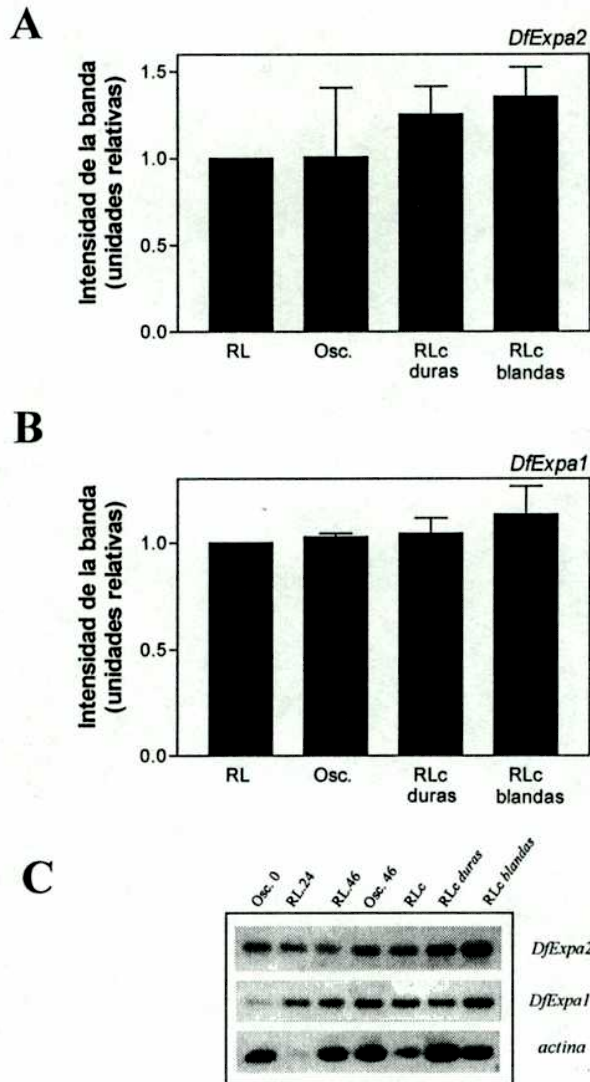
La incubación en oscuridad de semillas provenientes del pre-tratamiento de fase vapor fue suficiente para promover el aumento del nivel de los mensajeros de *DfMan* y *DfExpal* en el endosperma micropilar. No se observaron diferencias significativas entre semillas incubadas en completa oscuridad y las que habían recibido un pulso de RL (Fig. IV. 6 A y B). Estos resultados sugieren que el aumento observado en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa, en respuesta al pulso de RL, se debería a algún efecto de la luz posterior al establecimiento del nivel de mensajeros para esta enzima. Es importante destacar que al finalizar el pre-tratamiento de fase vapor (Osc. 0), el nivel de transcriptos, tanto de *DfMan* como de *DfExpal*, fue prácticamente indetectable (Fig. IV. 6 C), indicando que este pre-tratamiento por si solo no estimula la acumulación de los mismos.



**Figura IV. 6.** Nivel de acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpal* en la VLFR y en la inhibición de la misma por una HIR. El nivel de transcritos de *DfMan* y *DfExpal* fue evaluado en el endosperma micropilar de semillas que, al término del pre-tratamiento de fase vapor, fueron expuestas a un pulso de RL (RL), 24 hs de RLC (RLc, RLC duras y RLC blandas), o mantenidas en oscuridad (Osc.). Seguidamente, incubadas y tratadas como se describe en la figura 4. Los resultados obtenidos para *DfMan* y para *DfExpal* se muestran en la parte (A) y (B) de la figura, respectivamente. Los datos representan las medias y el error estándar de 2 experimentos realizados en forma independiente. En la parte (C) de la figura se observa una autorradiografía de los productos de RT-PCR obtenidos, hibridados con sondas específicas (*DfMan* y *DfExpal* *DfMan* y *DfExpal*).

El potencial de crecimiento del embrión aumenta en respuesta a la inducción de la germinación de *D. ferox* por una VLFR (Fig. IV. 3). Las expansinas, como se ha discutido anteriormente, son proteínas que aparentemente se encuentran involucradas en el crecimiento de tejidos, mediando procesos de expansión celular (Capítulos I y III), por lo que podrían desempeñar un papel importante durante la germinación interviniendo en el crecimiento del eje embrionario. En embriones de semillas de *D. ferox*, el pre-tratamiento de fase vapor fue suficiente para inducir la acumulación de *DfExpa2*, mientras que el nivel de *DfExpa1* fue indetectable bajo esa misma condición (Fig. IV. 7 C, Osc. 0). No se detectaron diferencias significativas en el nivel de acumulación de *DfExpa*, ni de *DfExpa2*, entre semillas, que al término del pre-tratamiento de fase vapor, fueron irradiadas con un pulso de RL o mantenidas en completa oscuridad, e incubadas durante 46 hs antes de analizar el nivel de dichos mensajeros (Fig. IV. 7 A y B).

El conjunto de estos resultados muestra que la VLFR no regula en semillas de *D. ferox* el nivel de acumulación de mensajeros de *DfMan*, ni de *DfExpa1* y *DfExpa2*.



**Figura III. 7. Nivel de acumulación de mensajeros de *DfExpa1* y *DfExpa2* en la VLFR y en la inhibición de la misma por una HIR.** El nivel de mensajeros para expansinas fue analizado en embriones de semillas que, al término del pre-tratamiento de fase vapor, fueron expuestas un pulso de RL (RL), 24 hs de RLc (RLc, RLc duras y RLc blandas), o mantenidas en oscuridad (Osc.). Seguidamente, incubadas y tratadas como se describe en la figura 4. Los resultados obtenidos para *DfExpa2* y para *DfExpa1* se muestran en la parte (A) y (B) de la figura, respectivamente. Los datos representan las medias y el error estándar de 2 experimentos realizados en forma independiente. En la parte (C) de la figura se observa una autorradiografía de los productos de RT-PCR obtenidos, hibridados con sondas específicas (*DfExpa2* y *DfExpa1*).

### ***La inhibición de la germinación por RLc se encuentra asociada al nivel de mensajeros de DfGA3β-hy***

La germinación de semillas de *D. ferox* inducida por un pulso de RL puede ser inhibida por una irradiación prolongada de RL (RLc) (Fig. IV. 2). La inhibición de la germinación por la HIR no afectó sobre el potencial de crecimiento del embrión (Fig. IV. 2), pero sí la actividad de endo-β-mananasa y β-manosidasa (Fig. IV. 4). Se estudió entonces el efecto del antagonismo VLFR-HIR sobre el nivel de los transcritos de *DfGA3β-hy* y *DfGA20-ox*, y sobre aquellos posibles blancos de la acción de las GAs: *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar y *DfExpa2* y *DfExpa1* en el embrión.

Una vez finalizado el pre-tratamiento de fase vapor, las semillas fueron irradiadas con RLc durante las primeras 24 hs de incubación y posteriormente incubadas en oscuridad hasta completar 46 hs desde el inicio del tratamiento de luz. Se colectaron entonces las muestras para determinar el nivel de los distintos mensajeros. El nivel de mensajeros de *DfGA3β-hy* observados en semillas *duras* y *blandas*, que habían sido irradiadas con RLc, fue coherente con los niveles de actividad de endo-β-mananasa y β-manosidasa que presentaban semillas tratadas de la misma forma (Fig. IV. 5 A y 4). El nivel de transcritos de *DfGA20-ox* mostró un incremento significativo en respuesta al RLc, no observándose diferencias entre semillas *duras* y *blandas* (Fig. IV. 5 B).

En la región del endosperma micropilar, el nivel de mensajeros de *DfMan* fue distinto entre semillas *blandas* y *duras*, que habían recibido RLc, siendo la acumulación de los mismos significativamente menor en el grupo de semillas *duras* que en aquellas que habían recibido un único pulso de RL, o se habían mantenido en completa oscuridad (Fig. IV. 6 A). No se detectó ningún efecto del RLc sobre el nivel de acumulación de *DfExpa1* en este tejido (Fig. IV. 6 B). En embriones tampoco se vieron afectados por la HIR, los niveles de mensajeros de *DfExpa1* y *DfExpa2* (Fig. IV. 7 A y B).

Los resultados obtenidos muestran que el antagonismo entre la VLFR y la HIR controla en los embriones el nivel de los mensajeros de *DfGA3β-hy* y *DfGA20-ox*, y en el endosperma micropilar, el nivel de acumulación de *DfMan* en forma coherente con los valores de germinación obtenidos bajo tratamientos conducentes a una HIR.

## DISCUSIÓN

Las semillas de *D. ferox* presentan dormición impuesta por las cubiertas, la cual suele ser muy profunda al momento de la maduración (Benech-Arnold R L, 2000; Soriano *et al.*, 1964). La inducción de la germinación mediante una VLFR, requiere de una fuerte reducción de los niveles de dormición y una alta sensibilidad a la luz. En el ambiente natural, estas condiciones pueden alcanzarse durante la post-maduración de las semillas enterradas en el suelo (Scopel *et al.*, 1991), y en el laboratorio mediante un pre-tratamiento en fase vapor (Fig. IV. 2).

Aún después de que los niveles de dormición han descendido considerablemente, la inducción de la germinación de *D. ferox* requiere del aumento y la acción del Pfr (Fig. IV. 2), en este caso sería el Pfr<sub>A</sub> (Botto *et al.*, 1996). En respuesta a la inducción de la germinación por la VLFR, se produce un incremento en el potencial de crecimiento del embrión (Fig. IV. 4) y el ablandamiento del endosperma micropilar. Este último como resultado, al menos en parte, del aumento en las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa en ese tejido (Fig. IV. 5).

La germinación inducida por una VLFR puede ser inhibida por una HIR. La exposición de las semillas durante 24 hs a RLc, al término del pre-tratamiento de fase vapor, inhibe la germinación, mientras que pulsos horarios de RL no son capaces de reproducir la inhibición causada por RLc (Fig. IV. 2). Esta falta de reciprocidad entre los tratamientos de RLc y pulsos de RL es una de las características sobresalientes de las respuestas de tipo HIR.

La HIR no afecta la promoción inducida por la VLFR sobre el potencial de crecimiento del embrión (Fig. IV. 3), pero si se encuentra vinculada con el bloqueo del ablandamiento del endosperma micropilar. En aquellas semillas susceptibles a la HIR, la promoción por la VLFR de las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, se encuentra bloqueada por la HIR (Fig. IV. 4). Este bloqueo muy posiblemente impida la disminución de la resistencia mecánica del endosperma micropilar, necesaria para que se produzca la emergencia de la radícula. Cabe destacar que la inhibición de las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, resultante de la HIR, solo puede detectarse analizando separadamente los grupos de semillas que presentan un alto (*blandas*) y bajo (*duras*) grado de ablandamiento del endosperma micropilar. Esto se debe, por un lado, a la variabilidad

del ablandamiento del endosperma (y por ende de la actividad de estas enzimas) resultante de la HIR; y por otro lado, a que en semillas cuya germinación no es inhibida por la HIR, el nivel de actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa es tal que, cuando se analiza la muestra completa sin sub-división en *blandas* y *duras*, no se puede detectar el reducido nivel de actividad presente en aquellas semillas cuya germinación sí es sensible a la inhibición por la HIR.

A nivel molecular, en embriones de *D. ferox* en respuesta a la VLFR se produce un aumento en el nivel de transcritos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, *DfGA3 $\beta$ -hy*, mientras que aquellos que cofidican para GA 20 oxidasa, *DfGA20-ox*, permanecen constantes, independientemente del tratamiento de luz (Fig. IV. 5). Estos resultados sugieren, que la promoción por la VLFR de la germinación involucra un aumento de los niveles de GAs, que en los distintos tejidos actuarían estimulando procesos conducentes a la germinación, como el crecimiento del embrión y el ablandamiento del endosperma. Sin embargo, el nivel de los mensajeros para endo- $\beta$ -mananasa y expansinas, *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar (Fig. IV. 6), y *DfExpa1* y *DfExpa2* en el embrión (Fig. IV. 7), supuestos blancos de las GAs, presentan un patrón de acumulación independiente de la luz, del nivel de *DfGA3 $\beta$ -hy* y presumiblemente del de GAs. Estos resultados ponen en evidencia la existencia de vías de acción de los fitocromos no descritas hasta el momento sobre los mecanismos que determinan la germinación de semillas, generando nuevas preguntas sobre estos procesos. ¿Es la expresión de estos mensajeros independiente de GAs? ¿Las GAs se encuentran presentes en las semillas en cantidades suficientes para que se produzca la acumulación de transcritos observada? ¿Qué efecto tiene el pre-tratamiento de fase vapor y la VLFR sobre la sensibilidad de las semillas a las GAs? ¿Para qué procesos son necesarias las GAs en la VLFR?

La reducción del nivel de dormición mediante la fase vapor, que permite la promoción de la germinación por una VLFR, parece involucrar la pérdida de algunos de los puntos de control que operan a mayores niveles de dormición. Algunos procesos se independizan de la regulación por la luz, como el aumento de los niveles de los mensajeros de *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar.

Los estudios a nivel fisiológico-bioquímico de la inducción de la germinación de *D. ferox* mediante una LFR y una VLFR, muestran grandes similitudes, mientras que en el plano molecular, el análisis del nivel de transcritos relacionados con la germinación revela importantes diferencias. La diferencias observadas entre estos niveles de estudio puede deberse a que en la VLFR, la luz y/o las GAs actúan, en parte, controlando procesos posteriores al establecimiento de los niveles de ciertos mensajeros (*DfMan*, *DfExpa1* y *DfExpa2*), pudiendo determinar el nivel de las proteínas codificadas por los mismos, así como su actividad. Sin embargo, no es posible descartar la existencia de otros genes blanco de la luz y/o GAs en el contexto de la VLFR, distintos a los estudiados, como podrían ser otras hidrolasas de pared (Bradford, 2000).

La HIR, por un lado, no afecta el nivel de transcritos para expansinas en embriones, de forma coherente con los datos obtenidos sobre el crecimiento del embrión bajo la HIR y el posible papel de estas proteínas dentro de este proceso (Fig. IV. 7). Por otro lado, la HIR impide la acumulación de transcritos de *DfGA3 $\beta$ -hy* y *DfMan* en semillas susceptibles a la misma (Fig. IV. 5 y 6), mientras que la acumulación de mensajeros de *DfGA20-ox* aumenta en respuesta al RLc, posiblemente como consecuencia de una regulación negativa de las GAs sobre el nivel de estos transcritos (Fig. IV. 5). El conjunto de estos resultados sugiere que la HIR podría determinar una reducción en los niveles de GAs, lo cual coincide con la inhibición de la germinación y de las actividades de las hidrolasas de pared, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa, como resultado de la HIR.

Surgen entonces nuevas preguntas sobre las cuales trabajar. ¿Existe entonces una disminución en el contenido endógeno de GAs, como resultado de la HIR, que determina la reducción del nivel de mensajeros *DfMan* y de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa?. Si así fuera, y siendo la acumulación de mensajeros de *DfMan* al término del pre-tratamiento de fase vapor independiente de la luz (y de GAs), es posible pensar que la HIR reinstala un mayor nivel de dormición, bajo el cual la expresión de *DfMan* (entre otros posibles procesos) requiera nuevamente de GAs.

La germinación de semillas permite un abordaje completamente distinto al estudio de los modos de acción de los fitocromos, debido a que es la única respuesta que presenta



un antagonismo entre los mismos: la LFR y la VLFR la promueven, mientras que la HIR la inhibe. En particular, la germinación de semillas de *D. ferox* provenientes de poblaciones naturales presenta la ventaja de ser susceptible a los tres modos de acción: LFR, VLFR y HIR.

Es importante señalar que este es el primer reporte sobre los mecanismos involucrados en la inducción de la germinación por una VLFR y de un antagonismo VLFR-HIR, tanto a nivel fisiológico-bioquímico como molecular. Por lo tanto, no existen datos en la literatura que permitan la discusión de los mecanismos involucrados en un contexto más amplio. Los resultados obtenidos ponen de relieve que las vías de transducción divergentes que se originan en el PHYA dependiendo de la duración del tratamiento de luz, la VLFR por un pulso de RL y la HIR por RLc, tienen efectos completamente opuestos sobre el nivel de acumulación de algunos mensajeros en el mismo tejido y presumiblemente en las mismas células.



## **Introducción**

El estudio de las plantas vasculares tiene una importancia estratégica para la comprensión de los mecanismos de transducción de señales y su evolución. Desde el momento de la divergencia (al menos hace un billón de años), a partir su ancestro común, las plantas, los animales y los hongos (Doolittle *et al.*, 1996) han evolucionado en forma independiente tanto en estructura como en organización. La evolución de las plantas claramente ha tomado un rumbo diferente, bajo un conjunto de condiciones completamente distintas, que la evolución animal. Dentro de las características más obvias se encuentran: el crecimiento fotoautotrófico, la ausencia de movilidad, el crecimiento modular de sus órganos y la presencia de una pared celular semi-rígida (McCarty y Chory, 2000).

Numerosas señales del ambiente influyen el crecimiento y el desarrollo de las plantas: la temperatura, la luz, el agua, y la gravedad son algunos de estos estímulos. La luz tiene un papel especialmente importante, ya que no solo es fuente de energía, sino que también actúa como estímulo sobre muchos procesos del desarrollo de las plantas, que van desde la germinación de las semillas hasta la inducción de la floración. Consecuentemente, las plantas presentan el más diverso y rico conjunto de mecanismos de percepción de luz que cualquier otro grupo de organismos, poseen un grupo de fotorreceptores que les permite discriminar en un extraordinario rango de intensidad y calidad espectral de la luz. De acuerdo a las condiciones ambientales, y dependiendo del estadio de crecimiento y desarrollo, estos fotorreceptores pueden actuar de forma completamente independiente o interactuar de manera redundante, sinérgica e incluso antagónica (Smith, 1999).

La germinación de *D. ferox* brinda una oportunidad interesante para el estudio de los mecanismos desencadenados por los distintos modos de acción del sistema de los fitocromos. Esta respuesta puede ser inducida tanto por una LFR como por una VLFR, dependiendo del nivel de dormición de las semillas, mientras que ambos caminos de inducción pueden ser inhibidos por una HIR (Capítulo II y IV). En *D. ferox* y otras especies, los fotorreceptores involucrados en los distintos modos de acción son probablemente los mismos que en *Arabidopsis* y tomate, de ser así, los antagonismos LFR-HIR y VLFR-HIR, observados durante la germinación de *D. ferox*, implican nuevas interacciones entre los fitocromos, distintas a las observadas en otras respuestas. En particular, es interesante el antagonismo entre los distintos modos de acción del PHYA,

donde dependiendo de la duración de la señal percibida (transitoria o sostenida en el tiempo), se desencadena la promoción (un pulso breve de luz, VLFR) o la inhibición de la germinación (luz continua, HIR). En otras respuestas, como por ejemplo la inhibición del alargamiento del hipocotilo durante la de-etiolación, se han observado interacciones negativas entre fitocromos (Casal y Sánchez, 1998; Henning *et al.*, 2001). Sin embargo, se trata de la acción de un fitocromo sobre otro modulando la amplitud de la respuesta, ya que en la misma los tres modos de acción de los fitocromos (LFR, VLFR y HIR) actúan en el mismo sentido, por ejemplo inhibiendo la elongación del hipocotilo durante la de-etiolación (Hennig *et al.*, 2001).

#### ***Inducción de la germinación de D. ferox: VLFR y LFR***

La dormición de las semillas permite la dispersión de la germinación en el tiempo y el espacio, impidiendo la misma bajo condiciones que serían desfavorables para el establecimiento de las plántulas y/o el posterior desarrollo de las plantas. Durante la post-maduración de semillas los niveles de dormición van descendiendo, ampliándose así el rango de condiciones bajo las cuales es posible la germinación. De esta forma, a medida que las semillas van envejeciendo y perdiendo viabilidad, también disminuyen los requerimientos para la germinación (Bewley y Black, 1985).

Una vez alcanzada la madurez, las semillas de *D. ferox* se encuentran en un estado de profunda dormición. Inicialmente, la germinación no puede ser inducida a través del sistema de los fitocromos (Soriano *et al.*, 1964). Una vez transcurrido cierto tiempo de post-maduración, con la consiguiente reducción de los niveles de dormición, la germinación de *D. ferox* puede ser estimulada por una LFR (Soriano *et al.*, 1964), mientras que una VLFR, aún no es capaz de inducir la germinación. La promoción de la germinación mediante una VLFR requiere de una fuerte reducción de los niveles de dormición, la cual puede alcanzarse en condiciones naturales, durante la post-maduración de las semillas enterradas en el suelo (Scopel *et al.*, 1991) y en laboratorio, mediante determinados pre-tratamientos (Capítulo IV).

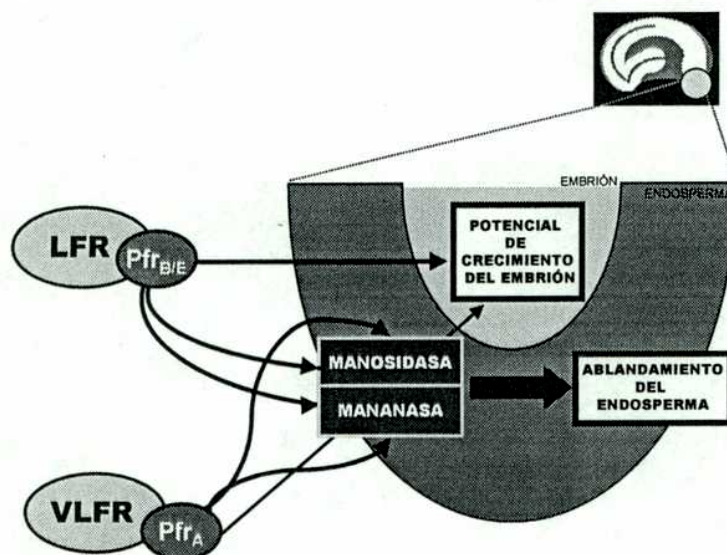
La germinación de *D. ferox* promovida mediante una LFR involucra el aumento de la fuerza expansiva del embrión y el ablandamiento del endosperma micropilar (Sánchez y de Miguel, 1992). El ablandamiento de este tejido se refleja en la disminución del

contenido de mananos de sus paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1990), asociado al aumento de la actividad de hidrolasas de pared, endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997). En la inducción de la germinación de *D. ferox* a través de una VLFR, de forma similar a lo observado para la LFR, se produce un aumento del potencial de crecimiento del embrión y el ablandamiento del endosperma micropilar (Capítulo IV), este último asociado a un aumento en las actividades de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Capítulo IV). En la figura V 1 se presenta un esquema de la inducción de la germinación por una LFR, o una VLFR, a nivel fisiológico-bioquímico.

La germinación de semillas de tomate también involucra el ablandamiento del endosperma micropilar y el aumento de la actividad de hidrolasas de mananos en este tejido, aunque existen algunas dudas sobre el papel de estas enzimas en la germinación (Bewley, 1997). Este aumento en actividad puede ser revertido por RL, lo que sugiere la participación del fitocromo en el proceso (Nomaguchi, *et al.*, 1995). En lechuga, la LFR promueve el potencial de crecimiento del embrión (Carpita, *et al.*, 1979), siendo confuso el papel del ablandamiento del endosperma y las hidrolasas de pared en la inducción de la germinación de estas semillas (Bewley, 1997). En ningún caso se han analizado los mecanismos fisiológicos de la inducción de la germinación por una VLFR.

Es interesante notar, que en la inducción de la germinación de *D. ferox* por una LFR, el aumento en la actividad endo- $\beta$ -mananasa (entre semillas inducidas y no inducidas a germinar) es de unas 5 a 8 veces (Sánchez y de Miguel, 1997), Fig. III. 7), mientras que en la VLFR esta diferencia es mucho menor, aproximadamente unas 2 veces (Fig. IV. 4). Además, en semillas capaces de responder a una VLFR, el nivel de actividad de esta enzima (en semillas no estimuladas por la luz) es un orden de magnitud mayor que en aquellas cuya germinación solo puede ser estimulada por una LFR (Fig. IV. 4, Osc.; Sánchez y de Miguel, 1997; Fig. III. 7, R.RL.46). Estos resultados indican que, durante la post-maduración, la disminución de la dormición involucra la pérdida del requerimiento de luz para determinados procesos, en este caso la actividad de endo- $\beta$ -mananasa. En tabaco, se observa una relación semejante entre la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa y el nivel de

dormición de las semillas (Leubner-Metzger y Meins, 2000), sin embargo, se desconoce el papel de esta enzima en el proceso germinativo.

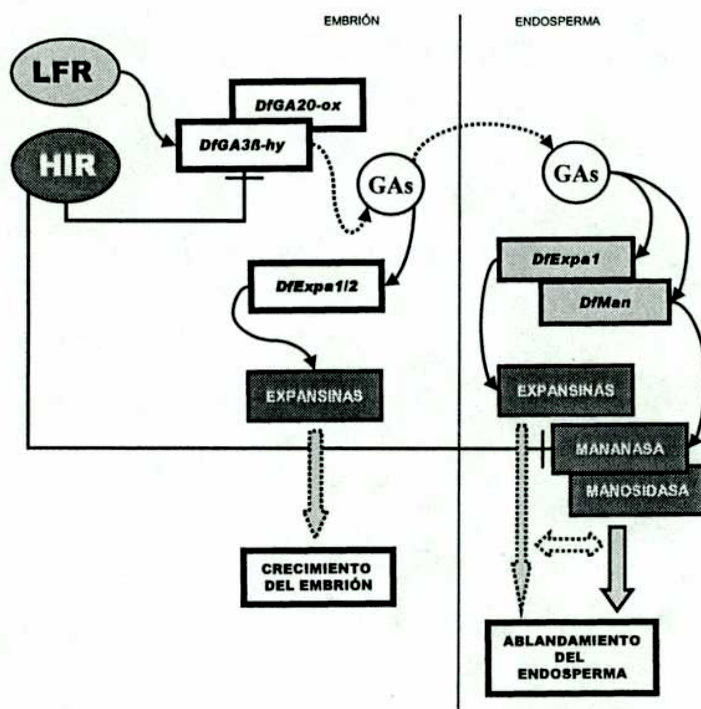


**Figura V. 1.** Esquema de las interacciones descritas, a nivel fisiológico y bioquímico, para la inducción de la germinación de semillas de *D. ferox* mediante una LFR y una VLFR.

A diferencia de lo observado en *D. ferox* para endo- $\beta$ -mananasa, la magnitud de la promoción de la actividad  $\beta$ -manosidasa por la LFR y por la VLFR es muy similar, así como los valores observados en semillas no inducidas a germinar (Sánchez y de Miguel, 1997; Capítulo III). En conjunto estos resultados sugieren la existencia de controles independientes en *D. ferox* sobre la actividad de estas enzimas.

El análisis de los niveles de acumulación de transcritos relacionados con la germinación muestra la existencia de algunas semejanzas e importantes diferencias entre la LFR y la VLFR. En embriones de *D. ferox*, en respuesta a la LFR, se produce un incremento en el nivel de transcritos para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa, *DfGA3 $\beta$ -hy* (Capítulo III),

de forma similar a lo observado en *Arabidopsis* para *GA4* y *GA4H* (Yamaguchi, *et al.*, 1998) y en lechuga para *Ls3h1* (Toyomasu *et al.*, 1998). Probablemente, el aumento en el nivel de mensajeros para GA  $\beta$ -hidroxilasa determine un aumento en el contenido de GAs bioactivas en el embrión. Las GAs migrarían entonces desde el embrión al endosperma micropilar, promoviendo el ablandamiento de este tejido, posiblemente como resultado de la acción conjunta de hidrolasas de pared y expansinas. El aumento de la actividad de estas enzimas y proteínas sería consecuencia del incremento en el nivel sus mensajeros, *DfMan* y *DfExpa1* (Capítulo III). En el embrión, las GAs promueven el aumento del nivel de transcritos para expansinas, *DfExpa1/2* (Capítulo III), de acuerdo con el aumento observado en el potencial de crecimiento del embrión (Sánchez y de Miguel, 1992). En la figura V 2 se presenta un esquema que resume las interacciones descriptas para la inducción de la germinación por una LFR.



**Figura V. 2.** El esquema de la figura resume los efectos de la LFR en la inducción de la germinación de semillas de *D. ferox* y su inhibición por una HIR, tanto a nivel fisiológico y bioquímico como molecular. Las fechas de líneas llenas indican las relaciones conocidas, mientras que las fechas punteadas indican presuntas interacciones o procesos.

Durante la germinación de semillas de tomate en oscuridad, o en respuesta a GAs, se ha observado, en el endosperma micropilar, el aumento del nivel de transcritos para una endo- $\beta$ -mananasa, *LeMAN2* (Nonogaki *et al.*, 2000) y una expansina, *LeEXP4* (Chen y Bradford, 2000); mientras que en embriones, aumentan los mensajeros para dos tipos de expansinas, *LeEXP8* y *LeEXP10* (Chen *et al.*, 2001). Desconociéndose, la regulación por la luz de la expresión de estos genes en tomate.

La promoción de la germinación por la VLFR presenta respecto del nivel de los mensajeros analizados una situación muy distinta a la LFR. Por un lado, en semillas cuya germinación puede ser inducida mediante una VLFR, se observa la acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpa1* en el endosperma micropilar y de *DfExpa1* y *DfExpa2* en el embrión, en forma independiente de la luz (Capítulo IV). Estos resultados contrastan con la fuerte regulación de la LFR sobre el nivel de dichos transcritos en semillas con mayor nivel de dormición.

Por otro lado, en respuesta al estímulo de la VLFR, aumenta en embriones el nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy*, de forma similar a lo que ocurre en la LFR (Capítulo IV). Indicando un probable aumento en el contenido de GAs, las cuales serían requeridas, en la VLFR, para procesos aún no identificados relacionados tanto con el crecimiento del embrión, como con el ablandamiento del endosperma, como podría ser la promoción de otras hidrolasas de pared (Bradford, 2000). Otra posibilidad es que, al término de pre-tratamiento de fase vapor, existiera un nivel endógeno de GAs suficiente para estimular algunos procesos (como son la expresión de *DfMan*, *DfExpa1* y *DfExpa2*) pero no otros (aumento del potencial de crecimiento del embrión y de la actividad de  $\beta$ -manosidasa), para los cuales se requeriría el aumento en el contenido de GAs.

La promoción de la germinación de *D. ferox* a través de los distintos modos de acción del sistema de los fitocromos VLFR y LFR, presenta importantes similitudes a nivel fisiológico y bioquímico. Sin embargo, los estudios realizados sobre la abundancia de transcritos, presumiblemente relacionados con el proceso germinativo, muestran que a este nivel existen diferencias importantes. Se evidencia así, la falta de información sobre los mecanismos que subyacen a la reducción de la dormición y a la inducción de la germinación por una VLFR. Debajo del nivel fisiológico parecen encontrarse los mecanismos que determinan, al menos en parte, la disminución de la dormición, y que



permanecen ocultos cuando solamente se analiza la inducción de la germinación por una LFR.

### ***Inhibición de la germinación de *D. ferox*: HIR***

Otro punto en común de la germinación de *D. ferox* inducida por una VLFR o una LFR, es que ambas pueden ser inhibidas por una HIR. En el caso de la LFR, se ha probado que el bloqueo por una HIR puede actuar aún muy tarde dentro del proceso germinativo, pudiendo ser revertido por una nueva LFR (Capítulo II y IV).

A nivel fisiológico, la inhibición por una HIR de la LFR, involucra una disminución de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa (Capítulo IV). En el caso de la inhibición de la VLFR, la HIR impide la promoción de la actividad de endo- $\beta$ -mananasa y  $\beta$ -manosidasa (Capítulo IV). En otras palabras en *D. ferox*, el blanco de la HIR, tanto en la LFR como en la VLFR, es el proceso de ablandamiento del endosperma micropilar. Es importante destacar, que en ningún caso se observa efecto alguno de la HIR sobre el potencial de crecimiento del embrión (Capítulo II y IV).

En la inhibición por una HIR de la germinación inducida por una LFR, o una VLFR, se observa una fuerte relación entre el nivel de mensajeros de *DfGA3 $\beta$ -hy* y los valores de germinación. Sin embargo, aún no es posible realizar una descripción precisa de los efectos de las GAs, debido a los variados efectos de la HIR y a la falta de información sobre otros procesos blanco de la acción de estas hormonas. En el caso del antagonismo VLFR-HIR, pero no en el LFR-HIR, el descenso en la actividad de endo- $\beta$ -mananasa se encuentra asociado a una disminución en el nivel de los mensajeros para esta enzima, en aquellas semillas susceptibles a la HIR. Los resultados obtenidos indican que los efectos de la HIR sobre la actividad de endo- $\beta$ -mananasa pueden deberse, tanto a una reducción en el nivel de mensajeros para esta enzima (VLFR, Capítulo IV), como a algún proceso posterior al establecimiento de dichos niveles, que determine la disminución de esta actividad enzimática (LFR, Capítulo III). En el esquema de la figura V 2 se resumen los efectos del antagonismo LFR-HIR.

En el ambiente natural las semillas se encuentran expuestas a un gran número de variables ambientales, entre ellas, el ambiente lumínico provee información sobre las condiciones a las cuales se verán expuestas las plántulas de tener lugar la germinación. En

principio, los tres modos de acción: VLFR, LFR y HIR, pueden estar involucrados en la regulación de la germinación en condiciones naturales. La inducción de la germinación por exposiciones muy breves a la luz durante la labranza (mediante una VLFR) puede favorecer la aparición de plántulas una vez que el suelo ha sido removido y eliminados los competidores potenciales, debido a las labores (Scopel *et al.*, 1991). La promoción de la germinación por altas relaciones de R/RL (a través de una LFR), favorecería la percepción de discontinuidades en el canopeo, debidas a la desaparición de individuos, como consecuencia de inundaciones (Insausti *et al.*, 1995) o pastoreo (Deregibus *et al.*, 1994). La inhibición de la germinación por la luz que atraviesa un canopeo, rica en RL, impediría (mediante una HIR) la germinación bajo condiciones desfavorables para el crecimiento de las plántulas, como puede ser la fuerte competencia bajo un canopeo denso (Casal y Sánchez, 1998).

Las plantas perciben constantemente, y con gran sensibilidad, señales de al menos 15 variables ambientales. El flujo de información es continuo. Muchos de los receptores para estas señales son conocidos y otros apenas intuidos. Respuestas como la germinación, son construidas de acuerdo al banco de información interna que especifica el nicho ecológico de la planta. La germinación es un fenómeno altamente complejo, que involucra la acción conjunta y coordinada de una enorme cantidad de moléculas, lo que implica un número aún mayor de interacciones (Trevawas, 1999 y 2002). No parece existir un esquema único de la acción de la luz sobre la germinación, ya que los procesos que pueden ser afectados, cambian con el estado de dormición de las semillas. A nivel de los distintos transcritos analizados asociados a la germinación, el aumento del nivel de mensajeros para GA 3 $\beta$ -hidroxilasa es el único proceso de los estudiados que se conserva entre la LFR y la VLFR. Indicando el papel central de estas hormonas en la inducción de la germinación. Recién estamos comenzando a estudiar los componentes de los distintos caminos que determinan la germinación de semillas, apenas podemos entrever como influye el escenario fisiológico en el proceso germinativo.

## ***Bibliografía***

- Abe, H., Takio, K., Titani, K. and Furuya, M. (1989).** Amino-terminal amino acid sequences of pea phytochrome II fragments obtained by limited proteolysis. *Plant and Cell Physiology* **30(8)**, 1089-1097.
- Benech-Arnold R.L., S.R., Forcela F., Kruk B.C., and Ghera C.M. (2000).** Environmental control of dormancy in weed seeds banks in soil. *Field Crops Research* **67**, 105-122.
- Bewley, J. D. (1997a).** Breaking down the walls - a role for endo-beta-mannanase in release from seed dormancy ? *Trends in Plant Science* **2**, 464-469.
- Bewley, J. D. (1997b).** Seed germination and dormancy. *Plant Cell* **9**, 1055-1066.
- Bewley, J. D., Burton, R. A. and Fincher, G. B. (1997).** Molecular cloning of a cDNA encoding a (1-4)-beta-mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta* **203**, 454.
- Bewley, J. and Black, M. (1994).** Seeds: Physiology of Development and Germination. New York: Plenum Press.
- Bewley, J. D. and Black, M. (1982).** Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination, vol. 2. Viability, dormancy and environmental control. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Blaauw-Jansen, G. and Blaauw, O. H. (1975).** A shift of the response threshold to red irradiation in dormant lettuce seeds. *Acta Botanica Neerlandica* **25**, 149-152.
- Botto, J., Sánchez, R. and Casal, J. (1998).** Burial conditions affect the light responses of *Datura ferox* seeds. *Seed Science Research* .
- Botto, J. F., Sánchez, R. A., Whitlam, G. C. and 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.
- Botto, J. F., Sánchez, R. A. and Casal, J. J. (1995).** Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **146**, 307-312.
- Bradford, K. J. (2000).** Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seed. In *Seed Biology. Advances and applications* (ed. M. Black, K. J. Bradford and J. Vazquez-Ramos). Wallingford, UK.: CAB International.
- Briggs, W. R. and Rice, H. V. (1972).** *Annual Reviews in Plant Physiology* **23**, 293-334.
- Burgin, M. J. P. F., L.; Mella, A.; Staneloni, R. and Sánchez, R. A. (2000).** The transcription of endo-b-mannanase and GA 3b-hydroxylase genes of *Datura ferox* seeds is regulated by

phytochrome. San Diego, USA: American Society of Plant Physiology.

- Butler, W., Norris, K., Siegelman, H. and Hendricks, S. (1959).** Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Biochemistry* **45**, 1703-1708.
- Carpita, N., Ross, C. and Nabors, M. (1979a).** The influence of plant growth regulators on the growth of the embryonic axes of red- and far-red- treated lettuce seeds. *Planta* **145**, 511-516.
- Carpita, N. C., Nabors, M. W., Ross, C. W. and Peteric, N. L. (1979b).** The growth physics and water relations of red light induced germination in lettuce seeds. III. Changes in the osmotic and pressure potential in the embryonic axes of red and far-red treated seeds. *Planta* **144**, 217-224.
- Casal, J. and Sánchez, R. (1998).** Phytochrome and seed germination. *Seed Science Research* **8**, 317-329.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A. and F, B. J. (1998).** Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* **49**, 127-138.
- Casal, J. J. (1995).** Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* **196**, 23-29.
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., H., D. B. A. and de Miguel, L. C. (1991).** Light promotion of seed germination in *Datura ferox* is mediated by a highly stable pool of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **53**, 249-254.
- Cerdan, P. D., Yanovsky, M., Reymundo, F. C., Nagatani, A., Staneloni, R. J., Whitelam, G. C. and Casal, J. J. (1999).** Regulation of phytochrome B signalling by phytochrome A and PHY1 in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* **18**, 499-507.
- Chen, F., Dahal, P. and Bradford, K. J. (2001).** Two Tomato Expansins Genes Show Divergent Expression and Localization in Embryos during Seed Development and Germination. *Plant Physiology* **127**, 928-936.
- Chen, F. and Bradford, K. J. (2000).** Expression of an Expansin is Associated with Endosperm Weakening during Tomato Seed Germination. *Plant Physiology* **124**, 1265-1274.
- Chiang, H.-H., Hwang, I. and Goodman, H. M. (1995).** Isolation of the *Arabidopsis GA4* locus. *Plant Cell* **7**, 195-201.
- Chory, J. and Genick, U. G. (2000).** Red light sensing in plants. *Current Biology* **10**, R651-R654.

- Christie, J. M. and Briggs, W. R.** (2001). Blue light sensing in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 11457-11460.
- Clack, T., Mathews, S. and Sharrock, R. A.** (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: The sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Molecular Biology* **25**, 413-427.
- Clough, R. C., Jordan-Beebe, E. T., Lohman, K. N., Marita, J. M., Walker, J. M., Gatz, C. and Vierstra, R. D.** (1999). Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for Pfr ubiquitination and degradation. *Plant Journal* **17**, 155-167.
- Cone, J. W., Jaspers, P. A. P. M. and Kendrick, R. E.** (1985). Biphasic fluence-response curves for light-induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant, Cell and Environment* **8**, 605-612.
- Cordonier-Pratt, M.-M., Pratt, L. H., Hauser, B., Kochert, G. and Caboche, m.** (1994). Comparative analysis of the phytochrome gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Physiology* **105** S-72.
- Cosgrove, D. H.** (2000a). New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 73-78.
- Cosgrove, D. H.** (2000b). Loosening plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321-326.
- Cosgrove, D. H.** (1998). Loosening plant cell walls by expansins. *Plant Physiology* **118**, 333-339.
- Dahal, P. J., Nevins, D. J. and Bradford, K. J.** (1996). Endosperm cell wall sugar composition and sugars released during tomato seed germination. *Plant Physiology* **111**, 160.
- De Greef, J. A. and Fredericq, H.** (1983). Photomorphogenesis and hormones. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (ed. H. M. J. e. W. Shropshire). Berlin: Springer-Verlag.
- de Miguel, L., Burgin, J., Casal J.J. and R.A. Sánchez.** (2000). Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and b-mannanase activity in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1127-1133.
- de Miguel, L., Burgin, J., Casal J.J. and Rodolfo A. Sánchez.** (1999). The inhibition of *Datura ferox* seeds germination by a FR-high irradiance response (HIR):changes in the endosperm and embryo. In *IV International Workshop on Seed Biology*. Mérida Yucatán, México.
- de Miguel L., Iglesias L. and R.A., Sánchez.** (1999). ABA inhibition of Phytochrome-induced germination in *Datura ferox* seeds. In *IV International Workshop on Seed Biology*. Merida,

Mexico.

- de Miguel, L.C. and Sánchez, R.A. Sánchez** (1992). Phytochrome-induced germination, endosperm softening and embryo growth potential in *Datura ferox* seeds: Sensitivity to low water potential and time to escape to FR reversal. *Journal of Experimental Botany* **43**, 969-974.
- Deregibus, V. A., Casal, J. J., Jacobo, E. J., Gibson, D., Kauffman, M. and Rodriguez, A. M.** (1994). Evidence That Heavy Grazing May Promote the Germination of *Lolium multiflorum* Seeds via Phytochrome-Mediated Perception of High Red Far-Red Ratios. *Functional Ecology* **8**, 536-542.
- Derkx, M. P. M. and Karssen, C. M.** (1993). Changing Sensitivity to Light and Nitrate But Not to Gibberellins Regulates Seasonal Dormancy Patterns in *Sisymbrium officinale* Seeds. *Plant. Cell and Environment* **16**, 469-479.
- Doolittle, R. F., feng, D. F., Tsang, S., Cho, G. and Little, E.** (1996). Determining divergence times of the mayor kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science* **271**, 470-477.
- Dutta, S., Bradford, K. J. and Nevins, D. J.** (1994). Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa*). *Plant Physiology* **104**, 345-352.
- Fankhauser, C.** (2001). The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 11453-11456.
- Fankhauser, C.** (2000). Phytochromes as light-modulated protein kinases. *Cell and Developmental Biology* **11**, 467-473.
- Frankland, B. and Taylorson, R. B.** (1983b). Light control of seed germination (review). In *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 16A (ed. W. Shropshire and H. Mohr), pp. 428-456. New York: Springer Verlag.
- Fred M. Ausubel, R. B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl.** (1994). Current Protocols in Molecular Biology. In *Current Protocols* (ed. S. E. V. B. Chanda). New York: John Wiley & Sons.
- Goosey, L. P., L., Sharrock, R. A.** (1997). Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* *PHYB*, *PHYD*, and *PHYE* phytochrome genes. *Plant Physiology* **115**, 959-969.
- Groot, S. P. C. and Karssen, C. M.** (1992). Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. Studies with the sitiens mutant. *Plant Physiol.* **99**, 952-958.

- Groot, S. P. C., Kieliszewska-Rockika, B., Vermeer, E. and Karssen, C. M. (1988).** Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta* **174**, 500-504.
- Groot, S. P. C. and Karssen, C. M. (1987).** Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* **172**, 525-531.
- Halmer, P. and Bewley, J. D. (1979).** Mannanase production by the lettuce endosperm. *Planta* **144**, 333-340.
- Harper, J. (1977).** Populations biology of plants. London: Academic Press.
- Hartmann, K. M. (1966).** A general hypothesis to interpret 'high energy phenomena' of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **5**, 349-366.
- Hennig, L., Stoddart, W. M., Dieterle, M., Whitelam, G. C. and Schäfer, E. (2002).** Phytochrome E Control Light -Induced Germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **128**, 194-200.
- Hennig, L., Poppe, C., Sweere, U., Martin, A. and Schäfer, E. (2001).** Negative Interference of endogenous Phytochrome B with Phytochrome A Function in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **125**, 1036-1044.
- Hennig, L., Poppe, C., Unger, S., Schäfer, E. (1999).** Control of hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* by photoreceptor interaction. *Planta* **208**, 257-263.
- Hilhorst, H. and Karssen, C. (1988).** Dual effect of light on the gibberellin- and nitrate-stimulated seed germination of *Sisymbrium officinale* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **86**, 591-597.
- Hirschfeld, M., Clack, T. and Sharrock, R. A. (1998).** Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of *Arabidopsis* as revealed by aporoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* **149**, 523.
- Insausti, P., Soriano, A. and Sánchez, R. A. (1995).** Effects of flood-related factors on seed germination of *Ambrosia tenuifolia*. *Oecologia* **103**, 127-132.
- Izumi, K., Kamiya, Y., Sakurai, A., Oshio, H. and Takahashi, N. (1985).** Studies of site of action of a new plant growth retardant S-3307 and comparative effects of its stereoisomers in cell-free system from *Cucurbita maxima*. *Plant and Cell Physiology* **26**, 821-827.
- Kamiya, Y. and García-Martínez, J. L. (1999).** Regulation of gibberellin biosynthesis by light.



- Current Opinion in Plant Biology* **2**, 398-403.
- Kendrick, R. E. and Spruit, C. J. P.** (1977). Phototransformations of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **26**, 201-214.
- Koorneef, M., Bentsink, L. and Hilhorst, H.** (2002). Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 33-36.
- Lagarias, C.** (1985). Progress in the molecular analysis of phytochrome. *Photochemistry and Photobiology*. **42(6)**, 811-820.
- Leubner-Metzger, G. and Meins, F.** (2000). Sense transformation reveals a novel role for class I  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco seed germination. *Plant Journal* **23**, 215-221.
- Leubner-Metzger, G., Frundt, C., Voegeli-Lange, R. and Meins Jr., F.** (1995). Class I  $\beta$ -1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology* **109**, 751-759.
- Mancinelli, A. L.** (1994). The physiology of phytochrome action. In *Photomorphogenesis in plants* (ed. R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- McCarty, D. R. and Chory, J.** (2000). Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* **103**, 201-209.
- McQueenmason, S. J.** (1995). Expansins and cell wall expansion (SEB President's Medal Review Article). *Journal of Experimental Botany* **46**, 1639-1650.
- McQueenmason, S., Durachko, D. M. and Cosgrove, D. J.** (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *The Plant Cell* **4**, 1425-1433.
- Mella, A. B., M. J.; Staneloni, R. and Sánchez, R. A.** (2000). Expansins gene expression is regulated by phytochrome during dormancy breakage in *Datura ferox* L. seeds. San Diego, USA: American Society of Plant Physiology.
- Mella, R. A., Maldonado, S. and Sánchez, R. A.** (1995). Phytochrome-induced structural changes and protein degradation prior to radicle protrusion in *Datura ferox* seeds. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1371-1378.
- Negbi, M. and Koller, D.** (1964). Dual action of white light in the photocontrol of germination of *Oryzopsis miliacea*. *Plant Physiology* **39**, 247-253.
- Ni, B. R. and Bradford, K. J.** (1993). Germination and dormancy of abscisic acid-and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiology*

101, 607-617.

- Nomaguchi, M., Nonogaki, H. and Morohashi, Y. (1995).** Development of galactomannan-hydrolyzing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Physiol Plant* **94**, 105-109.
- Nonogaki, H., Gee, O. and Bradford, K. (2000).** A germination specific endo-b-mannanase gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiology* **123**, 1235-1245.
- Nonogaki, H. a. M., Y. (1999).** Temporal and spatial patterns of endo-b-mannanase expression in lettuce seeds. *IV International Workshop on Seeds Biology, Merida, Mexico. .*
- Nonogaki, H., Nomaguchi, M. and Y., M. (1998).** Temporal and spatial pattern of the biochemical activation of the endosperm during and following imbibition of tomato seeds. *Physiologia Plantarum* **102**, 236.
- Nonogaki, H. and Morohashi, Y. (1996).** An endo-b-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiology* **110**, 555-559.
- Nonogaki, H., Matsushima, H. and Morohashi, Y. (1992).** Galactomannan hydrolysing activity develops during priming in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Physiologia Plantarum* **85**, 167-172.
- Poppe, C. and Schafer, E. (1997).** Seed germination of *Arabidopsis thaliana* phyA/phyB double mutants is under phytochrome control. *Plant Physiology* **114**, 1487-1492.
- Pratt, L. H., Cordonier-Pratt, M.-M., Kelmenson, P. M., Lazarova, G. I., Kubota, T. and Alba, R. M. (1997).** The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell and Environment* **20**, 672-677.
- Psaras, G., Georghiu, K. and Mitrakos, K. (1981).** Red-light induced endosperm preparation for radicle protrusion of lettuce embryos. *Botanical Gazette* **142**, 13-18.
- Reed, W. (1999).** Phytochromes are Pr-iptetic kinases. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 393-397.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M. and Chory, J. (1993).** Mutations in the gene for the Red/Far-Red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**, 147-157.
- Rethy, R., Dedonder, A., De Petter, E., Van Wiemeersch, L., Fredericq, H., De Greef, J.,**

- Steyaert, H. and Stevens, H. (1987).** Biphasic fluence-response curves for phytochrome-mediated *Kalanchoe* seed germination. *Plant Physiology* **83**, 126-130.
- Rudiger, W. and Thummler, F. (1994).** The phytochrome chromophore. In *Photomorphogenesis in Plants* (ed. R. E. K. a. G. H. M. Kronenberg): Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Sánchez, R. A. and de Miguel, L. C. (1997).** Phytochrome promotion of mannan-degrading enzyme activities in the micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds requires the presence of the embryo and gibberellin synthesis. *Seed Science Research* **7**, 27-33.
- Sánchez, R. A. and de Miguel, L. C. (1992).** Phytochrome-induced germination, endosperm softening and embryo growth potential in *Datura ferox* seeds: sensitivity to low water potential and time to escape to RF reversal. *Journal of Experimental Botany* **43**, 969-974.
- Sánchez, R. A., Sunell, L., Labavitch, J. and Bonner, B. A. (1990).** Changes in endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. *Plant Physiology* **93**, 89-97.
- Sánchez, R. A., de Miguel, L. and Mercuri, O. (1986).** Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. *Journal of Experimental Botany* **37**, 1574-1580.
- Sánchez, R. A. and de Miguel, L. (1985).** The effect of red light, ABA and K<sup>+</sup> on the growth rate of *Datura ferox* embryos and its relations with the photocontrol of germination. *Botanical Gazette* **146**, 472-476.
- Sauer, J. and Struik, G. (1964).** A possible ecological relation between soil disturbance, light flash and seed germination. *Ecology* **45**, 884-886.
- Schopfer, P. and Plachy, C. (1993).** Photoinhibition of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination: control of growth potential by cell-wall yielding in the embryo. *Plant, Cell and Environment* **16**, 223-229.
- Scopel, A. L., Ballaré, C. L. and Sánchez, R. A. (1991).** Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant Cell and Environment* **14**, 501-508.
- Sharrock, R. A. and Quail, P. H. (1989).** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes and Development* **3**, 1745-1757.
- Shichijo, C., Katada, K., Tanaka, O. and Hashimoto, T. (2001).** Phytochrome A-mediated

- inhibition of seed germination in tomato. *Planta* **213**, 764-769.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M. and Furuya, M.** (1996). Action spectra for phytochrome A- and phytochrome B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 8129-8133.
- Smith, H.** (2000). Phytochromes and light signal perception by plants -an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-91.
- Smith, H.** (1999). Phytochromes: tripping the light fantastic. *Nature* **400**, 781-784.
- Smith, H.** (1979). Photoperception and regulation of plant development. *Biochemical Society Transactions* **7**, 1231-1236.
- Soriano, A., de Eilberg, B. A. and Suero, A.** (1971). Effects of burial and changes of depth in the soil on seeds of *Datura ferox*. *Weed Research* **11**, 196-199.
- Soriano, A., Sánchez, R. A. and Eilberg, B. A.** (1964). Factors and processes in the germination of *Datura ferox* L. *Canadian Journal of Botany* **42**, 1189-1203.
- Taylorson, R. and Hendricks, S.** (1977). Dormancy in Seeds. *Annu. Rev. in Plant Physiology* **28**, 331-354.
- Toorop, P. E., van Aelst, A. C. and Hilhorst, M. W.** (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (*Lycopersicon sculentum*) seed germination is under control of ABA. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1371-1379.
- Toorop, P. E., Bewley, J. D. and Hilhorst, H. W. M.** (1996). Endo-b-mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta* **200**, 153-158.
- Toshinori, K., Michio, D., Noriyuki, S., Takatoshi, K., Masamitsu, W. and Shimazaki, K.** (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656-659.
- Toyomasu, T., Kawaide, H., Mitsubishi, W., Inoue, Y. and Kamiya, Y.** (1998). Phytochrome regulates gibberillin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology* **118**, 1517-1523.
- Toyomasu, T., Tsuji, H., Yamane, H., Nakayama, M., Yamaguchi, I., Murofushi, N., Takahashi, N. and Inoue, Y.** (1993). Light Effects on Endogenous Levels of Gibberellins in Photoblastic Lettuce Seeds. *Journal of Plant Growth Regulators* **12**, 85-90.

- Trewavas, A. J.** (2002). Mindless mastery. *Nature* **445**, 841.
- Trewavas, A. J.** (1999). The importance of individuality. In *Plant responses to environmental Stresses* (ed. E. H. R. Lerner). New York. Basel: Marcel Dekker INC.
- VanDerWoude.** (1985). A dimeric mechanism for the action of phytochrome: evidence from photothermal interactions in lettuce seed germination. *Photochemistry and Photobiology* **42**, 655-661.
- VanDerWoude, W. J. and Toole, V. K.** (1980). Studies of the mechanism of enhancement of phytochrome-dependent lettuce seed germination by prechilling. *Plant Physiology* **66**, 220-224.
- Vázquez-Yañez, C. and Smith, H.** (1982). Phytochrome control of seed germination in the tropical rain forest pioneer trees *Cecropia obtusifolia* and *Piper auritum* and its ecological significance. *New Phytologist* **92**, 477-485.
- Vierstra, R. D. and Davis, S. J.** (2000). Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Cell and Developmental Biology* **11**, 511-521.
- Vierstra, R. D.** (1994). Phytochrome degradation. In *Photomorphogenesis in plants* (ed. R. E. Kendrick, Kronenberg, G. H. M.), pp. 141-162. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Vierstra, R. and Quail, P.** (1983). Photochemistry of 124 kilodalton *Avena* phytochrome *in vitro*. *Plant Physiology* **72**, 264-267.
- Voigt, B. and Bewley, J. D.** (1996). Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- $\beta$ -mannanase: response to desiccation, abscisic acid and osmoticum. *Planta* **200**, 71-77.
- Wang, Y.-C., Stewart, S., Cordonnier, M.-M. and Pratt, L.** (1991). *Avena sativa* L. contains three phytochromes, only one of which is abundant in etiolated tissue. *Planta* **184**, 96-104.
- Watkins, J. T. and Cantliffe, D. J.** (1983). Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. *Plant Physiology* **72**, 146-150.
- Wesson, G. and Wareing, P. F.** (1969a). The induction of light sensitivity in weed seeds by burial. *Journal of Experimental Botany* **20**, 414-425.
- Wesson, G. and Wareing, P. F.** (1969b). The role of light in the germination of naturally occurring populations of buried weed seeds. *Journal of Experimental Botany* **20**, 402-413.

- Wulff, R. (1995).** Environmental maternal effects on seed quality and germination. In *Seed development and germination*. Ed. M. Negbi, G. Galili and J. Kigel. New York: Marcel Dekker Publication.
- Yamaguchi, S. S., M.W.; Brown, R.G.S.; Kamiya, Y and Tai-ping Sun. (1998).** Phytochrome regulation and differential expression of gibberillin 3b-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell* **10**, 2115-2126.
- Yang, Y. Y., Nagatani, A., Zhao, Y. J., Kang, B. J., Kendrick, R. E. and Kamiya, Y. (1995).** Effects of gibberellins on seed germination of phytochrome- deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **36**, 1205-1211.