Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

FOTOCONTROL DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS, DESARROLLO DE PLÁNTULAS Y SU RELACIÓN CON REGULADORES DE CRECIMIENTO

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Licenciada María Verónica Arana

Director: Dr. Rodolfo Augusto Sánchez

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Iussem

Instituto de Investigaciones Fisiológicas y Ecológicas Vinculadas a la Agricultura – CONICET

Facultad de Agronomía-Univesidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Junio de 2006

FOTOCONTROL DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS, DESARROLLO DE PLÁNTULAS Y SU RELACIÓN CON REGULADORES DE CRECIMIENTO

Nombre de los Jurados	Firma	Calificación
……..	……	……..
……..	……	……..
……..	……..	….……

FOTOCONTROL DE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS, DESARROLLO DE PLÁNTULAS, Y SU REGULACIÓN CON REGULADORES DE CRECIMIENTO

RESUMEN

La luz, percibida a través de los fitocromos, modula una gran variedad de aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. En esta tesis se ha avanzado en la comprensión de dos efectos de la luz percibida por las semillas: (a) el control de la sensibilidad a las giberelinas (GA) y (b) el establecimiento de una señal que perdura hasta después de completada la germinación y regula las respuestas de las plántulas.

En numerosas especies la luz promueve la germinación, y las giberelinas son un nexo importante entre la percepción del estímulo lumínico a través de los fitocromos, y algunos procesos de extrema relevancia para la germinación. Los fitocromos inducen un aumento en el contenido de GA activas en lechuga y *Arabidopsis*, en parte mediante la regulación positiva de los genes de su biosíntesis. También en algunas especies aumentan la sensibilidad a las GA.

En este trabajo se demuestra que en *Arabidopsis thaliana* el fitocromo B es el principal fotorreceptor del estímulo de la sensibilidad a las GA y se describe la participación de los fitocromos D y E. En *Datura ferox* los fitocromos estimulan la sensibilidad a las giberelinas para la germinación a través de la producción de un factor embrionario, que promueve la respuesta a esta hormona en las células del embrión y en las del endosperma micropilar. Los fitocromos modulan la acumulación de transcriptos de *DfPHOR* y *DfMYB* en el endosperma micropilar, los cuales comparten alta identidad de secuencia con componentes de la señalización de las giberelinas. Mientras que la regulación de *DfPHOR* por los fitocromos estaría mediada a través del incremento en los contenidos de GA, los cambios en *DfMYB* están controlados por un factor embrionario, con características similares al que regula la sensibilidad a las GA sugiriendo su participación en el fotocontrol de la sensibilidad a las GA en el endosperma. Los resultados indican que las citocininas son componentes río debajo de la señal lumínica que modula la respuesta de las semillas a las GA. Apoyando los resultados con *D. ferox*, en *Arabidopsis* la pérdida de función de *CKH1-1* ó de *CKH2-1* promueve la respuesta de la germinación a la luz y a las GA.

Por otro lado, en *D. ferox*, el ABA suprime el incremento del potencial de crecimiento del embrión, y esto está relacionado con una disminución de la respuesta a las giberelinas en este órgano. En *Arabidopsis*, se observó una relación antagónica entre la acción de componentes que regulan positivamente la señalización del ABA y la de los fitocromos en la germinación. Esta relación ha sido observada también en plántulas.

Se ha demostrado que la luz percibida por las semillas no sólo modula la germinación sino que además controla, a través de cambios en la expresión de *ABI3*, la respuesta a la luz de las plántulas que de ellas derivan. De esta manera las señales luminosas percibidas por las semillas podrían contribuir a que las plántulas se ajusten al ambiente que con más probabilidad van a encontrar y mejorar sus posibilidades de establecimiento.

PALABRAS CLAVES: Ácido Abscísico, Germinación, Giberelinas, Fitocromos, Fotomorfogénesis.

PHOTOCONTROL OF SEED GERMINATION, SEEDLING DEVELOPMENT, AND ITS RELATION WITH PLANT GROWTH REGULATORS

SUMMARY

Light, perceived through the phytochrome system, modulates a wide range of developmental steps of plants. This thesis has contributed to the knowledge of two effects of light perceived by the seeds: (a) the control of gibberellins (GA) and abscisic acid (ABA) sensitivity and (b) the establishment of a signal that lasts after germination is completed, and regulates light responses of seedlings.

Light promotes seed germination in several species, and gibberellins are important links between the light signal perceived by the seeds and the processes controlling germination. In *lettuce* and *Arabidopsis*, the phytochromes stimulate an increment in gibberellins contents of seeds, and this is associated with a positive regulation of genes involved in GA biosynthesis. In some species, light also stimulates the sensitivity of the seeds to GA.

In this work it is shown that in *Arabidopsis thaliana* the phytochrome B is the main photorreceptor that stimulates GA responses in seeds, and the role of phytochrome D and E is also described. In *D. ferox*, the phytochromes also stimulate gibberellins sensitivity for germination, through the production of an embryonic factor that modulates gibberellins responses in embryos and micropylar section of the endosperm. The phytochromes promote *DfPHOR* and *DfMYB* transcript accumulation in micropylar endosperms. These genes show high identity with components of gibberellins signaling. Expression of *DfPHOR* is apparently regulated by phytochrome through the supply of gibberellins from the embryo to micropylar endosperm, whereas *DfMYB* expression is regulated by an embryonic factor, with some of the characteristics of the one that regulates gibberellins sensitivity in seeds. There are strong evidences that cytokinins are components of the light signal that promotes gibberellins response for germination. In accordance with these results, the lack of function of *CKH1-1* or *CKH2-1* in *Arabidopsis*, promotes light and gibberellins responses in seeds.

On the other hand, ABA suppresses the stimulus of embryo growth potential in *D. ferox*, and this is associated with a decrease in gibberellins response of embryonic cells. In *Arabidopsis*, there is an antagonism between the action of components that promotes ABA responses and the action of phytochromes for the promotion of germination. This relation has also been observed in seedlings.

It has been shown that the light environment perceived by the seeds not only controls germination but also modulates, through changes in *ABI3* expression, light responses in seedlings. In this way, light signals perceived by the seeds would contribute to the adjustment of the seedlings to their most probably light environment, improving their possibilities of establishment in their habitat.

KEY WORDS: Abscisic Acid, Gibberellins, Photomorphogenesis, Phytochromes, Seed germination.

Agradecimientos

Al Dr. Rodolfo Sánchez, por su gran apoyo y su invalorable contribución a mi formación. Por acompañarme diariamente en el descubrimiento de la belleza de la naturaleza, enseñarme a explorarla y a describir algunas de sus partes.

Al Dr. Jorge Casal, por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado, y por su contribución a mi formación. Al Dr. Roberto Staneloni, por haberme abierto las puertas de su laboratorio en todo momento, y por su asesoramiento en los aspectos moleculares de la fisiología vegetal. Al IFEVA, por brindarme un sitio de trabajo, y a CONICET y la UBA por la financiación.

A Lucila, por enseñarme algunos de los secretos sobre el comportamiento de las semillas, también por cariño y apoyo constante.

A María José, por transmitirme con tanto entusiasmo su experiencia y su fuerza durante las primeras etapas de esta tesis, y por estar cerca siempre.
A Gaby, por todo su apoyo, y el tiempo compartido. A Ana Laura, por su ayuda en los últimos momentos.

A mis compañeros de laboratorio; Hernán Boccalandro, Sabrina Buchovsky, Sabrina Sánchez, Laura Luccioni, Karina Oliverio, Mariana Rutizky, María Crepi, Constanza Rossi, Santiago Trupkin, Matías Rugnone, Leo Storani, Ana Faigón, Romina Sellaro, Elizabeth, Paula Coluccio, Paula, Carlos.

A mis compañeros de oficina; Mariela Szwarcberg, Gonzalo Grigera, Gervasio Piñeiro, Carla Giordano y en especial a Pedro Flombaum, por su constante compañía.

A todos los que contribuyeron de alguna manera a esta tesis, transmitiéndome conocimientos, materiales, y buena onda en los diversos momentos difíciles que pasé.

A mis compañeros y amigos del IFEVA, en especial a Miriam Izaguirre, Alfonsina Szpeiner, Hernán Boccalandro y Mariano Oyarzábal, por hacer de este lugar algo más que un sitio de trabajo y formación.

A mi papá Eduardo, por recordarme siempre que las golondrinas ya habían emprendido su vuelo hacia aquí, durante los inviernos de mi alma.

A mi mamá Graciela y hermanos Gabi, San y Leli, por ser la fuerza espiritual, y recordarme siempre con su cariño que el mundo es muy grande. A mis tíos, primos y abuelos, por nuestra unión, en las buenas y en las malas.

Al Chinito, por todo su cariño siempre, y por alumbrar de una manera única mi vida. Por recordarme día a día que caminamos juntos.

A mis amigos de siempre, dispersos por el mundo; Luisa, Paio, Soledad, Tanner, Ana y Natalia.

A Gladys y a la familia Clemente, de Balcarce, por toda su hospitalidad y por brindarme sus campos para buscar *Daturas*…

Finalmente quiero agradecer a Carl Sagan, aunque él no se entere, por sembrar en mi niñez mis primeras preguntas sobre la naturaleza y mostrarme, desde ese entonces, un camino fascinante que no se cuándo terminará.

Al Tato, mi abuelo.

Por su constante aliento a lo largo de este camino,

y por ser siempre ese hermoso ejemplo de vida.

Los contenidos de esta tesis fueron total o parcialmente incluidos en las siguientes publicaciones:

2006 **María Verónica Arana,** Lucila C. de Miguel, L.C., Rodolfo A. Sánchez. A phytochrome-dependent embryonic factor modulates gibberellin responses in the embryo and micropylar endosperm of *Datura ferox* seeds. **Planta**, Vol 223, 847-857

2005 María Agustina Mazzella*, **María Verónica Arana*,** Roberto J. Staneloni, Susana Perelman, María J. Rodriguez Batiller, Jorge Muschietti, Pablo Cerdán, Kunhua Chen, Rodolfo A. Sánchez, Tong Zhu, Joanne Choryand Jorge J. Casal (2005). Phytochrome control of *Arabidopsis* transcriptome anticipates seedling exposure to light. *** Igual contribución de los autores**. **The Plant Cell**, Vol 17, 1-10.

ABREVIATURAS:

ABA	ácido abscísico
D.E.M.	desvío estándar de la media
DfExpa1	gen de *Datura ferox* para expansina 1
DfGA20-ox	gen de *D. ferox* para expansina 2
DfGA3ß-hy	gen de *D. ferox* para GA 3ß-hidroxilasa
DfMan	gen de *D. ferox* para endoß-mananasa
DfMYB	gen de *D. ferox* con alta identidad de secuencia a *GAMYB*
DfPHOR	gen de *D. ferox* con alta identidad de secuencia a *PHOR1*
DfSPY	gen de *D. ferox* con alta identidad de secuencia a *SPY*
GA_3	Ácido giberélico
HIR	Respuesta a altas irradiancias
LFR	Respuesta a bajos flujos
P	Pr + Pfr
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
Pfr	forma activa de los fitocromos
PHY	Fitocromos
PHYA-E	Fitocromo A-E
Pr	forma inactiva de los fitocromos
R	luz roja
RL	luz roja lejana
RLc	luz roja lejana continua
RLp	luz roja lejana pulsos
Rp	luz roja lejana pulsos
RT	Reacción de retro-transcripción
VLFR	respuesta a muy bajos flujos
ZEA	zeatina

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL 1

INRODUCCIÓN GENERAL 2

Percepción del ambiente lumínico en la región del R y RL: Los fitocromos 3
Estructura y propiedades de los fitocromos 4
Funciones fisiológicas y ecológicas de los fitocromos 8
Modos de acción de los fitocromos 11
Roles del PHYA 13
Roles del PHYB 14
Roles de los PHYC, PHYE y PHYD 15
Dormición y germinación 15
Fisiología de la dormición impuesta por las cubiertas: fitocromos y hormonas 17
Fitocromos en las semillas 21
Desarrollo de la plántula 22
Giberelinas y ácido abscísico 23
OBJETIVOS DE LA TESIS 27

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA RESPUESTA A LAS GIBERELINAS EN LAS SEMILLAS DURANTE LA PROMOCIÓN DE LA GERMINACIÓN POR LUZ 29

INTRODUCCIÓN 30

MATERIALES Y MÉTODOS 34

RESULTADOS 42

La luz roja aumenta la respuesta a las giberelinas en la germinación 42
El aumento del potencial de crecimiento del embrión mediado por R requiere de la biosíntesis de novo de giberelinas 45
La luz, mediante los fitocromos, modula la respuesta a las giberelinas en las células del embrión 47
Los fitocromos, a través una LFR, regulan la respuesta a las giberelinas del endosperma micropilar 48
La señal lumínica que modula la respuesta al GA en el endosperma micropilar es percibida por el embrión 52
Clonado y caracterización de fragmentos de genes que participan en la vía de transducción de las giberelinas, en embrión y endosperma micropilar 55
Regulación por fitocromos de la expresión de genes que participan en la vía de transducción de las giberelinas durante la inducción de la germinación en D. ferox 58
Influencia del embrión sobre la acumulación de mensajeros de DfPHOR, DfMYB y DfSPY en endosperma micropilar 60
El aumento de los niveles de citocininas endógenas, por medio de la sobreexpresión del gen isopentil-adenina trasferasa en Arabidopsis, aumenta la sensiblidad a las giberelinas de en semillas tratadas con un pulso de RL 63
La pérdida de función de los alelos CKH1-1 y CKH2-1, los cuales regulan negativamente la acción de las citocininas en cultivos in vitro, promueve la respuesta de la germinación a las giberelinas 66

DISCUSIÓN 69

Respuesta de las semillas de D. ferox a las giberelinas, y su relación con el estímulo lumínico de la germinación 69
Bases moleculares de la modulación por fitocromos de la respuesta a las giberelinas en semillas 72
Relación entre giberelinas y citocininas en la promoción de la germinación por los fitocromos en semillas de Arabidopsis 75

CONCLUSIONES 78

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LOS FITOCROMOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS GIBERELINAS EN LA GERMINACIÓN 80

INTRODUCCIÓN 81

MATERIALES Y MÉTODOS 84

RESULTADOS 85
Los PHYB y PHYE participan en la promoción de la respuesta a las giberelinas en la germinación de semillas de Arabidopsis 85
La respuesta a las giberelinas del mutante triple phyB phyE phyD está bajo el control de los fitocromos 86
La pérdida de función de PHYD estimula la respuesta a las giberelinas bajo RL en mutantes phyB y en RL y oscuridad en las mutantes phyE 88
Respuesta a las giberelinas en oscuridad 90
Respuesta a la luz de los mutantes de fitocromo 91

DISCUSIÓN 94

CONCLUSIONES 98

CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE ALGUNOS COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ABA Y LOS FITOCROMOS EN LA GERMINACION Y FOTOMOFOGÉNESIS 99

INTRODUCCIÓN 100

MATERIALES Y MÉTODOS 103

RESULTADOS 105
El ABA inhibe la germinación mediada por luz en D. ferox, y el agregado de zeatina antagoniza este efecto 105
El ABA disminuye la respuesta de las células del embrión al GA, y el agregado de zeatina suprime este efecto 106
Interacciones entre las vías de señalización del ABA y los fitocromos en el estímulo de la germinación mediada por luz de Arabidopsis 108
Interacciones entre las vías de señalización del ABA y los fitocromos en la desetiolación 112
La luz, percibida por los fitocromos en las semillas, controla la expresión del gen ABI3 en las plántulas derivadas de estas 115
La respuesta que controla la actividad del promotor ABI3 en plántulas es del tipo LFR, y su intensidad es dependiente del tiempo de exposición de la semilla a la luz R 118
La señal proveniente de las semillas que controla la expresión de ABI3 en plántulas no es la forma activa del fitocromo 120
La respuesta a la luz de las plántulas está inversamente asociada a la intensidad de expresión de ABI3 120
El ambiente lumínico percibido por la semilla modula las respuestas a la luz de las plántulas 123

DISCUSIÓN 125
Relaciones entre el ABA y la promoción de la germinación por los fitocromos 125
Relaciones entre componentes de señalización del ABA y las respuestas mediadas por los fitocromos en plántulas 128

CONCLUSIONES 132

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS 134

BIBLIOGRAFÍA 142

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

INRODUCCIÓN GENERAL

La percepción de cambios en el ambiente natural es de la mayor relevancia para los organismos vivos. En particular, la luz es una señal importante que condiciona el comportamiento y crecimiento de los seres vivos, a la cual estos responden de diversas maneras. Las respuestas pueden ser simples, como la *fototaxia* de los organismos unicelulares o complejas, como las de los animales superiores los cuales utilizan señales, percibidas a través de la visión, para modificar su comportamiento.

Debido a su naturaleza sésil y a que la luz constituye su única fuente de energía, las plantas han desarrollado respuestas especialmente plásticas a su ambiente lumínico. Esto significa que individuos de una misma especie son capaces de mostrar fenotipos muy diversos dependiendo de las características del entorno lumínico donde se desarrollan. Esta plasticidad fenotípica les permite crecer en armonía con los cambios diarios y estacionales de luz, optimizando la captación de energía y la aclimatación a cambios constantes en el ambiente.

La radiación solar que llega a la superficie de la tierra abarca una amplia franja del espectro electromagnético **(Fig. I 1)**. Mientras que las ondas gamma y ultravioleta (UV) constituyen un 2% del total de esta radiación, la luz visible comprende el 40%, y la infrarroja el 58%. Esta radiación solar puede ser absorbida, reflejada o transmitida por distintos elementos existentes en la superficie terrestre, ocurriendo entonces cambios en su cantidad y calidad.

Los cambios en las regiones del espectro comprendidas entre los 600-700 y 700-800 nm, correspondientes a las zonas de luz roja (R) y roja lejana (RL) respectivamente; contienen información sobre el entorno de particular importancia para las plantas. Por ejemplo, la relación R/RL en un determinado ambiente está asociada a la densidad de follaje y proximidad de plantas vecinas. Mientras que esta relación es cercana a 1.1 en suelos desnudos, la misma disminuye notablemente bajo un canopeo denso o en presencia de plantas vecinas **(Fig. I 2)**. Esto se debe a que las clorofilas de los órganos fotosintéticos de las plantas absorben mucho más intensamente la luz R que la RL (Cumming, 1963; Casal, 2002).

La familia de fotorreceptores que absorben luz principalmente en esta región del espectro se denomina fitocromos (Butler *et al.*, 1959). Por lo tanto, los fitocromos funcionan como

estimadores de los cambios en el ambiente lumínico que ocurren dentro de las comunidades de plantas, cuando la luz del sol interacciona con las estructuras fotosintéticas. Además los fitocromos intervienen en la percepción de las diferencias entre luz y oscuridad por ejemplo, durante la emergencia de la plántula a la superficie del suelo (Smith, 2000).

Además de los fitocromos, se han caracterizado dos familias más de fotorreceptores; los criptocromos (Cashmore *et al.*, 1999) y las fototropinas (Briggs *et al.*, 2001), los cuales absorben luz en la región del espectro del azul/ ultravioleta A. Mientras que los fitocromos y los criptocromos poseen un importante papel en la regulación del desarrollo de las plantas, las fototropinas están involucradas en el control del fototropismo y el movimiento de los cloroplastos (Casal, 2002).

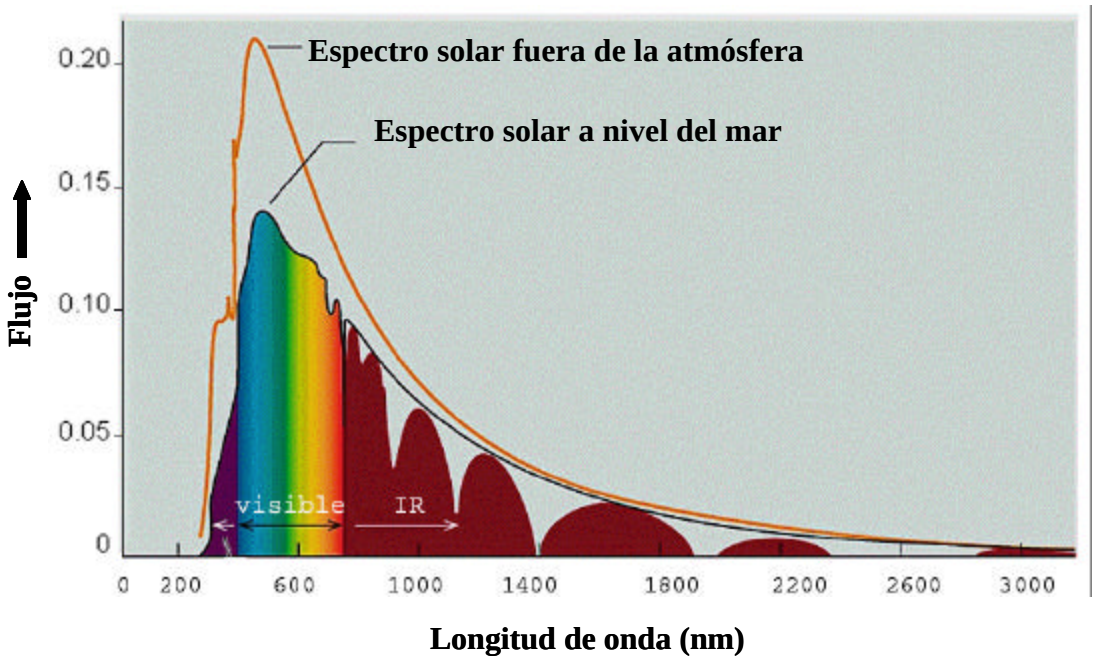


Fig. I 1. Esquema de la calidad de luz solar y su flujo relativo incidente en la superficie de la tierra, a nivel del mar.

Percepción del ambiente lumínico en la región del R y RL: Los fitocromos

De las familias de fotorreceptores mencionadas, los fitocromos son el grupo que se encuentra mejor caracterizado tanto a nivel bioquímico como fisiológico. En las especies estudiadas, los fitocromos se encuentran codificados por una pequeña familia multigénica. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, se conocen 5 genes distintos que codifican para estos fotorreceptores, los cuales fueron llamados fitocromos A, B, C, D y E (*PHYA-E*) (Casal, 2002).

Los análisis filogenéticos de las secuencias de los fitocromos de plantas superiores indican que existieron cuatro eventos de duplicación génica los cuales dieron origen a los distintos fotorreceptores de esta familia (Mathews y Sharrock, 1997). La primera, la cual ocurrió con el surgimiento de las fanerógamas, generó las líneas *PHYA/C* y *PHYB/D/E*. Dos duplicaciones posteriores, alrededor del momento en que se originan las angiospermas, separaron el *PHYA* del *PHYC*, y el *PHYB/D* del *PHYE*. Los *PHYB* y *PHYD* divergieron mucho más recientemente. Estos procesos evolutivos crearon una familia de proteínas que detectan señales ambientales relativamente similares pero capaces de desencadenar respuestas fisiológicas de diversos tipos en las plantas, por ejemplo, la inducción de la germinación o de la floración. Estos genes, además de ser hallados en plantas superiores, se encontraron en helechos, musgos, algas y bacterias. Si bien existen algunas diferencias en cuanto al tipo de cromóforo o del aminoácido al que este se une, en todas las especies estudiadas las regiones conservadas parecen estar involucradas en la percepción de la luz (Smith, 2000).

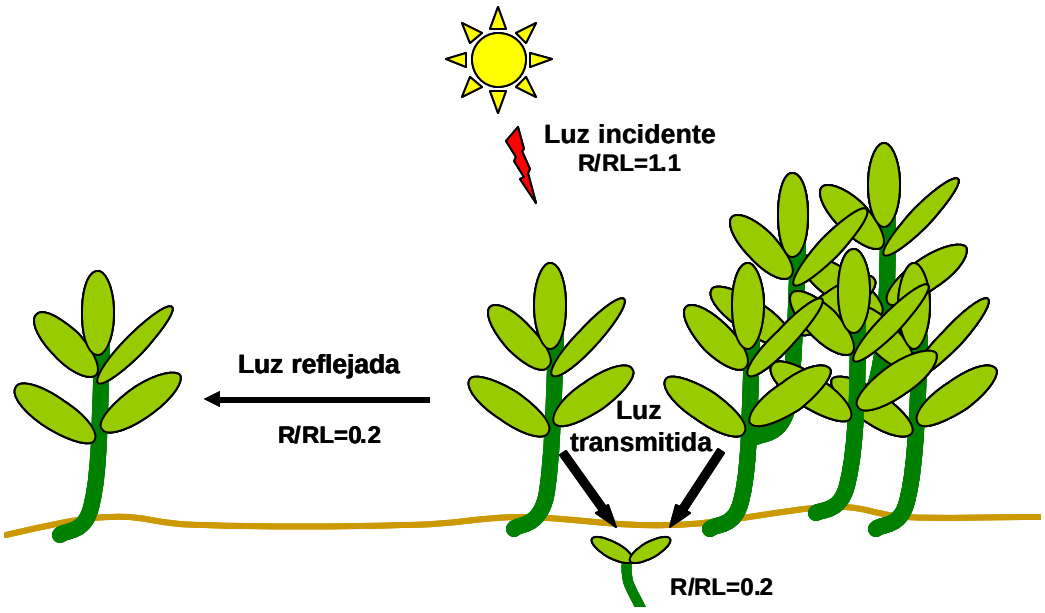


Fig. I 2. Modificaciones en la calidad de luz transmitida o reflejada por un canopeo.

Estructura y propiedades de los fitocromos

Los fitocromos son cromoproteínas diméricas, cuyos monómeros poseen un peso molecular alrededor de los 120-130 kDa. La molécula del fitocromo puede ser dividida en dos regiones funcionales principales: la región amino-terminal que es el *sensor de la señal*, y posee

un cromóforo unido covalententemente, y la región C-terminal, o de *transducción de la señal*, la cual contiene dos dominios relacionados a los Per/Arnt/Sim (PAS) y un dominio relacionado a los de histidina kinasa de bacterias **(Fig. I 3A)** (Kim *et al.*, 2002). El grupo cromóforo consiste en un tetrapirrol de cadena abierta, denominado fitocromobilina, el cual absorbe principalmente luz R o RL, modificando su conformación **(Fig. I 3B y C)**. La excitación del cromóforo modifica la configuración de la proteína, alterando su capacidad de acción biológica.

Una característica notable de los fitocromos es su fotoconversión **(Fig. I 3B)**. La forma *Pr*, la cual tiene un máximo de absorción en el R (660 nm), cambia su configuración a la forma *Pfr* cuando absorbe luz. El Pfr, considerado la forma activa, muestra un máximo de absorción en la franja del espectro del RL (730 nm), volviendo a la configuración de la forma Pr cuando absorbe luz **(Fig. I 3B)**. Sin embargo, es importante notar que existe un solapamiento entre los espectros de absorción de ambas formas **(Fig. 3C)**. Esto implica que cuando un tejido vegetal es expuesto a la luz, la fotoconversión entre las formas Pr y Pfr ocurre en ambos sentidos, estableciéndose así una determinada relación de Pfr/fitocromo total (Pfr/P). Por ejemplo, un pulso saturante de luz R establecerá una relación máxima Pfr/P de 0.87, mientras que la exposición de los tejidos a luz de 730 nm no será capaz de transformar todo el fitocromo activo a la forma Pr, sino que establecerá una relación mínima de Pfr/P de 0.03.

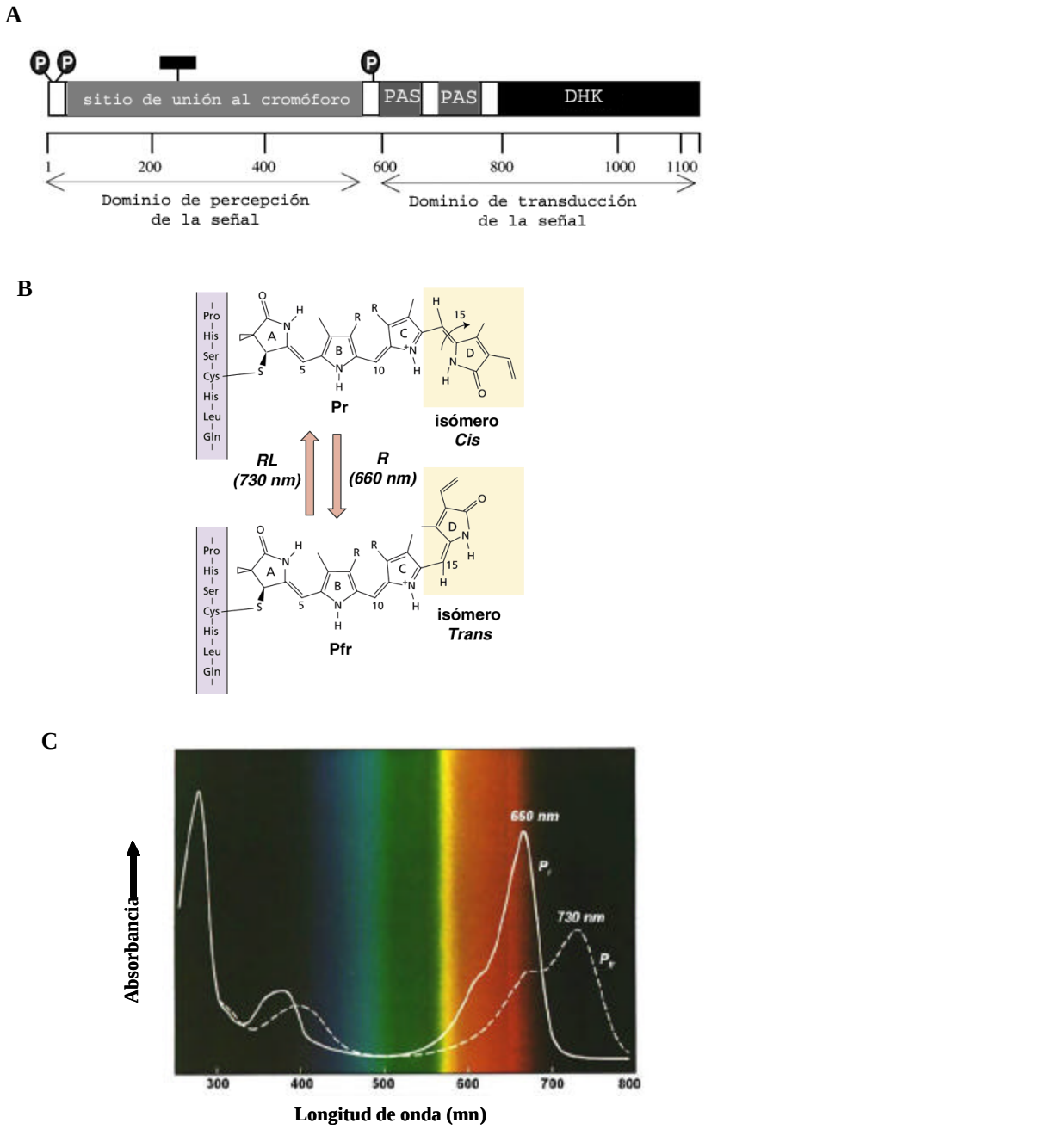


Fig. I 3. Características de los fitocromos. **(A)** Estructura de los dominios que componen a una molécula genérica de los fitocromos. El sitio de unión al cromóforo se indica con un rectángulo negro. P: zonas donde ocurre fosforilación; PAS; sitios con homología a dominios PAS, DHK; región con alta homología a los dominios histidina kinasa de bacterias. Los números indican la posición de aminoácidos en la cadena polipeptídica. **(B)** Esquema que muestra los cambios conformacionales del cromóforo en la interconversión de Pr a Pfr por absorción de luz. **(C)** Espectro de absorción de las formas Pr y Pfr de los fitocromos. Adaptado de (Taiz y Zeiger, 1998).

Los fitocromos son sintetizados en su forma Pr, mediante una reacción autocatalítica que se produce al unirse, en el citoplasma, la apoproteína y el grupo cromóforo (Lagarias y Lagarias, 1989). La forma Pr posee localización citoplásmica, y cuando absorbe luz y se convierte a la forma Pfr se transloca al núcleo (Nagy *et al.*, 2001). Inicialmente se creyó que existía un solo fitocromo que mediaba las múltiples respuestas de las plantas a la luz. Más adelante, alrededor de 1980, se demostró que existen dos tipos de fitocromos, los cuales poseen distintas propiedades. El tipo I, comprendido por el fitocromo A (*PHYA*), es el más abundante en plántulas desarrolladas en completa oscuridad, y su forma Pfr es rápidamente degradada, siendo su vida media de 1-2 h (Viestra, 1994). La regulación de la expresión del *PHYA* está dada en tres niveles distintos: a través de la degradación de su RNA mensajero (RNAm), proteólisis del Pfr por ubiquitinación, y la represión de la transcripción de este gen por su forma activa Pfr **(Fig. I 4A)**. Por otro lado, los fitocromos tipo II, los cuales comprenden los fitocromos B-E (*PHYB-E*), son sintetizados con tasas mucho menores, pero sus RNAm y proteínas son mucho más estables, y su transcripción no es afectada por la forma Pfr (Taiz y Zeiger, 1998) **(Fig. I 4B)**. Por lo tanto, la cantidad total de un determinado fitocromo en un tejido depende del balance entre su síntesis y su destrucción. Mientras que las cantidades de fitocromo Tipo I es 9 veces mayor que las de tipo II en plántulas desarrolladas en oscuridad, en las plántulas que crecen a la luz la relación entre ambos tipos de fitocromos es similar. En esta segunda condición, el fitocromo predominante del tipo II en las plántulas es el PHYB (Taiz y Zeiger, 1998).

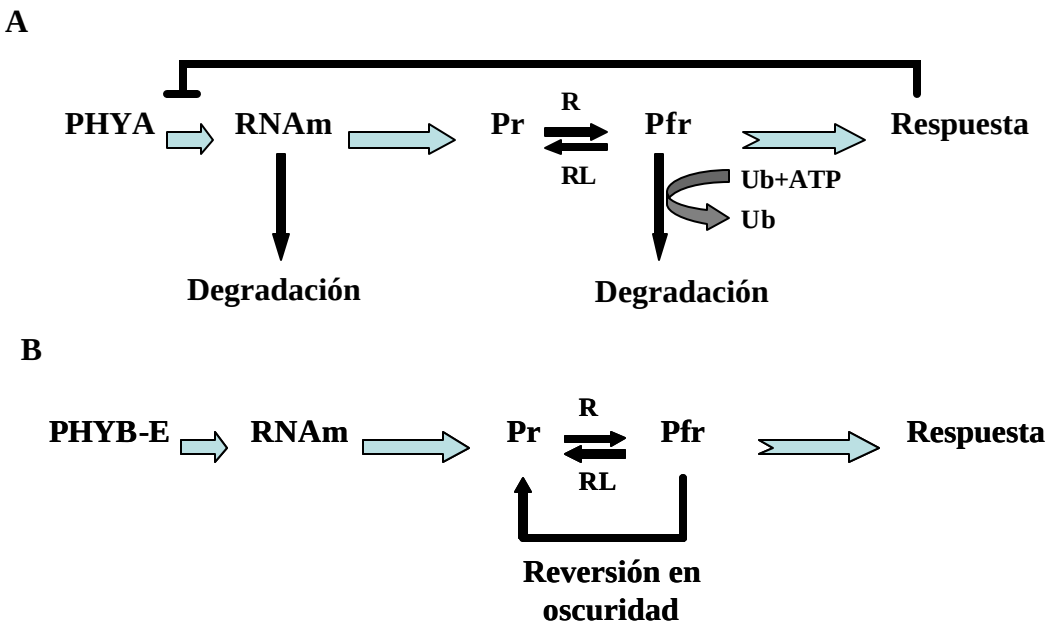


Fig. I 4. Regulación de la expresión de los genes de fitocromos. **(A)** El fitocromo A (tipo 1) es sintetizado en su forma Pfr. El nivel de fitocromo A está regulado por tres factores: degradación de su RNAm, proteólisis de la forma Pfr por ubiquitinación (Ub), y represión de la transcripción de su gen por la forma Pfr. **(B)** Los mensajeros y proteínas de los fitocromos tipo II son más estables que en el caso A, y su forma Pfr puede sufrir reversiones a Pr en oscuridad. Adaptado de (Taiz y Zeiger, 1998).

Funciones fisiológicas y ecológicas de los fitocromos

Se pueden encontrar acciones del fitocromo a lo largo del ciclo de vida de las plantas, y se han caracterizado con más detalle en cuatro fases del desarrollo de los vegetales: la germinación, el establecimiento de la plántula, el desarrollo de la planta adulta y la inducción de la floración.

Acción de los fitocromos sobre la Germinación

La germinación de una fracción significativa de la población de semillas en el suelo depende de la percepción, a través de los fitocromos, de la relación R/RL de la luz que reciben. Por ejemplo, la percepción de altas relaciones de R/RL estimula la germinación de semillas de *D. ferox*, lechuga y *Arabidopsis* (Borthwick *et al.*, 1952; Soriano *et al.*, 1964; Shinomura *et al.*, 1994), mientras que un ambiente enriquecido en RL puede promover o inhibir la germinación, dependiendo del estado fisiológico de las semillas, así como de la intensidad y duración del estímulo lumínico (Casal y Sánchez, 1998). La inducción de la germinación por altas proporciones de R/RL favorecería la percepción de espacios abiertos en el canopeo, debido por

ejemplo, a la muerte de un gran número de individuos en un bosque (Vázquez-Yañez y Smith, 1982) o a la muerte de plantas de un pastizal a causa de inundaciones (Insausti *et al.*, 1995). Asimismo, la promoción de la germinación por bajos flujos de RL favorecería la emergencia de plántulas luego de una breve exposición a la luz por ejemplo durante disturbios en el suelo, donde los competidores potenciales fueron posiblemente eliminados (Scopel *et al.*, 1991). Por otro lado, la inhibición de la germinación por la exposición prolongada al RL podría prevenir la competencia temprana por la luz en canopeos densos **(Fig. I 5)** (Casal y Sánchez, 1998).

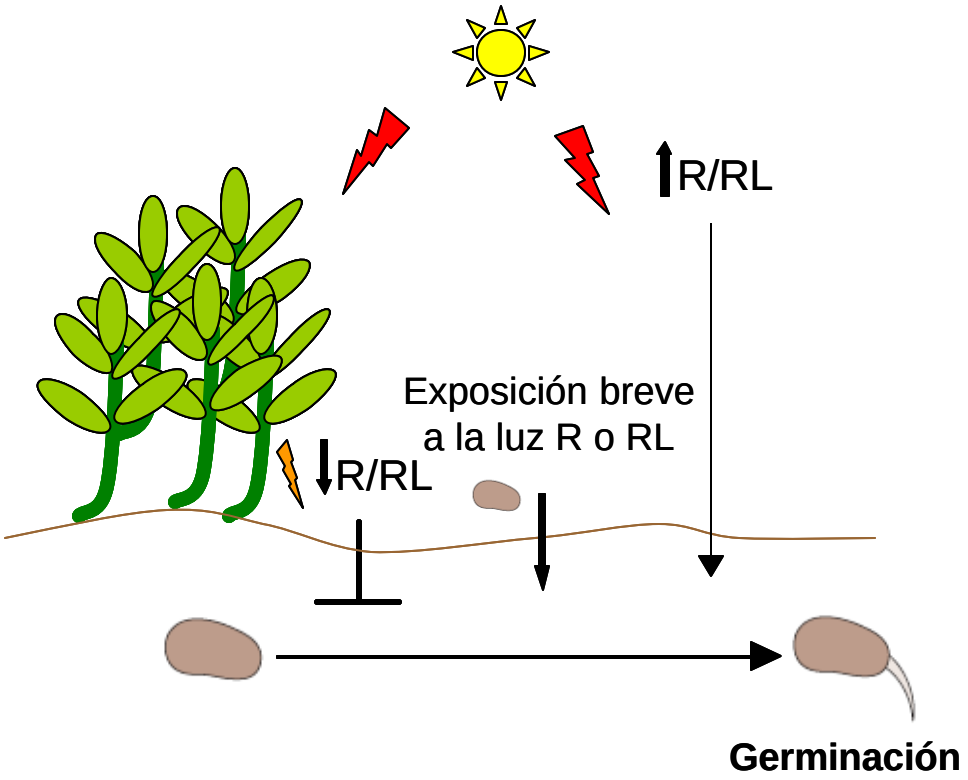
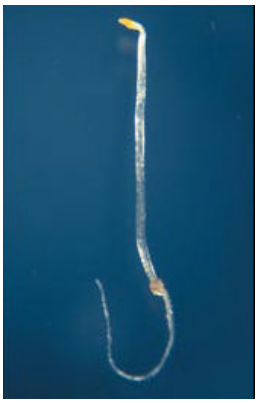


Fig. I 5 Efectos del ambiente lumínico sobre la germinación.

Acción de los fitocromos sobre el establecimiento de la plántula

Una vez que la plántula alcanza la superficie del suelo, ocurre uno de los cambios de gran relevancia para el desarrollo de los organismos vegetales, que consiste en la transición de la vida en oscuridad, denominada *escotomorfogénesis*, al desarrollo en presencia de luz o *fotomorfogénesis*. Esta transición, denominada *des-etiolación*, está caracterizada por cambios morfológicos y fenológicos como ser la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la expansión y apertura de cotiledones, el desarrollo de cloroplastos y expresión de genes relacionados con la fotosíntesis **(Fig. I 6).** También está caracterizada por un reajuste masivo del transcriptoma

(Fankhauser y Chory, 1997; Tepperman *et al.*, 2001). Durante la escotomorfogénesis, la plántula presenta un fenotipo etiloado, el cual se caracteriza por la presencia de tallos o hipocotilos largos, cotiledones cerrados y poco expandidos, la presencia del gancho plumular y la escasa expresión de genes relacionados con la fotosíntesis **(Fig. I 6)** (Casal, 2002). Tanto la luz R como la luz RL, percibida por a través de fitocromos, estimulan la desetiolación (Casal *et al.*, 2003).



DESARROLLO EN OSCURIDAD

Fenotipo *etiolado*

*Hipocotilo largo
*Cotiledones cerrados y poco expandidos
*presencia de gancho apical
*Expresión de genes fotosintéticos reducia

DESARROLLO EN PRESENCIA DE LUZ

Fenotipo *des-etiolado*

*Crecimiento del hipocotilo reducido
*Apertura y expansión de cotiledones
*Ausencia de gancho plumular
*Expresión de genes relacionados con fotosíntesis; por ejemplo genes *CAB*

Fig. I 6 Fenotipos de plántulas desarrolladas en completa oscuridad, o en presencia de luz.

Modulación de la arquitectura de la planta

El tamaño y disposición de entrenudos y hojas, el balance entre el tallo principal y las ramas laterales así como el ángulo de los pecíolos de las láminas foliares están modulados por la percepción de luz a través de los fitocromos (Smith, 2000).

En canopeos en crecimiento, muchos de estos cambios morfológicos se anticipan a la competencia por la radiación, debido a la percepción de la disminución de la relación R/RL en la radiación lateral, a causa del reflejo de la luz RL por la vegetación vecina, aún antes que exista sombrado mutuo entre las plantas (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1991). En presencia de plantas vecinas, entonces, la percepción de bajas relaciones R/RL induce la elongación de tallos y la inclinación de las láminas foliares hacia una mejor captación de la energía lumínica. Este

efecto es denominado *escape al sombreado* **(Fig. I 7)**. Si la elongación de los entrenudos no es suficiente pare escapar a las bajas relaciones R/RL, la floración de muchas especies se adelanta, y hay producción temprana de semillas, aumentando la probabilidad de reproducción de la población (Smith, 2000).

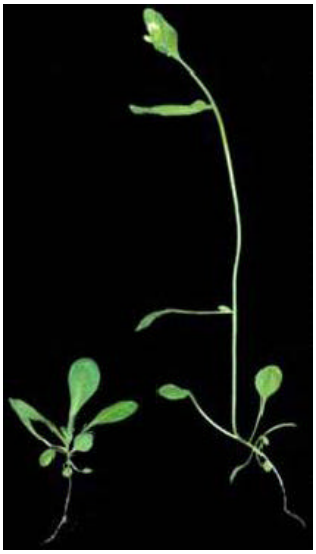


Fig. I 7 Fenotipo de escape al sombreado. La planta de la izquierda se desarrollo en altas relaciones R/RL, en asuencia de plantas vecinas, mientras que la planta de la derecha fue desarrollada bajo un canopeo denso.

Inducción de la floración y dormición de yemas axilares

La percepción de la duración del día a través de los fitocromos aporta a la planta señales temporales que interactúan con el reloj biológico permitiendo que ciertos procesos del desarrollo cruciales para completar el ciclo de vida del individuo ocurran en los momentos más apropiados. De esta manera, el desarrollo de las plantas es sincronizado con los cambios en las estaciones del año, como se ejemplifica en el control por el fotoperíodo de la floración y dormición de yemas en muchas de las especies estudiadas (Smith, 2000).

Modos de acción de los fitocromos

La acción de los fitocromos puede ser distinguida sobre la base de la cantidad de luz requerida para inducir una respuesta determinada. La cantidad de luz puede ser referida como el flujo de luz, el cual es definido como el número de fotones incidentes por unidad de superficie, usualmente cuantificado como micromoles de fotones por metro cuadrado ($\mu mol.m^{-2}$). Tradicionalmente, se han descripto tres modos de acción de los fitocromos; la respuesta a muy bajos flujos de luz, llamada VLFR (del inglés *Very Low Fluence Response*), la respuesta a bajos

flujos, o LFR (del inglés *Low Fluence Response*) y la respuesta a altos flujos de luz o HIR (del inglés *High Irradiance Response*) **(Fig. I 8)** (Casal *et al.*, 1998).

Respuestas a muy bajo flujo de luz: VLFR

Las respuestas VLFR pueden ser inducidas a flujos de luz tan bajos como aquellos alrededor de 0.001 $\mu mol.m^{-2}$ y ser saturadas con 5 $\mu mol.m^{-2}$. La cantidad de luz requerida para inducir una VLFR convierte menos del 0.02% del fitocromo total en Pfr. Como el tratamiento con luz RL convierte aproximadamente el 97% del Pfr a Pr, alrededor del 3% Pfr remanente es capaz de inducir una respuesta de este tipo. Entonces, las respuestas del tipo VLFR no son revertidas por el RL (Taiz y Zeiger, 1998). Este tipo de respuestas cumple la ley de reciprocidad o sea, que la intensidad de la respuesta es similar a igual flujo de fotones, independientemente que el tratamiento de luz haya consistido en pulsos horarios o en luz continua. Asimismo, la intensidad de la respuesta es proporcional a la cantidad de Pfr formada **(Fig. I 8A)**. El fitocromo que media las respuestas VLFR es el PHYA (Casal *et al.*, 2003).

Respuestas a bajos flujos de luz: LFR

En contraste con la respuesta VLFR recién mencionada, las respuestas LFR generalmente no son inducidas a flujos de luz menores a 1 $\mu mol.m^{-2}$, y son saturadas a 1000 $\mu mol.m^{-2}$. Entonces, las relaciones de Pfr/P requeridas para la inducción de una LFR son establecidas por pulsos moderados de luz R, y esta respuesta es revertida por el tratamiento con luz RL (Mancinelli, 1994). La magnitud de la reversión de respuesta del efecto del R disminuye a medida que aumenta el intervalo de tiempo entre el pulso de luz R y RL (Casal *et al.*, 1998).

Al igual que las VLFR, las respuestas LFR cumplen la ley de reciprocidad y son proporcionales a las cantidades de Pfr establecidas durante el tratamiento. Esto significa que la intensidad de respuesta bajo un pulso de luz R que establece una relación Pfr/P del 66% será mayor a la inducida por un pulso de luz R de menor flujo que establece una proporción de Pfr/P del 33% **(Fig. I 8A)** (Casal *et al.*, 1998). El principal fitocromo que media las respuestas LFR es el PHYB (Casal *et al.*, 2003), aunque se ha observado que otros fitocromos también contribuyen a este efecto (Henning *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2003).

Cuando un determinado proceso puede ser inducido tanto por una VLFR como por una LFR, a medida que aumenta el flujo de fotones, se observa una curva bifásica de intensidad de respuesta en función de la proporción Pfr/P establecida **(Fig. I 8B)**. La primera fase de la curva

corresponde a la inducción de la respuesta por una VLFR, mientras que el segundo aumento de pendiente corresponde a la inducción por la LFR. La transición entre la VLFR y la LFR puede involucrar un cambio repentino de pendiente, un *plateau*, o un mínimo. Las respuestas bifásicas han sido observadas para la germinación (VanDerWoude y Toole, 1980; Cone *et al.*, 1985), la promoción del crecimiento del coleoptilo e inhibición del crecimiento del mesocótile (Mandoli y Briggs, 1981), la expansión de cotildeones (Casal *et al.*, 1994) y síntesis de antocianas (Drumm y Mohr, 1974), entre otras.

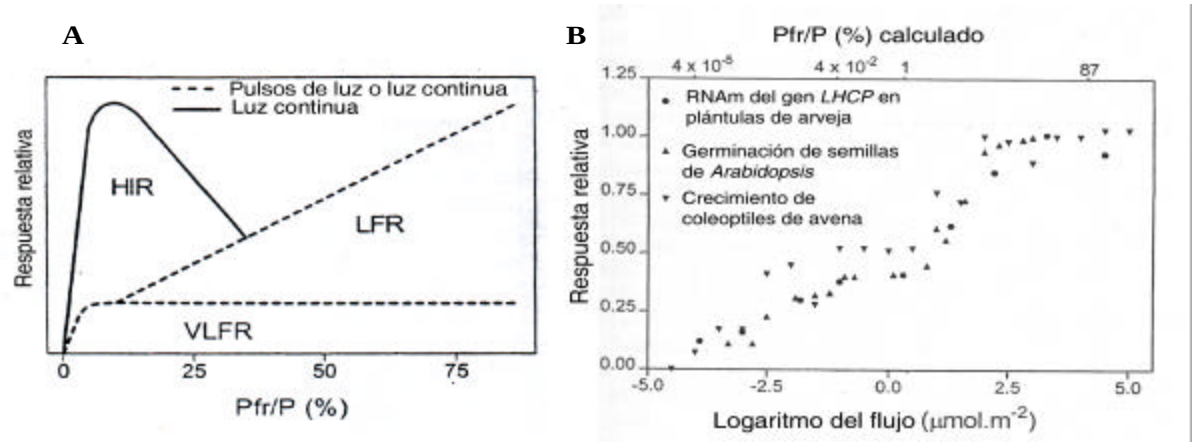


Fig. I 8 Modos de acción de los fitocromos. **(A)** Representación esquemática de los modos de acción de los fitocromos en función del fotoequilibrio calculado (Pfr/P). **(B)** Curva de respuesta en función del flujo de fotones y Pfr calculado para la expresión del gen LHCP de arveja, la germinación de *Arabidopsis* y crecimiento de coleoptiles de avena. Adaptado de (Casal *et al.*, 1998)

Respuestas a altos flujos de luz: HIR

Las respuestas de tipo HIR requieren de exposiciones prolongadas a la luz de irradiancias relativamente altas, y no son revertidas por la luz RL (Taiz y Zeiger, 1998). Las HIR no cumplen la ley de reciprocidad, y la respuesta depende de la irradiancia, medida como $\mu mol.m^{-2}\ seg^{-1}$, más que del flujo neto de fotones recibido (Casal *et al*., 1998). Esto significa que las exposiciones continuas a la luz son más eficientes para inducir la respuesta HIR en comparación con los pulsos horarios de luz, que suministran igual flujo total. El fotorreceptor que media las respuestas HIR es el PHYA (Shichijo *et al.*, 2001; Casal *et al.*, 2003)

Roles del PHYA

El fenotipo más obvio de los mutantes *phyA*, y por el cual estos fueron identificados, es la falta de respuesta a la luz RL del alargamiento del hipocotilo, expansión de cotiledones y apertura

del gancho plumular, a través de una HIR (Whitelam *et al.*, 1993). Estas mutantes muestran una respuesta similar a su genotipo salvaje en la des-etiolación bajo tratamientos prolongados de luz R (Nagatani *et al.*, 1993; Parks y Quail, 1993; Whitelam *et al.*, 1993). Es más, en luz blanca, estos mutantes muestran un fenotipo similar al de su control, en consecuencia, poseen un fenotipo menos obvio que los mutantes *phyB* que crecen en ambientes naturales (Smith, 2000). Yanovsky *et al.*, (1995) han demostrado que la acción del PHYA es de importancia fundamental para la supervivencia de las plántulas bajo canopeos densos. Bajo una cobertura densa de plantas, la capacidad de des-etiolación de las mutantes *phyA* es dramáticamente reducida, y muchas de estas plántulas mueren, mientras que las plántulas salvajes sobreviven por más tiempo bajo estas condiciones

El PHYA además, regula la expresión de un gran número de genes así como la síntesis antocianas, entre otras respuestas (Barnes *et al.*, 1996; Robson y Smith, 1997). También participa en la percepción de la duración del día y en la inducción de la floración, bajo ciertas condiciones (Carr-Smith *et al.*, 1989; Thomas, 1991; Johnson *et al.*, 1994). Además, el PHYA estimula la germinación de *Arabidopsis* a través de una VLFR (Shinomura *et al.*, 1996). La promoción de la germinación por pulsos de luz RL también ha sido observada en lechuga, *D. ferox* y *Sisymbrium officinale* (VanDerWoude, 1985; Scopel *et al.*, 1991; Derkx y Karssen, 1993), entre otras especies. El PHYA, a través de una HIR inhibe la germinación. Esto ha sido observado en semillas de tomate (Shichijo *et al.*, 2001). En *D. ferox*, la promoción de la germinación por una VLFR o una LFR también es inhibida por una HIR, y esta inhibición involucra la represión de la expresión de genes asociados con el proceso germinativo (de Miguel *et al.*, 2000; Burgin *et al.*, 2002).

Roles del PHYB

Las plántulas deficientes en PHYB muestran una extrema reducción de la sensibilidad a la inhibición del alargamiento del hipocotilo, promoción de la expansión de cotiledones y hojas así como de la síntesis de antocianas (Devlin *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1993), indicando que el PHYB ejerce una importante función en la des-etiolación en respuesta a luz R. Las mutantes *phyB*, además, producen menos clorofilas y poseen un menor contenido de cloroplastos por célula del mesófilo a comparación del genotipo salvaje, indicando que este fotorreceptor también está involucrado en estos procesos (Chory, 1992).

Las plantas adultas deficientes en PHYB poseen tallos, hojas y pecíolos más largos que las plantas salvajes, así como una mayor dominancia apical, y floración temprana (Chory *et al.*, 1989; Goto *et al.*, 1991). Este fenotipo es similar al de escape al sombreado de una planta salvaje, e indica que la forma Pfr del PHYB está involucrado en la inhibición del alargamiento del tallo hojas y pecíolos así como de la dominancia apical y la floración.

El PHYB, a través de una LFR promueve la germinación de numerosas especies (Casal y Sánchez, 1998).

Roles de los PHYC, PHYE y PHYD

Los estudios con mutantes de *Arabidopsis* deficientes en múltiples fitocromos indican que existe una redundancia entre los PHYB, D y E en el control del tiempo de floración, desarrollo de las hojas y regulación del gen *ATHB-2* (Franklin *et al.*, 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que el PHYE participa en el establecimiento del fenotipo de escape al sombreado por RL, así como en la percepción del largo del día en plántulas (Devlin *et al.*, 1996; Devlin *et al.*, 1998; Devlin y Kay, 2000).

Los mutantes *phyC* muestran una reducción en la sensibilidad a la luz R para la inhibición del alargamiento del hipocotilo y expansión de los cotiledones. Estos mutantes además muestran pecíolos alongados, una mayor área foliar bajo luz blanca, y florece antes que su genotipo salvaje (Monte *et al.*, 2003), indicando también una redundancia de función con PHYB.

Se ha demostrado que el PHYE promueve la germinación cuando las semillas son expuestas por períodos prolongados a la luz R, y que la promoción de la germinación por RL requiere de la presencia del PHYE (Henning *et al.*, 2002).

Dormición y germinación

El estado de *dormición* es definido como la incapacidad, de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación (Bewley y Black, 1994). La dormición se establece durante la ontogenia de la semilla, restringiendo su germinación en la planta madre. Además, se considera que la dormición es una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo cuando los factores abióticos o bióticos del entorno son desfavorables para el establecimiento de la plántula.

El hecho que alrededor del 70% de las especies estudiadas poseen dormición, indica que este es un carácter adaptativo en las plantas (Baskin y Baskin, 2003).

La dormición que se establece durante el desarrollo de la semilla es denominada *dormición primaria*, y el nivel de la misma disminuye durante su *post-maduración*, la cual ocurre en condiciones naturales, por ejemplo, durante la permanencia de la semilla en el suelo. La post-maduración también ocurre en condiciones artificiales, como cuando las semillas se almacenan en seco en el laboratorio. La post-maduración se encuentra influenciada por un número considerable de factores ambientales como ser la temperatura, humedad y ambiente gaseoso. A medida que el grado de dormición disminuye se amplía el rango de condiciones ambientales que permiten la *germinación*. Por definición, la germinación involucra todos aquellos procesos que comienzan con la absorción de agua por la semilla quiescente, y terminan con la elongación del eje embrionario (Bewley y Black, 1994). La señal visible de la finalización de la germinación es, en general, la emergencia de la radícula embrionaria a través de las cubiertas seminales (Bewley, 1997).

Las señales ambientales como la temperatura, la disponibilidad de agua y la luz modulan la dormición y germinación en numerosas especies. En particular la luz, percibida a través de los fitocromos, puede controlar la salida de la dormición en numerosas especies (Bewley y Black, 1994). Los fitocromos, a través de una VLFR o una LFR, salvo escasas excepciones, promueven la germinación (Casal y Sánchez, 1998). Una HIR, en cambio, inhibe la germinación. Entre las especies estudiadas que presentan inhibición por una HIR se encuentran *Lactuca sativa*, *Poa pratensis*, *Amaranthus aenicola* y *Datura ferox* (Negbi y Koller, 1964; Hendricks *et al.*, 1968; de Miguel *et al.*, 2000).

En general, la sensibilidad a la luz de las semillas aumenta durante la post-maduración. Por ejemplo, las semillas de *D. ferox* se encuentran profundamente dormidas cuando caen de la planta madre, y luego de un período de tiempo, la germinación puede ser estimulada por flujos moderados de luz a través de una LFR. Sin embargo, cuando las semillas permanecen enterradas por largos períodos en el suelo, el grado de dormición disminuye notablemente y la germinación es estimulada por muy bajos flujos de luz, a través de una VLFR (Scopel *et al.*, 1991). Incluso, en semillas que permanecen largos períodos en el suelo, la salida de la dormición puede independizarse de la exposición a la luz, y pueden adquirir la capacidad de germinar en oscuridad.

Fisiología de la dormición impuesta por las cubiertas: fitocromos y hormonas

La dormición impuesta por las cubiertas es la que se encontró más frecuentemente entre un total de 3653 especies revisadas por Baskin y Baskin (2003), indicando que este tipo de dormición está ampliamente difundida en la naturaleza. En este tipo de dormición, la germinación depende del balance entre la capacidad de expansión del embrión (llamada generalmente *potencial de crecimiento del embrión*) y la resistencia que le oponen los tejidos que lo rodean (Bewley y Black, 1994). La mayoría de las semillas que poseen dormición impuesta por las cubiertas requieren luz para germinar (Bewley y Black, 1994). En semillas de *D. ferox* y lechuga, por ejemplo, una LFR estimula tanto el potencial de crecimiento del embrión como una disminución de la resistencia mecánica impuesta por el endosperma (Carpita *et al.*, 1979; Psaras *et al.*, 1981; de Miguel y Sánchez, 1992), y este efecto está asociado con la germinación.

Sobre el aumento del potencial de crecimiento del embrión mediado por fitocromo, la información es muy escasa. En lechuga se lo ha vinculado por una disminución en el potencial osmótico (Carpita *et al.*, 1979) aunque se admite que también hay cambios en la extensibilidad de las paredes. Sobre el origen de los cambios en extensibilidad no hay ninguna información. Recientemente se ha sugerido la posibilidad de que las expansinas participen en éste fenómeno. Estas proteínas constituyen familias multigénicas en *Arabidopsis*, arroz, zapallo, tomate y otros casos en donde se han examinado en detalle (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999). Se propone que las expansinas producen la ruptura no enzimática de enlaces débiles (ej. puentes hidrógeno) entre fibras de celulosa y hemicelulosa. Esto permitiría el deslizamiento de polímeros bajo condiciones de tensión (McQueen-Manson & Cosgrove, 1995) o facilitaría el acceso a enzimas hidrolíticas de la pared (Rose *et al*., 1997). En mutantes de tomate *gib-1*, los cuales son incapaces de sintetizar giberelinas, el agregado de giberelinas estimula la expresión de *LeEXP8* y *LeEXP10* en el embrión, y este aumento de expresión está asociado con la germinación (Chen *et al.*, 2001). En *D. ferox*, el estímulo de la germinación por una LFR está asociado a un incremento en los niveles de transcriptos de dos expansinas en el embrión (Mella *et al.*, 2004).

Por otro lado, en varias especies la germinación es precedida por un ablandamiento importante en el endosperma (Watkins *et al.*, 1985; Sánchez *et al.*, 1986; Groot y Karssen, 1987). El principal componente de las paredes celulares del endosperma es un polímero de manosa, lo que explica buena parte de la resistencia mecánica de éstos tejidos. En *D. ferox* el ablandamiento

está acompañado con una disminución significativa del contenido de mananos de pared (Sánchez *et al.*, 1990). En semillas de tomate hay relación entre la actividad de enzimas que degradan mananos de pared y la germinación (Groot y Karssen, 1987; Nomaguchi *et al.*, 1995; Nonogaki *et al.*, 2000). Sin embargo, ésta actividad no se refleja en la composición de las paredes celulares del endosperma (Dahal *et al.*, 1997). Estos resultados han sugerido la participación de otros procesos, además de la movilización de los mananos, aunque esta se considera relevante. En contraste, en *D. ferox* es muy buena la asociación entre el ablandamiento del endosperma y la hidrólisis de mananos en las paredes celulares (Sánchez *et al.*, 1986). La hidrólisis de estos polisacáridos se correlaciona con el aumento de actividad de ß-mananasa y ß-manosidasa en el endosperma micropilar. Este aumento es inducido por la formación de Pfr en el embrión mediante la producción de un promotor (probablemente una giberelina) el cual es translocado al endosperma micropilar, donde ejerce su acción (Sánchez y de Miguel, 1997). En *D. ferox*, además, la LFR produce un aumento de los niveles de transcriptos de expansinas en el endosperma micropilar, y las giberelinas reemplazan a la luz en esta promoción **(Fig. I 9)**.

En el caso de semillas con dormición impuesta por las cubiertas, la inhibición de la germinación por ABA puede estar asociada tanto con la inhibición de la capacidad expansiva del embrión, como con el ablandamiento del endosperma. Por ejemplo, en *D. ferox* el ABA bloquea principalmente el potencial de crecimiento del embrión (Sánchez y de Miguel, 1985; de Miguel *et al.*, 1999). En tomate el ABA también inhibe la germinación, y este aparentemente ejerce un efecto inhibitorio en el estímulo del potencial de crecimiento del embrión (Groot y Karssen, 1992). El papel de esta hormona en el ablandamiento del endosperma de tomate aún no es claro: mientras que muchos autores proponen que la inhibición de la germinación por ABA está asociada con el bloqueo del ablandamiento (Groot y Karssen, 1992; Toorop *et al.*, 2000), otros observaron lo contrario (Ni y Bradford, 1993; Toorop *et al.*, 1996).

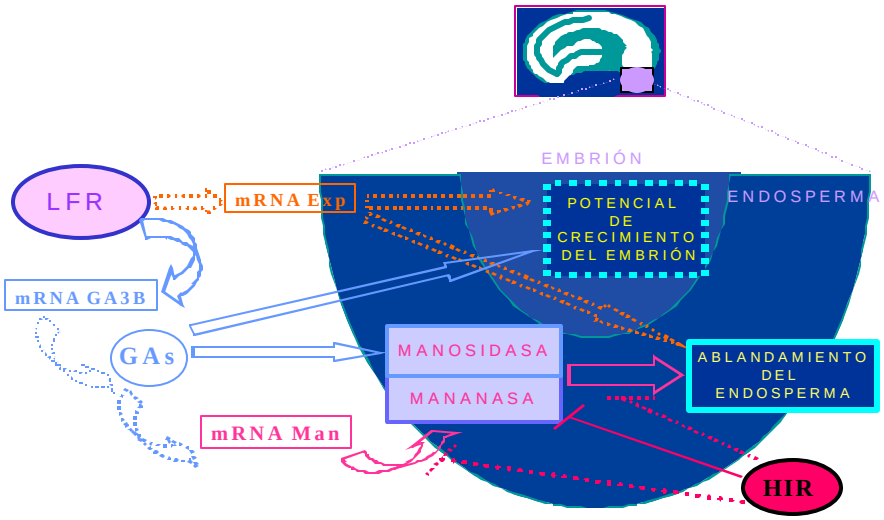


Fig. I 9. Esquema de la promoción de la germinación por una LFR y su inhibición por una HIR en *D. ferox*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* también poseen dormición primaria cuando son liberadas y dispersadas desde la planta madre, y la luz percibida a través de los fitocromos, estimulan la germinación (Koornneef y Karssen, 1994). Se considera que estas semillas también poseen dormición impuesta por las cubiertas, y en este caso, las cubiertas ejercerían una resistencia considerable a la elongación del embrión (Debeaujon y Koornneef, 2000). En contraste con las semillas de tomate y *D. ferox* o lechuga en las cuales es posible estudiar los procesos asociados con la germinación en forma localizada por ejemplo, en el embrión o endosperma, las semillas de *Arbidopsis* son muy difíciles de manipular, principalmente debido a su tamaño, el cual ronda los 0.5 mm. Por ello, el avance en el conocimiento sobre dormición y germinación en esta especie ha ocurrido, principalmente, mediante el análisis de mutantes deficientes en la biosíntesis o respuesta a hormonas así como defectuosos en la estructuras de semillas. De esta forma se ha establecido que las mutaciones que afectan la pigmentación o estructura de la testa están asociadas con un menor nivel de dormición primaria de las semillas. Se propuso que la testa posee dos funciones principales en el bloqueo de la germinación. Por un

lado, ofrecería una resistencia al lavado de inhibidores de la germinación, como ser el ácido abscísico (ABA) o la entrada de factores que estimulan la germinación, como ser el agua o el oxígeno (Debeaujon *et al.*, 2000). Por otro lado, se propuso que la testa constituye un impedimento mecánico a la expansión del embrión (Debeaujon y Koornneef, 2000). Se cree que en *Arabidopsis*, la capacidad de expansión del embrión está restringida por el ABA (Karssen *et al.*, 1983), y las giberelinas contrarrestan el efecto del ABA en la dormición (Debeaujon y Koornneef, 2000). Se ha sugerido, además, que las giberelinas promueven la disminución de la resistencia mecánica que ofrece la testa para la elongación del eje embrionario (Debeaujon y Koornneef, 2000). En esta especie la luz, percibida a través de los fitocromos, incrementa los contenidos de giberelinas activas así como su respuesta en las semillas, y este efecto está asociado con la germinación (Yamaguchi y Kamiya, 2000; Yamauchi *et al.*, 2004).

En semillas de *Arabidopsis*, la disminución de los niveles de dormición mediante incubación de las semillas embebidas a bajas temperaturas está asociado con un incremento en los niveles de una giberelina que posee actividad biológica; la GA_4, así como con la acumulación de transcriptos de *GA3ox1*, una GA3ß-hidroxilasa que participa en el paso final de la síntesis de GA_4 **(Fig. I 10)** (Yamauchi *et al.*, 2004). En semillas de lechuga, existe un aumento en los niveles de giberelinas bioactivas luego de un pulso de luz R, y esto está relacionado con el aumento de los niveles de transcriptos de GA3ß-hidroxilasa y el estímulo de la germinación (Toyomasu *et al.*, 1994; Toyomasu *et al.*, 1998). La relación entre los fitocromos y los contenidos de giberelinas en semillas será discutida en mayor detalle en el Capítulo II.

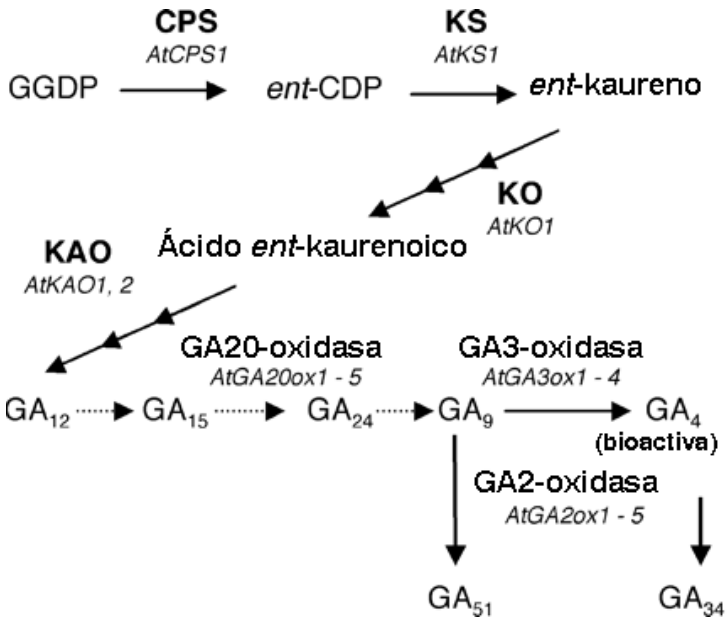


Fig. I 10. Ruta principal de biosíntesis de giberelinas en *Arabidopsis*. Las abreviaturas significan: *GGDP*: geranil-geranil difosfato; *CPS*: ent-copanil difosfato sintasa; *ent-CPD*: ent-copalil difosfato; *KAO*: ácido ent-kaurenoico, *KO*: ent-kauren-oxidasa; *KS*: ent-kauren-sintasa. Las líneas de puntos indican los pasos sintetizados por la enzima GA20-oxidasa. Adaptado de (Yamauchi *et al.*, 2004)

Fitocromos en las semillas

Los fitocromos pueden ser sintetizados en las semillas durante dos momentos distintos. Uno de ellos es durante su formación en la planta madre, como fue observado en *Amaranthus* (Kendrick *et al.*, 1969; Kendrick y Spruit, 1977), y en la semilla madura seca puede encontrarse tanto en la forma Pr como Pfr, dependiendo de las propiedades ópticas de las cubiertas seminales y del fruto, o si el fruto fue sombreado por hojas verdes. Esto significa que el requerimiento de luz para la germinación dependerá del ambiente materno donde se formaron las semillas. En el caso que se establezca una alta proporción de Pfr/P durante la maduración, el Pfr formado durante el desarrollo de la semilla podría estimular la germinación de esta una vez en el suelo, aún en completa oscuridad. En *A. thaliana*, el PHYB comprende, al menos en parte, el pool de los fitocromos formados durante el desarrollo de la semilla (Shinomura *et al.*, 1996). El segundo

momento de síntesis de fitocromos en la semilla puede ocurrir luego de la imbibición, como fue observado en semillas de *Amaranthus caudatus* (Kendrick *et al.*, 1969). El pool de fitocromos que aparece en esta segunda fase no es muy estable en su forma Pfr, por lo tanto, su abundancia es reducida significativamente cuando las semillas son expuestas a luz R. Los estudios inmunológicos indican que la abundancia de PHYA aumenta significativamente unas horas después del comienzo de la imbibición en *Arabidopsis* (Shinomura *et al.*, 1996). Recientemente se ha demostrado que el PHYB y PHYC también son sintetizados durante la imbibición en oscuridad, aunque en cantidades relativamente menores al PHYA (Sharrock y Clack, 2002).

Desarrollo de la plántula

Tras la germinación, ocurre uno de los cambios más importantes en el desarrollo de los individuos, el cual consiste en la transición de la vida en oscuridad a su desarrollo de luz. En esta primera etapa, el crecimiento de la plántula es condicionado de forma tal que esta logre alcanzar exitosamente su condición autótrofa. Si la luz es limitante, la plántula exhibirá un fenotipo etiolado. En estas condiciones, la plántula exhibirá un tipo de crecimiento donde el desarrollo ocurre lentamente, caracterizado por un hipocotilo largo, raíces poco desarrolladas y cotiledones cerrados y poco expandidos **(Fig. I 6)**. No es sorprendente entonces que la fotomorfogénesis esté regulada por una compleja red de procesos, ya que en esa pequeña ventana de tiempo, el individuo se desarrolla desde un embrión dependiente de reservas pre-existentes a un individuo autotrófico (Nemhauser y Chory, 2002).

Las células del hipocotilo tienen su origen en el embrión, y no experimentan divisiones celulares adicionales durante el crecimiento de la plántula en oscuridad (Gendreau *et al.*, 1997). Como resultado, el crecimiento involucra la expansión de las células existentes las cuales, en el caso de tejidos que se desarrollan en oscuridad, pueden aumentar 100 veces su tamaño original. La expansión celular requiere del ablandamiento de las paredes celulares, en las cuales enzimas como ser las hidrolasas y las xiloglucan-endo-transglicosidasas sintetizan nuevos componentes de pared y los integran a medida que el protoplasto aumenta de tamaño. Existen evidencias genéticas y fisiológicas que sugieren que este último proceso es llevado a cabo mediante el incremento de la entrada de agua a la vacuola. Las mutantes en el gen *DET3*, que codifica para una subunidad de una protón ATPasa, muestran una disminución en el largo del hipocotilo en oscuridad, y esto podría estar asociado a un defecto en la entrada de agua a la célula, lo que

afectaría el crecimiento celular (Schumacher *et al.*, 1999). Tanto las auxinas como los brasinosteroides regulan positivamente la transcripción de proteínas que participan en el ablandamiento y expansión de las paredes, como ser xiloglucan endo-transglicosiltransferasas, hidrolsasas y expansinas, así como de acuaporinas, indicando que este proceso es regulado por hormonas (Friederchsen y Chory, 2001).

En plántulas, la fotomorfogénesis es la vía por defecto tras la germinación, y se mantiene reprimida en oscuridad, principalmente, gracias a la actividad del complejo COP1 (Kim *et al.*, 2002). Recientemente, se ha observado que las plántulas de *Arabidopsis* que crecieron en oscuridad y que poseen niveles reducidos de giberelinas poseen un fenotipo semejante al de las plántulas salvajes desarrolladas en la luz, indicando que las giberelinas son represoras de la fotomorfogénesis en oscuridad (Alabadí *et al.*, 2004). Por lo tanto, las giberelinas y la luz pueden actuar en el mismo sentido o de forma antagónica en la modulación de los distintos procesos fisiológicos, dependiendo del tipo de respuesta y el tejido en que ocurre esta interacción. El rol del ABA en la fotomorfogénesis no fue muy estudiado, pero existen evidencias que actúa en forma antagónica con los fitocromos en la expresión de genes en respuesta a la luz (Weatherwax *et al.*, 1996). Este tema será tratado en el capítulo III.

Giberelinas y ácido abscísico

Como se ha mencionado recientemente, en semillas, las giberelinas y el ácido abscísico (ABA) son importantes promotores e inhibidores de la germinación, respectivamente. Asimismo, en plántulas, estas hormonas regulan gran cantidad de procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo. Las bases fisiológicas y moleculares de estas respuestas han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, la capacidad de percepción de estas hormonas por los distintos tejidos vegetales y su relación con la luz no se conoce en detalle, siendo esta potencialmente importante en las respuestas a la germinación y desarrollo de plántulas en relación con el ambiente.

En contraste con el extenso conocimiento sobre el metabolismo de las giberelinas (Olszewski *et al.*, 2002) y su regulación por los fitocromos (Yamaguchi y Kamiya, 2000; Yamaguchi y Kamiya, 2002) la cual será discutida en el capítulo II de esta tesis, la información

sobre los componentes que median la percepción de las giberelinas es escasa (Thomas y Sun, 2004). La identificación de mutantes de respuesta a las giberelinas en distintas especies constituye una buena metodología para estudiar la señalización de las giberelinas en diversos procesos filológicos (Olszewski *et al.*, 2002). Por ejemplo en *Arabidopsis* se han identificado numerosos mutantes que poseen alteraciones en la respuesta a las giberelinas, muchos de los cuales han sido aislados y secuenciados **(Tabla I 1)**. Hasta el momento, los genes de la familia DELLA, los cuales codifican para reguladores negativos de la señalización de las giberelinas, fueron los más estudiados en la promoción de la germinación. En *Arabidopsis*, esta familia comprende a los genes *GAI, RGA*, *RGL1*, *RGL2* y *RGL3* (Peng *et al.*, 1999; Dill y Sun, 2001; Richards *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Wen y Chang, 2002). Se ha comprobado que los genes GAI y RGA participan como represores de la elongación del tallo, cuya acción es anulada por las giberelinas (Silverstone *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2001). En la germinación, se comprobó que dentro de la familia DELLA, el gen *RGL2* es el principal regulador negativo de la germinación, ya que la germinación de mutantes *rgl2* es resistente a la presencia de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas en el medio (Lee *et al.*, 2002). Recientemente, estudios bioquímicos comprobaron que las giberelinas promueven la elongación del tallo, el desarrollo floral y la germinación aparentemente a través de el estímulo de la degradación de las proteínas RGA, GAI y RGL2 por la vía del proteasoma 26S (Silverstone *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2004), y este efecto requiere de la acción de SLY (McGinnis *et al.*, 2003; Dill *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2004). Los otros componentes de señalización de las giberelinas fueron menos estudiados y algunos serán discutidos en el Capítulo II. En el momento de inicio de este trabajo de tesis se desconocía la relación entre estos y el estímulo de la germinación por los fitocromos.

Nombre	**Fenotipo**	**Dominancia**	**Rol del alelo salvaje en la señalización de las giberelinas**	**Proteína**
gai-1	Planta enana insensible a las GAs	Dominanate	Regulador negativo	Regulador transcripcional
gai-t6	Crecimiento independiente a la acción de las GAs	Recesivo	Regulador negativo	Regulador transcripcional
gar2-1	Crecimiento independiente a la acción de las GAs	Dominante	No claro	¿?
pkl	Planta enana con respuesta reducida a las GAs	Recesivo	Regulador positivo	Factor remodelador de cromatina *CHD3*
rga	Crecimiento independiente a la acción de las GAs	Recesivo	Regulador negativo	Regulador transcripcional
rga-delta17	Planta enana insensible de las GAs	Dominante	Regulador negativo	Regulador transcripcional
shi	Planta enana insensible de las GAs	Dominante	Regulador negativo	Proteína *Ring finger*
sly1	Planta enana insensible a las GAs	Recesivo	Regulador positivo	Proteína *F-box*
spy	Crecimiento independiente a la acción de las GAs	Recesivo	Regulador negativo	OGT

Tabla I 1. Mutantes de respuesta de giberelinas de *Arabidopsis*. Adaptado de Thomas y Sun, (2004).

La germinación y crecimiento de la plántula, además, están ampliamente influenciados por el ABA. De hecho, la mayoría de los mutantes de señalización de ABA fueron aislados y caracterizados por sus diferentes comportamientos en la germinación o en el desarrollo de la plántula en presencia de ABA exógeno (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein, 1994; Culter *et al.*, 1996). Por ejemplo, los mutantes insensibles a ABA *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5* y *abi8* fueron aislados por su capacidad de germinar en concentraciones de ABA que inhibía la germinación de las semillas salvajes. Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas fosfatasas del tipo 2C

(Leung *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994; Leung *et al.*, 1997), y diversos estudios indicaron que estos son reguladores negativos de la señalización del ABA (Sheen, 1996; Leung *et al.*, 1997; Sheen, 1998). Por otro lado, *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* codifican para diferentes tipos de factores de transcripción que regulan el desarrollo del embrión, la madruación de la semilla y su respuesta al ABA (Giraudat *et al.*, 1992; Finkelstein *et al.*, 1998; Finkelstein y Lynch, 2000; Lopez-Molina y Chua, 2000). Los estudios genéticos y bioquímicos indican que *ABI5* es regulado positivamente por *ABI3*, aparentemente a través de de una interacción directa entre estos dos factores (Lopez-Molina *et al.*, 2001). *ABI8* estaría involucrado en la interacción entre ABA y azúcares, y su función biológica es hasta ahora, desconocida (Boccard-Gifford *et al.*, 2004).

Los análisis de mutantes hipersensibles a ABA también han aportado valiosa información acerca de la manera en que esta hormona es percibida en las plantas. Por ejemplo, el gen *ERA1* codifica para una subunidad ß de una farnesil-transferasa la cual es un regulador negativo de la señalización del ABA (Culter *et al.*, 1996). Los estudios epistáticos indican que *ERA1* ejerce su función río debajo de *ABI1* y *ABI2*, y río arriba de *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* (Brady *et al.*, 2003). Algunas de estas interacciones son descriptas en la **Fig. I 11**. Hasta el momento de realizar esta tesis, se desconocía las relaciones entre estos componentes de señalización y los fitocromos en la germinación y la des-etiolación.

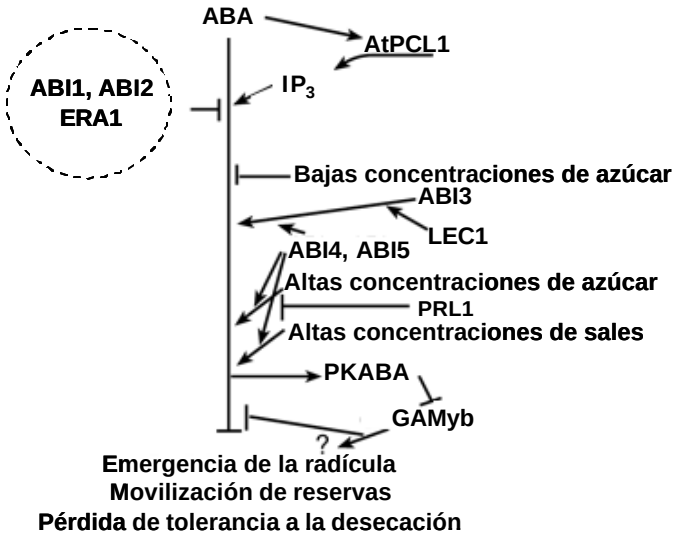


Fig. I 11. Ruta de señalización del ABA propuesta en semillas. Las abreviaturas significan: *AtPLC*: fosfolipasa C de *A. thaliana*, *IP3*: inositol fosfato, ABI: *ABSCISIC ACID INSENSITIVE*; *PKABA*: proteína kinasa dependiente de ABA; aislada en cereales (Gómez-Cadenas *et al.*, 1999), *GAMYB*: factor de respuesta a giberelinas, identificado en cereales (Gubler *et al.*, 1995). Las flechas indican efectos promotores, las barras efectos inhibitorios. Adaptado de Finkelstein *et al.*, (2002).

OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general de esta tesis es aportar elementos básicos para el abordaje de la variedad de problemas que ofrecen tanto el comportamiento de las semillas, así como de las plantas en relación con su medio ambiente.

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

(a) Las bases fisiológicas bioquímicas y moleculares de los cambios en la sensibilidad a las giberelinas en semillas asociados al estímulo de la germinación por luz.

Para ello, inicialmente se evaluó la posibilidad que en *D. ferox* la respuesta de la germinación a las giberelinas esté bajo el control de una LFR de los fitocromos. Posteriormente se estudió los sitios donde estos cambios tienen lugar (por ejemplo, si ocurren en el embrión o endosperma), y donde se origina la señal. Se evaluó el posible rol de las citocininas como componentes de la señal lumínica que promueve la respuesta a las giberelinas en las semillas. Finalmente se analizó la relación entre los cambios en la respuesta a las giberelinas mediados por luz y la expresión de genes *DfPHOR*, *DfSPY* y *DfMYB*. Estos genes comparten alta homología con *PHOR1*, *SPY* y *GAMYB* los cuales son componentes de la señalización de las giberelinas en plantas.

Utilizando semillas de *Arabidopsis thaliana*, se estudió la modulación de la respuesta a las giberelinas por la luz, en semillas de las accesiones C24 y Landsberg *erecta* de *Arabidopsis*. Con el propósito de estudiar el rol de las citocininas en el estímulo de la germinación por los fitocromos, se analizó el efecto de la luz sobre la sensibilidad a las giberelinas en semillas transgénicas *ipt161*, que sobreexpresan el gen Isopentil-transferasa (*IPT*), una enzima que participa en la biosíntesis de citocininas. También se estudió la modulación por luz de la respuesta a las giberelinas en semillas mutantes *ckh1-1* y *ckh2-1*, las cuales poseen la pérdida de función de los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1* respectivamente. Estos alelos regulan negativamente la respuesta a las citocininas en cultivos *in vitro*. Por último se evaluó la respuesta a la luz en la germinación de las semillas sobreexpresantes y mutantes, con el fin de establecer asociaciones entre los cambios en la respuesta a las giberelinas de las semillas y el estímulo de la germinación por luz.

(b) Los fotorreceptores involucrados en la modulación de la respuesta a las giberelinas en la germinación.

Utilizando semillas mutantes simples *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* y *phyE*, así como dobles mutantes *phyB phyE*, *phyB phyD*, *phyD phyE* y la triple *phyB phyD phyE* se estudiaron los fotorreceptores involucrados en la respuesta a las giberelinas en la germinación.

(c) La interacción entre el ácido abscísico, giberelinas y las citocininas en la promoción de la germinación por luz en *D. ferox*, así como la acción de distintos componentes de la señalización del ácido abscísico, en la promoción de la germinación por luz y la fotomorfogénesis de plántulas.

Particularmente se evaluó el efecto de las citocininas y la luz R en la inhibición de la germinación por ácido abscísico. También se estudió la interacción entre estos factores en los cambios de la respuesta a las giberelinas en las células del embrión, y su relación el estímulo de la germinación.

Utilizando semillas de *Arabidopsis*, se analizó la influencia de la pérdida de función de moduladores negativos y positivos de la respuesta al ABA: *ABI1*, *ABI3*, *ABI4*, *ABI5* y *ERA1* en la promoción de la germinación por luz y la fotomorfogénesis. Se estudió la relación entre la expresión del gen *ABI3* en las semillas y el nivel de dormición de las mismas, así como en la promoción de la germinación por una VLFR y una LFR de los fitocromos.

Finalmente, se evaluó la influencia del ambiente lumínico experimentado por la semilla sobre la respuesta a la luz de las plántulas. Se analizaron las características de la señal lumínica percibida por las semillas y transmitida a la plántula, así como la posible acción de *ABI3* en esta comunicación.

CAPÍTULO II: ESTUDIO DE LOS CAMBIOS EN LA RESPUESTA A LAS GIBERELINAS EN LAS SEMILLAS DURANTE LA PROMOCIÓN DE LA GERMINACIÓN POR LUZ

INTRODUCCIÓN

Las giberelinas son un nexo importante entre la luz percibida a través de los fitocromos y los procesos que controlan la germinación (Casal y Sánchez, 1998; Kamiya y García-Martínez, 1999). En lechuga (*Lactuca sativa* L. cv Grand Rapids), la formación de Pfr produce un aumento en la concentración de giberelinas activas en las semillas (Toyomasu *et al.*, 1993), y la aplicación de giberelinas exógenas reemplazan el requerimiento de R en la promoción de la germinación (Khan *et al.*, 1957). Este aumento en el contenido de giberelinas está relacionado con la modulación por la luz R de la expresión de los genes de su biosíntesis. La expresión del gen *Ls3h1*, el cual codifica para una GA3ß-hidroxilasa, está fuertemente promovida por una LFR de los fitocromos (Toyomasu *et al.*, 1994). Asimismo, en semillas de *Arabidopsis thaliana*, la formación de Pfr promueve la expresión de los genes *GA4* y *GA4H*, los cuales también codifican para dos enzimas GA3ß-hidroxilasas (Yamaguchi *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 2004). En *Datura ferox*, la acumulación de mensajeros de una GA3ß-hidroxilasa está fuertemente promovida por R, un efecto que se cancela cuando el R es seguido por un pulso de luz RL. El efecto de la luz sobre los mensajeros de GA3ß-hidroxilasa está asociado con la promoción de la germinación por una LFR (Sánchez y Mella, 2004).

Los fitocromos no sólo promueven la biosíntesis de giberelinas en etapas previas a la emergencia de la radícula, sino que, en algunas especies, también modulan la respuesta de las semillas a esta hormona. Se ha demostrado que en *Arabidopsis*, la luz R aumenta la respuesta a las giberelinas para la germinación. A pesar de algunos intentos al respecto, los fotorreceptores involucrados en este proceso son desconocidos (Yang *et al.*, 1995). Tampoco se conocen los sitios de las semillas donde ocurren estos cambios o las bases fisiológicas, bioquímicas y moleculares de la modulación de esta respuesta. Por otro lado, en lechuga, la promoción de la germinación por luz aparentemente no involucra cambios en la sensibilidad de las semillas a las giberelinas (Toyomasu *et al.*, 1998). Por lo tanto, la relación entre los fitocromos y las respuestas a las giberelinas en semillas requiere mayor investigación.

En el transcurso de la última década, ocurrió un gran avance en el aislamiento e identificación de genes que participan en la vía de transducción de las giberelinas. Diversos autores han propuesto que algunos de estos genes participarían en la percepción de las giberelinas en semillas. Por ejemplo, el gen *SPINDLY* (*SPY*) es un regulador negativo de la respuesta a las

giberelinas, y se ha demostrado que, en contraste con su genotipo salvaje, los mutantes *spy* germinan en presencia de inhibidores de la biosíntesis de giberelinas (Jacobsen *et al.*, 1996). Sin embargo, no se conoce la relación entre la expresión de *SPY* y los cambios en la respuesta de las semillas a las giberelinas en la inducción de la germinación por luz. Por otro lado la expresión del gen *GAMYB*, un regulador positivo de la señalización de las giberelinas, es inducida por esta hormona en cereales (Gocal *et al.*, 1999). *GAMYB* está involucrado en la promoción de la actividad a-amilasa en la capa de aleurona de cereales (Gubler *et al.*, 1995; Gubler *et al.*, 2002). También interviene en la transición de la etapa vegetativa a la floración en *Lolium temulentum* (Gocal *et al.*, 1999) y el desarrollo de anteras en cebada (Murray *et al.*, 2003), lo que sugiere que *GAMYB* está involucrado en diversos programas de crecimiento y desarrollo donde las giberelinas ejercen alguna función. La acción de las giberelinas en las células de la aleurona podría compararse con su papel en el ablandamiento del endosperma, ya que en ambos casos, esta hormona induce la expresión de enzimas que participan en la degradación de polímeros de reserva, entre ellos, de los polisacáridos de la pared. En *Arabidopsis*, se han identificado cuatro genes que poseen una alta identidad de secuencia con el gen *GAMYB* de monocotiledóneas (Kranz *et al.*, 1998). Tres de ellos, (*AtMYB33*, *AtMYB65* y *AtMYB101*) son capaces de activar *in vitro* el promotor de a-amilasa de cebada. Sin embargo, al contrario de lo observado en cereales, la expresión de sólo uno de estos genes (*AtMYB33*) está promovida por giberelinas. Este último se expresa en semillas durante la inducción de la germinación, y se ha propuesto que tanto *AtMYB33* como *AtMYB65* estarían involucrados en la percepción de las giberelinas durante la inducción de la germinación (Gocal *et al.*, 2001). Esta propuesta aún no ha sido evaluada. En papa la expresión del gen *PHOR1*, un regulador positivo de la señalización de las giberelinas, está modulada por el fotoperíodo. Asimismo, luego de un periodo de incubación de las plantas de papa en oscuridad, la exposición de estas a la luz promueve un inmediato aumento de los niveles de transcriptos de *PHOR1* en hojas (Amador *et al.*, 2001). En este caso, no se ha propuesto un rol para *PHOR1* en la germinación mediada por luz. Sin embargo, la relación entre la luz y sus cambios de expresión hacen de este gen un interesante objeto de estudio para avanzar en el conocimiento la relación entre la modulación de la respuesta a las giberelinas en semillas y los fitocromos. Por otro lado, los genes DELLA son reguladores negativos de las respuestas a las giberelinas tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, y estudios realizados con *Arabidopsis* ponen en evidencia la participación de un subgrupo de estos genes en procesos vinculados con la germinación (Lee *et al.*, 2002). Sin embargo, Bassel *et al.*, (2004) no encontraron una asociación

directa entre la acumulación de transcriptos de genes DELLA y la inducción de la germinación en *Arabidopsis*, tomate y soja, argumentando que estos genes no estarían participando en eventos relacionados con la promoción de la germinación. Es posible que los fitocromos modulen la sensibilidad a las giberelinas en las semillas mediante cambios en la expresión de alguno de los genes mencionados. Sin embargo, esta hipótesis no había sido probada hasta el momento de comenzar este trabajo de tesis.

En *Datura ferox* (Sánchez y de Miguel, 1997) así como en pimiento (Watkins *et al.*, 1985) y tomate (Groot y Karssen, 1987), las giberelinas juegan un rol central en el ablandamiento del endosperma micropilar, un proceso indispensable para la germinación en estas especies. En *D. ferox*, la luz, mediante los fitocromos, promueve la germinación cuando las semillas se incuban en temperaturas alternadas (Soriano *et al.*, 1964). La dureza del endosperma, que implica una resistencia mecánica que impide el crecimiento del embrión, está relacionada con el contenido de polímeros de manosa, un ß(1-4)manano. Después de la formación de Pfr, pero antes de la emergencia de la radícula, hay una disminución sustancial del contenido de mananos de las paredes del endosperma micropilar (Sánchez *et al.*, 1990) y esta disminción está vinculada con el aumento en la actividad de dos enzimas involucradas en la degradación de mananos (endoß-mananasa y ß-manosidasa) (Sánchez y de Miguel, 1997). La formación de Pfr también estimula la acumulación de transcriptos de endoß-mananasa (*DfMan*) y de expansinas (*DfExpa1*) (Mella *et al.*, 2004; Sánchez y Mella, 2004), indicando que los fitocromos inducen la síntesis de mananasas y expansinas en el endosperma micropilar.

La promoción del ablandamiento del endosperma en *D. ferox* requiere de señales provistas por el embrión y de la síntesis de giberelinas. A diferencia de los endospermas en contacto con el embrión, en los endospermas aislados no se observa un aumento de la actividad de las enzimas que participan en la degradación de mananos cuando estos son irradiados con luz R. La aplicación de giberelinas promueve la actividad degradadora de mananos en la región micropilar en los endospermas aislados, demostrando que el estímulo del ablandamiento del endosperma mediado por Pfr involucra la producción de un factor embrionario, probablemente una giberelina, que se moviliza al endosperma donde estimula las actividades endoß-mananasa y ß-manosidasa (Sánchez y de Miguel, 1997). Este esquema está fuertemente apoyado por el hecho que, en *D. ferox*, la formación de Pfr promueve la acumulación de mensajeros del gen de *DfGA3ß-hy* solamente en el embrión. Este gen codifica para una GA3ß-hidroxilasa, sugiriendo que la luz regula la

concentración de giberelinas en estas semillas (Sánchez y Mella, 2004). La acumulación de transcriptos de *DfMan* y *DfExpa1* está promovida por las giberelinas (Sánchez y Mella, 2004).

Por otro lado, el potencial de crecimiento del embrión es estimulado por la luz roja en *D. ferox* (de Miguel y Sánchez, 1992). El efecto de la luz sobre la capacidad expansiva del embrión fue además observado en semillas de lechuga y, en este caso, las giberelinas promueven este proceso (Carpita *et al.*, 1979; Carpita *et al.*, 1979). Hasta el momento de realizar esta tesis, este era el único antecedente sobre la relación entre las giberelinas y el estímulo del potencial de crecimiento en la promoción de la germinación por luz.

En este capítulo se ha investigado la posibilidad de que la promoción de la germinación por una LFR en *D. ferox* no involucre solamente incrementos de la concentración de giberelinas, sino que también incluye cambios en la respuesta de las semillas a las giberelinas. Asimismo, se ha estudiado la regulación de la respuesta a las giberelinas por la luz en dos procesos clave para la germinación; el ablandamiento del endosperma y la promoción de potencial de crecimiento del embrión. Sobre la base de los resultados obtenidos, se sugieren algunas de las bases bioquímicas y moleculares de los cambios de las respuestas a las giberelinas en semillas, así como un modelo integrado que relaciona los cambios en esta respuesta con la promoción de la germinación por luz. Parte de los resultados obtenidos se validaron genéticamente mediante experimentos con semillas de *A. thaliana*, que poseen alteraciones en la expresión de algunos genes que estarían participando en la señalización de los cambios en las respuestas a las giberelinas mediados por luz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas

Las semillas de *D. ferox* fueron cosechadas de plantas que invadían cultivos de soja en Monte, provincia de Buenos Aires. Las semillas fueron cosechadas a finales del otoño del año 2001, y almacenadas en frascos oscuros de vidrio a temperatura ambiente por nueve meses aproximadamente, hasta el momento en que comenzaron los experimentos. Las semillas mutantes de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas del banco de germoplasma de TAIR (www.arabidopsis.org.ar), y reproducidas junto con los genotipos salvajes, en invernáculo a 22 °C durante los meses de mayo-septiembre de 2005. Las semillas luego fueron cosechadas y almacenadas por 40 días en recipientes cerrados que contenían sílica gel, a temperatura ambiente (postmaduración). Luego de este periodo de postmaduracion, las semillas fueron utilizadas en los distintos experimentos, o almacenadas en seco, en recipientes cerrados que contenían sílica gel, a 4°C hasta su uso. El almacenamiento en estas condiciones retrasa la pérdida de dormición de las semillas, lo que permite obtener respuestas más uniformes entre repeticiones y contar con una ventana temporal mayor para realizar estos experimentos.

Fuentes de luz

La fuente de luz R (15 µmol m^{-2} seg^{-1}) estaba compuesta de tubos fluorescentes Philips 36-W en combinación con un filtro de acrílico rojo (Acrílicos Anbyn, Bs. As. Argentina). La fuente de luz RL (40 µmol m^{-2} seg^{-1}) constaba de un conjunto de lámparas reflectoras incandescentes de 150 W en combinación con un filtro de vidrio RG9 Schott (Mainz, Alemania) y un filtro de agua de 10 cm. La proporción calculada de Pfr/P (%) fue de 87 y 3 para las fuentes de R y RL, respectivamente. Las fuentes de luz adicionales utilizadas para lograr los distintos porcentajes de fitocromo activo en las semillas fueron: Pfr/P (%) 61: lámpara incandescente de 150 W (Phillips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo. Pfr/P (%) 33: lámpara incandescente de 150 W (Phillips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo y uno verde. Pfr/P (%) 20: lámpara incandescente de 150W (Phillips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo y dos filtros de acrílico azul (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Bs. As). Pfr/P (%) 10: Lámpara incandescente de 150 W (Phillips R95) en combinación con dos filtros de acetato rojo y seis filtros de acrílico azul (Paolini 2031, La Casa del Acetato, Bs. As).

Condiciones generales de incubación

Tratamiento de las semillas de *Datura ferox*. Para realizar los distintos ensayos las semillas fueron embebidas sobre algodón saturado con agua destilada, en cajas de plástico transparente, envueltas en hojas de plástico negro e incubadas en oscuridad durante 24-48 h en ciclos de temperaturas alternadas, 9 h 30 °C y 15 h a 20 °C (20/30 °C). Las cubiertas de las semillas se removieron bajo luz blanca, y las semillas se incubaron en agua o en soluciones que contenían paclobutrazol 4 ppm (2RS, 3RS-1-(4 clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H1,2,4-Triazol-1-il) pentan-3-ol, CRESTAR, SYNGENTA), o en paclobutrazol 4 ppm mas distintas soluciones de GA_3 (SIGMA) con o sin la adición de zeatina 50 µM (SIGMA). Las semillas fueron inmediatamente tratadas con un pulso de R o RL e incubadas en oscuridad a temperaturas alternadas (20/30 °C). Los experimentos se realizan con semillas sin tegumento ya que estas son más fáciles de manipular. Por otra parte, las semillas que no poseen tegumento presentan una germinación más uniforme, lo que permite obtener una definición temporal más precisa del momento de la emergencia de la radícula a través del endosperma.

Tratamiento de las semillas de *Arabiopsis thaliana*. Las semillas fueron embebidas sobre dos láminas de papel de filtro en cajas trasparentes, en soluciones de Paclobutrazol 4ppm (2RS, 3RS-1-(4 clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H1,2,4-Triazol-1-il) pentan-3-ol, CRESTAR, SYNGENTA) en combinación con distintas concentraciones de GA_4 (SIGMA). Los controles de germinación fueron embebidos sobre láminas de papel de filtro conteniendo agua destilada. Debido a que las semillas poseen una alta proporción Pfr/P establecido durante su formación en la planta madre, las mismas fueron irradiadas por 25 min con luz RL. El tratamiento de luz fue aplicado una hora después de la siembra, momento en que las semillas están parcialmente embebidas y la interconversión entre Pfr y Pr es posible. De esta manera los niveles de Pfr se reducen al 3% antes del comienzo de la escarificación, lo que permite luego observar respuestas a la luz claras e uniformes en las semillas. Luego de este tratamiento con luz RL, las cajas fueron envueltas con plásticos negros e incubadas a 4 °C por 48 h (estratificación). Finalizado este tratamiento, las semillas fueron irradiadas con luz R o RL, e incubadas a 25 °C en oscuridad por 3 días hasta el conteo de germinación.

Ensayos de germinación

La germinación se midió a los 3 días (*A. thaliana*) o 4 días (*D. ferox*) luego de los tratamientos lumínicos. Se utilizó un total de 25 (*A. thaliana*) o 30 (*D. ferox*) semillas por muestra, en al menos

cuatro repeticiones independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Análisis de la Varianza (ANVA), utilizando la transformación angular de los porcentajes de germinación obtenidos en cada tratamiento. Los resultados significativos fueron determinados a valores de *P* menores de 0.05.

Medida del potencial de crecimiento del embrión

Luego de los tratamientos lumínicos, las semillas fueron incubadas en oscuridad por 44 h, a temperaturas alternadas. Para ensayar el potencial de crecimiento del embrión, se disectó la región del endosperma micropilar bajo luz verde, de forma tal de remover el obstáculo a la expansión del eje embrionario. 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)**. La disección se llevó a cabo bajo lupa binocular. 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. Las semillas despuntadas (sin la porción correspondiente al endosperma micropilar) fueron irradiadas con un pulso de RL, con el objetivo de eliminar el Pfr formado durante la disección. La longitud del eje embrionario que sobresalía del endosperma fue medida luego de 24 h de incubar las semillas en oscuridad, a temperaturas alternadas **(Fig. II 4A)**.

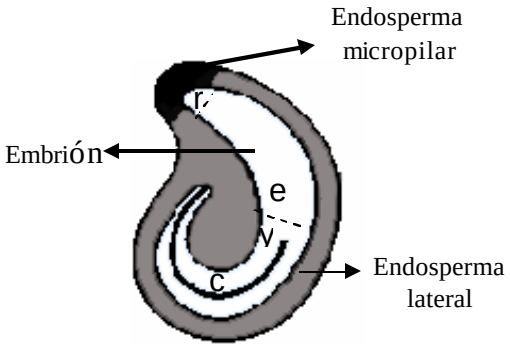


Fig. II 1. Esquema de semilla de *D. ferox*.

La porción micropilar del endosperma se indica en color negro, mientras que el endosperma lateral y el embrión se encuentran señalados en color gris y blanco, respectivamente: *r*: radícula; *e*: eje embrionario; *y*: yema; *c*: cotiledones.

Ensayos de la regulación mediada por luz de la sensibilidad a las giberelinas en endosperma micropilar

El protocolo general que se utilizó para estudiar la influencia de la luz en la sensibilidad del endosperma micropilar al GA se encuentra descripto en la **Fig. II 6A**. Luego de la imbibición en agua, las semillas fueron peladas bajo luz blanca, incubadas en Paclobutrazol 4ppm e inmediatamente tratadas con un pulso saturante de luz R o luz RL. Veinticuatro horas después de la incubación en oscuridad, las semillas fueron esterilizadas superficialmente con $NaHClO_4$ (5.5 g Cl / l), lavadas con agua destiladas y cortadas con un bisturí, como se indica en la **Fig. II 6A**. Las porciones de semillas de 2 mm de largo (conteniendo el endosperma micropilar, parte del endosperma lateral y la radícula más hipocotilo de los embriones), fueron transferidas a cajas con algodón saturado las siguientes soluciones: (a) Paclobutrazol 4ppm y distintas concentraciones de GA_3; (b) Paclobutrazol 4ppm, GA_3 100 µM y zeatina 50µM; (c) Paclobutrazol 4ppm y zeatina 50µM; (d) Paclubutrazol 4ppm, sin zeatina ni GA_3. Estas semillas fueron re-irradiadas con un pulso de luz R o RL e incubadas en oscuridad a temperaturas alternadas (20/30 °C). Las porciones de semillas fueron expuestas en todo momento a paclobutrazol 4ppm, con el fin de inhibir la síntesis de GA endógenas. Las actividades enzimáticas y niveles de mensajeros fueron determinados a las 16 o 6 h después de los tratamientos lumínicos.

Ensayos de la influencia del embrión en la sensibilidad a las giberelinas en el endosperma micropilar

Luego de la imbibición de las semillas en agua por 24h, estas fueron peladas bajo luz blanca, esterilizadas en $NaHClO_4$ (5.5 g Cl / l), lavadas con agua destiladas e inmediatamente cortadas, como se indica en la **Fig. II 8A**. Las porciones de semillas (tipo 1: porciones de semillas con embrión y 2: porciones de semillas sin embrión) fueron expuestas a un pulso de R e incubadas en oscuridad a temperaturas alternadas (20/30 °C) en un medio con distintas concentraciones de GA_3 con o sin la adición de zeatina 50µM. También se realizaron incubaciones sin GA_3 ni zeatina o sólo con zeatina como tratamientos control. En las porciones de semillas tipo 2, el embrión fue removido mediante la aplicación de fuerza sobre el extremo del endosperma micropilar. Las porciones de semillas fueron expuestas en todo momento a paclobutrazol 4ppm, con el fin de inhibir la síntesis de GA endógenas. La medición de actividades enzimáticas y acumulación de mensajeros se realizaron luego de 22 h de la incubación en los diferentes tratamientos hormonales.

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. Las muestras fueron homogeneizadas en morteros pre-enfriados, conteniendo 300 µl de buffer citrato 0.1 M pH 5,4. El extracto fue centrifugado 20 min a 27.000 g. La actividad endoß-mananasa se ensayó a partir del sobrenadante obtenido de la centrifugación. 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, este segundo sobrenadante fue utilizado para ensayar la actividad ß-manosidasa.

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

Aislamiento, secuenciación y análisis de fragmentos parciales de ADNc de DfPHOR, DfSPY y DfMYB

Con el propósito de aislar secuencias parciales de ANDc de los genes *PHOR1*, *SPY* y *GAMYB* en *D. ferox*, se procedió al diseño de un par de cebadores para cada uno de estos genes.

El diseño de cebadores se realizó sobre la base de secuencias publicadas en el GenBank, mediante el estudio de regiones de secuencias de aminoácidos conservadas entre especies. En el caso del gen *SPY* se utilizaron secuencias de genes ortólogos de petunia, tomate, y *Arabidopsis*, esperándose amplificar un fragmento de aproximadamente 165 pb.

Los cebadores para amplificar mensajeros de *PHOR1* fueron diseñados a partir de la secuencia del gen de papa solamente, dado que este gen sólo fue aislado y clonado en esta especie. En este caso, se esperaba amplificar un fragmento alrededor de las 180 pb. Para el diseño de estos cebadores, se utilizo el programa *Primer3* (Whitehead Institute for Biomediacl Research, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3).

El diseño de cebadores para la amplificación del gen *GAMYB* se llevó a cabo alineando las secuencias publicadas en el GenBank de genes ortólogos en *Arabidopsis*, arroz y cebada, esperándose obtener un fragmento de 150 pb aproximadamente. La estructura de los cebadores diseñados se evaluó utilizando el programa Vector NTI Versión 3.0, InforMax, Inc.

Utilizando los distintos pares de cebadores diseñados **(Tabla II 1)**, se obtuvieron los productos de RT-PCR del peso molecular esperado **(Fig. II 2)**, amplificados a partir de RNA total extraído de embriones y del endosperma micropilar, 24 y 46 h después del pulso de luz roja inductor de la germinación. El análisis de secuencias de los fragmentos obtenidos demostró una alta identidad con sus respectivos genes ortólogos en otras especies **(Fig. II 10-11)**. Los fragmentos con alta identidad con los genes *PHOR1*, *SPY* y *GAMYB* fueron entonces llamados *DfPHOR*, *DfSPY* y *DfMYB*, respectivamente. Cabe destacar que no se detectaron diferencias de secuencias entre los fragmentos de cada gen amplificados de embrión y endosperma micropilar.

Transcripto a amplificar	***Cebador superior***	***Cebador inferior***
DfPHOR	AGCTCACCGGGATACACAAC	ACTCACAATCGCATCACTCG
DfMYB	GGGTAACTGGAATGCTGTG	GCCATCTGTGCCCATTTATT
DfSPY	CAGGTGACTTGGATTGGATACCC	GCTTCAGGAGAGGGTGTATAAC

Tabla II 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de transcriptos de *DfPHOR*, *DfMYB* y *DfSPY* en *D. ferox*. Las secuencias se encuentran indicadas desde su extremo 5´al 3´.

La identidad de los productos de PCR obtenidos con los diferentes pares de cebadores fue determinada por secuenciación de los fragmentos previamente clonados en plásmidos pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega). Las secuenciaciones fueron realizadas por la Unidad de secuenciación del Instituto Leloir, Universidad de Buenos Aires. Las secuencias obtenidas fueron publicadas en el GenBank con los siguientes números de accesiones: *DfPHOR*: AY706991 (secuencia de embrión) y AY729690 (secuencia de endosperma micropilar). *DfSPY*: AY729691 y AY729692 secuencias de embrión y endosperma micropylar, respectivamente. *DfMYB*: AY729693 (embrión) y AY729694 (endosperma micropilar).

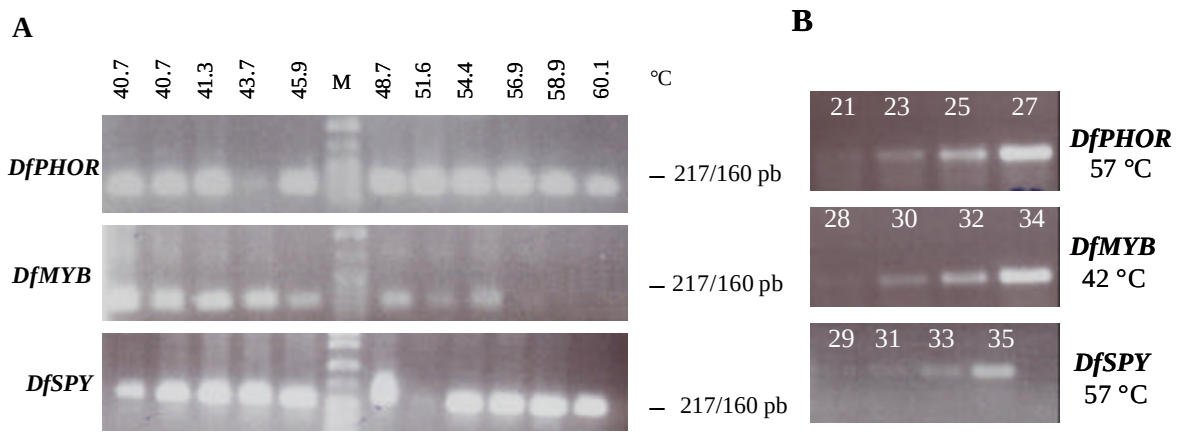


Fig. II 2. Puesta a punto de la reacción de PCR para el aislamiento de secuencias ortólogas a los genes *PHOR1*, *GAMYB* y *SPY* en semillas de *D. ferox*.

(A) Fotografía de la electroforesis en gel de agarosa de la puesta a punto de la temperatura de hibridación para los distintos cebadores específicos en la reacción de PCR. El número de ciclos utilizados para la reacción fue de 40, mientras que las condiciones de reacción y de electroforesis son las descriptas en materiales y métodos. Las distintas temperaturas de hibridación utilizadas se indican en el margen superior de la figura. Las flechas a la derecha de las fotografías indican la posición de corrida del fragmento de 217/160 pb del marcador molecular *Movil 32* (Instituto Leloir). **(B)** Fotografía de la electroforesis de gel de agarosa de productos de PCR, obtenidos a partir reacciones con distinto número de ciclos de amplificación. Las reacciones se realizaron utilizando como molde ADNc de embriones, las temperaturas de hibridación utilizadas son las indicadas debajo del nombre de cada producto de PCR. *DfPHOR*, *DfSPY* y *DfMYB*: fragmentos de PCR obtenidos a partir de ADN o ADNc de *D. ferox*, que presentan una alta identidad los genes *PHOR1*, *SPY* y *GAMYB* respectivamente.

Extracción de ARN y análisis de la expresión de genes

Las extracciones de ARN fueron realizadas a partir de muestras que contenían 30 partes de endosperma micropilar o embriones, por el método de TRIZOL (Gibco). El ARN provenientes de las mismas fue resuspendido siempre en 50 µl de agua MiliQ.

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo utilizando un total de 3 µg de RNA de embriones. El ARN obtenido a partir de endosperma micropilar no pudo ser cuantificado debido a la bajísima cantidad extraída a partir de este tejido, por lo que se utilizó un volumen fijo de 12 µl de muestra en las reacciones de transcripición reversa. Las muestras fueron tratadas con DNAsa (DNAse I, RNAse free, Boehringer) 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 µM 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. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima GoTaq (Promega) y 2 µl del ADNc como molde. Las temperaturas de hibridación fueron de: 40 °C (*DfMan*), 57 °C (actina, *DfPHOR* y *DfSPY*), 60 °C (*DfExpa*) y 42 °C (*DfMYB*). Con el objetivo de asegurar que las reacciones de PCR fueron realizadas dentro del rango lineal de amplificación, se llevaron a cabo curvas de calibración con distintos números de ciclos de PCR para cada gen en cada tejido. El rango óptimo de números de ciclos, y utilizado entonces en las reacciones de PCR fue de: Actina: 20-23 ciclos (embriones); 23-25 ciclos (endosperma micropilar), *DfExpa*: 25-28 ciclos, *DfPHOR*: 23-25 ciclos (embriones); 23-27 ciclos (endosperma micropilar); *DfSPY*: 32-36 ciclos (embriones), 37-39 ciclos (endosperma micropilar), *DfMYB*: 30-32 ciclos (embriones); 32-34 ciclos (endosperma micropilar).

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen de mananasa fueron: 5´CGCGGATCCACAATTATGGCATGGGA 3´ y 5´CGCGGATCCATGGATAGTAGCAAAATC 3´ cebador superior e inferior, respectivamente (Burgin, 2001). Los cebadores utilizados para la amplificación de *DfExpa1* y actina fueron descriptos previamente en Mella *et al.*, (2004). Los utilizados para la amplificación de *DfMYB*, *DfPHOR* y *DfSPY* fueron los mismos que se utilizaron para aislar estas secuencias a partir de cDNA de *D. ferox*.

Los productos obtenidos así por RT-PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (w/v) con bromuro de etidio, transferidos a una membrana de nylon (Hybond N^+, 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 cebadores, descriptos sobre la base del ADNc amplificado a partir de endosperma micropilar, clonado en plásmido pGEM-T (pGEM-T Easy Vector System, Promega) y secuenciado en el Instituto Leloir, UBA. Posteriormente, estos fragmentos fueron marcados con [^{32}P]dCTP por la metodología *random priming* (Labeling System, Promega U1100). La pre-hibridación y la hibridación se realizaron utilizando solución de hibridación UltraHyb (Ambion) a 60 °C. Los lavados de las membranas se realizaron por duplicado, a la misma temperatura usando soluciones de SSC 2x, 0.1 % SDS, SSC 1x, 0.1 % SDS y una sola vez con SSC 0.1x, 0.1 % SDS. Las membranas fueron entonces expuestas a una pantalla sensible a fósforo radioactivo a temperatura ambiente, por 4-24 h. La señal fue revelada utilizando el documentador PhosphorImager Storm 840 (Molecular Dynamics). Las intensidades de bandas fueron densitometradas utilizando el programa ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics).

Los resultados se expresaron como la relación *DfExpa*, *DfMan*, *DfPHOR*, *DfMYB* o *DfSPY* / actina para cada muestra, normalizados a 1 como se indica en las leyendas de las figuras. Los resultados se analizaron mediante el test de *t* apareado, utilizando la transformación angular de los datos de densitometría de bandas. Los resultados significativos fueron determinados a valores de *P* menores de 0.1 y medias con diferencias mayores a 2.

RESULTADOS

La luz roja aumenta la respuesta a las giberelinas en la germinación

La promoción de la germinación en *D. ferox*, *A. thaliana* y lechuga está relacionada con un aumento en los niveles de giberelinas (Toyomasu *et al.*, 1993; Sánchez y de Miguel, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1998; Yamauchi *et al.*, 2004). Asimismo, en *Arabidopsis*, el estímulo de la germinación por una LFR involucra cambios en la respuesta a esta hormona (Yang *et al.*, 1995). En esta sección se investigó la posibilidad que, en *D. ferox*, la forma activa de los fitocromos module también la respuesta de las semillas a las giberelinas para la germinación.

La población de semillas de *Datura ferox* utilizada en estos experimentos mostró una respuesta aumentada al ácido giberélico (GA) cuando fueron tratadas con R, en comparación a aquellas tratadas con RL. En todos los casos, luego de la remoción de las cubiertas y antes de los tratamientos hormonales y lumínicos, la síntesis de giberelinas endógenas fue inhibida mediante la

adición de paclobutrazol al medio de incubación. En estas condiciones experimentales, las semillas tratadas con un pulso de R germinaron un 64.6% en respuesta al GA, mientras que aquellas tratadas con un pulso de RL lo hicieron en un 43.3 %, indicando que los fitocromos, mediante una LFR, estimulan la respuesta a giberelinas para la germinación **(Fig. II 3)**.

La incubación de semillas con zeatina (una citocinina) promovió fuertemente la respuesta al GA para la germinación en semillas tratadas con RL, demostrando que las citocininas reemplazan los requerimientos de Pfr para la promoción de la respuesta al GA. Por otro lado, cuando las semillas fueron tratadas con un pulso de luz R, la aplicación de zeatina al medio de incubación no tuvo un efecto significativo en la respuesta a las giberelinas **(Fig. II 3)**. Estos resultados muestran un efecto redundante entre las citocininas y la luz en la germinación, y sugiere que las citocininas son componentes río debajo de la señal lumínica que estimula la respuesta al GA.

Independientemente del tratamiento lumínico, la adición de zeatina al medio no tuvo ningún efecto en la promoción de la germinación cuando las semillas se incubaron en presencia de paclobutrazol sin el agregado de GA **(Fig. II 3)**, indicando que las citocininas promueven la germinación mediante la promoción de la sensibilidad a las giberelinas en las semillas.

Debido a su tamaño y estructura, las semillas de *D. ferox* ofrecen la oportunidad de estudiar procesos vinculados a la germinación separadamente en distintos tejidos u órganos con relativa facilidad. Hasta el momento de realizar esta tesis no existía información sobre la localización espacial de los cambios en la respuesta a las giberelinas relacionados con la germinación, por ejemplo, si estos ocurren en embriones, endosperma micropilar o en ambos sitios. Es por ello que se estudió la influencia de la luz sobre la sensibilidad a esta hormona en células del embrión y endosperma micropilar, así como el posible origen y naturaleza química de la señal que promueve el aumento de esta respuesta.

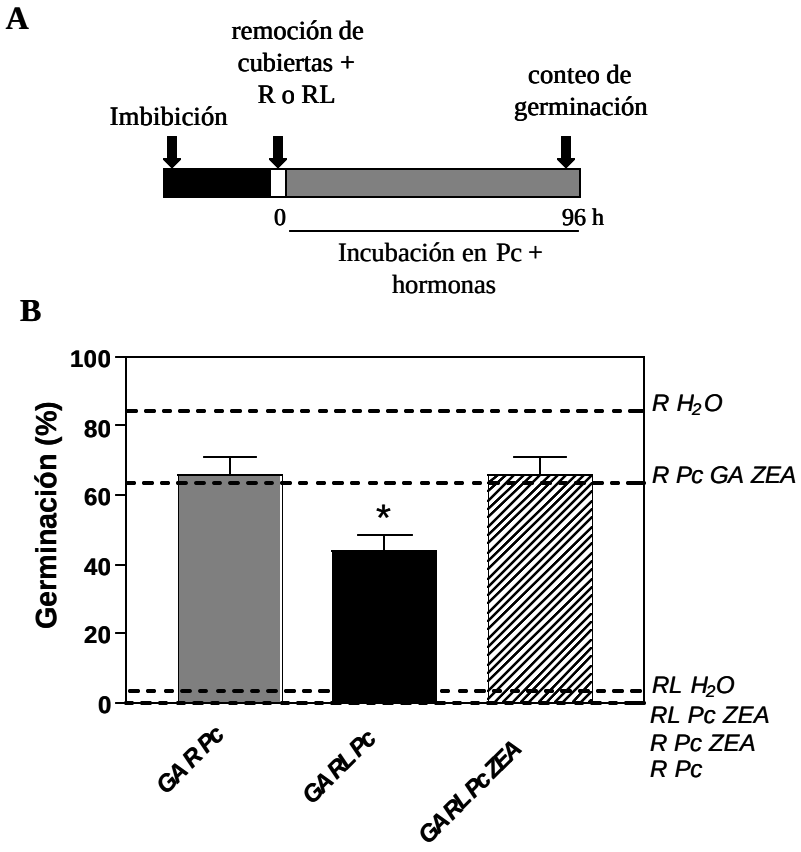


Fig. II 3. Los fitocromos regulan la respuesta a las giberelinas para la germinación de semillas de *D. ferox*.

(A) Protocolo experimental. Las semillas fueron embebidas durante 40 h, peladas e incubadas en agua, Pc, Pc + GA con o sin el agregado de ZEA e inmediatamente tratadas con un pulso de luz R o RL. Luego de los tratamientos lumínicos las semillas fueron incubadas en oscuridad (20/30 °C) hasta el conteo de germinación. **(B)** Porcentaje de germinación medido 96 h después de los tratamientos lumínicos. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media (D.E.M) de datos obtenidos a partir de 4 experimentos independientes. El porcentaje de germinación de los controles (líneas punteadas) fue: *R H_2O*: 84 $\pm$ 5; *R Pc GA ZEA*: 61 $\pm$ 8; *RL H_2O*: 5 $\pm$ 3; *RL Pc ZEA*: 0; *R Pc ZEA*: 0; *R Pc*: 0. *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM, *ZEA*: zeatina 50µM. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre tratamientos (ANVA, $P < 0.05$)

El aumento del potencial de crecimiento del embrión mediado por R requiere de la biosíntesis de novo de giberelinas

Las semillas de *D. ferox* poseen dormición impuesta por las cubiertas, y la germinación depende del balance entre la capacidad expansiva del embrión y la resistencia mecánica que opone el endosperma (de Miguel y Sánchez, 1992). La luz R promueve el aumento del potencial de crecimiento del embrión (de Miguel y Sánchez, 1992), y en este caso, se desconocía el efecto de las giberelinas sobre este proceso.

Como se observa en la **Fig. II 4**, cuando las semillas son incubadas en un medio conteniendo paclobutrazol, la luz R no tiene un efecto significativo en el potencial de crecimiento del embrión, indicando que la acción del Pfr en este caso, también requiere de la síntesis de novo de giberelinas. Esta observación está fuertemente apoyada por el hecho que el agregado de GA a las semillas tratadas con luz R revierte el efecto del paclobutrazol **(Fig. II 4)**.

Estos resultados indican que las giberelinas son componentes río abajo de las señales lumínicas que aumentan la capacidad expansiva del embrión en *D. ferox*.

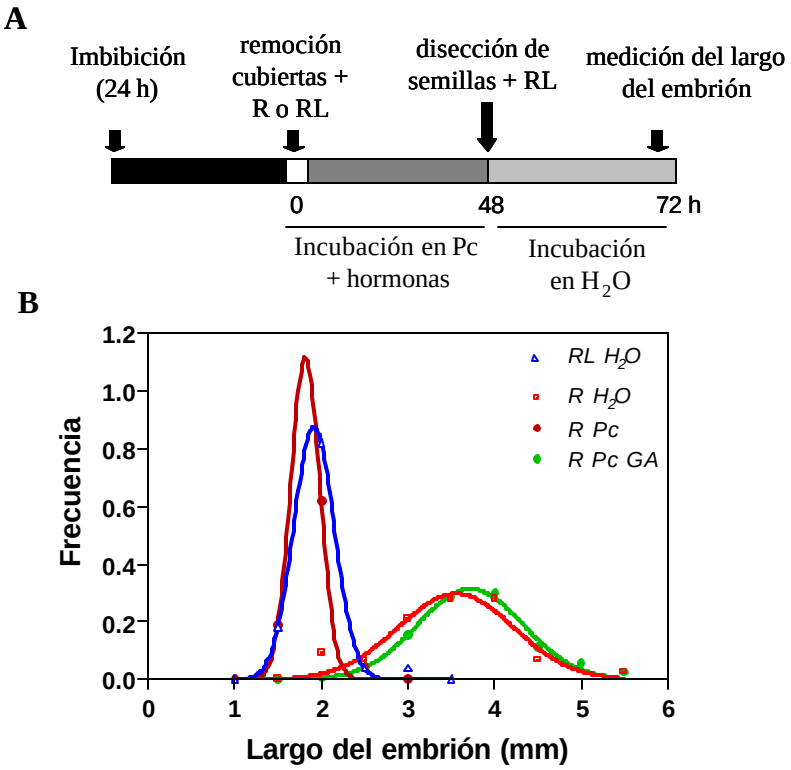


Fig. II 4. La promoción del potencial de crecimiento del embrión por una LFR requiere de la biosíntesis de giberelinas.

(A) Protocolo experimental. Las semillas fueron embebidas en oscuridad por 24 h (20/30 °C). A continuación fueron peladas e incubadas en agua o en soluciones conteniendo Pc con o sin el agregado de GA, como se indica en B, tratadas con un pulso de luz R o RL e incubadas en oscuridad por 48 h. Luego, se quitó la porción micropilar del endosperma, y las semillas fueron transferidas a agua y tratadas con un pulso de luz RL. Las semillas se incubaron en oscuridad (25 °C) por 24 h, momento en que se midió la longitud del embrión. **(B)** Frecuencia de distribución del largo del embrión luego de los distintos tratamientos lumínicos y hormonales. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes, utilizando 25 embriones por muestra. *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM.

La luz, mediante los fitocromos, modula la respuesta a las giberelinas en las células del embrión

Como se mencionó anteriormente, la luz R aumenta la sensibilidad a las giberelinas en la germinación **(Fig. II 3)**, y por otro lado, las giberelinas están implicadas en el aumento del potencial de crecimiento del embrión **(Fig. II 4)**. Se estudió entonces la influencia de la luz en la respuesta a las giberelinas en este tejido.

El efecto del agregado de GA sobre el potencial de crecimiento del embrión fue significativamente mayor en semillas tratadas con R a comparación de aquellas tratadas con un pulso de R seguido por RL, demostrando que la respuesta de las células del embrión al GA está controlada por los fitocromos, a través de una LFR **(Fig. II 5A)**.

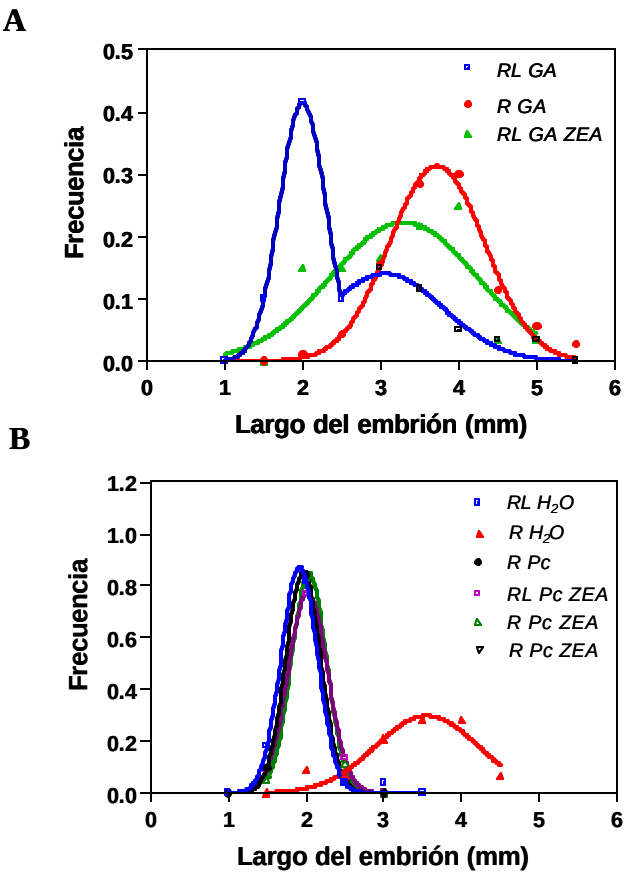


Fig. II 5. Los fitocromos, a través de una LFR, promueven la respuesta a las giberelinas en células del embrión. **(A)** y **(B)** Frecuencia de distribución del largo del embrión luego de los distintos tratamientos lumínicos y hormonales. El protocolo experimental es similar al indicado en la Fig. II 4, a diferencia que una vez peladas, las semillas fueron incubadas en soluciones con H_2O, Pc o Pc + GA con o sin el agregado de ZEA como se indica en los gráficos. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes, utilizando 25 embriones por muestra. El protocolo experimental es similar al descrito en la Fig. II 4 A. *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM, *ZEA*: zeatina 50µM.

La incubación de las semillas con zeatina promovió fuertemente la acción del GA sobre el potencial de crecimiento del embrión de semillas tratadas con luz RL **(Fig. II 5A)**, sugiriendo que las citocininas son componentes río abajo de la señal lumínica que estimula la respuesta al GA en células del embrión. Por otro lado, la adición de zeatina al medio no tuvo efecto sobre el potencial de crecimiento del embrión cuando las semillas fueron incubadas en ausencia de GA y la biosíntesis de giberelinas endógenas fue inhibida por el agregado de paclobutrazol **(Fig. II 5B)**. Este resultado es independiente del tratamiento lumínico, e indica que las citocininas no ejercen un efecto directo en la fuerza expansiva del embrión, sino que influyen en esta mediante el incremento de la sensibilidad al GA.

Los fitocromos, a través una LFR, regulan la respuesta a las giberelinas del endosperma micropilar

El estímulo de la germinación requiere tanto del ablandamiento del endosperma como de un aumento del potencial de crecimiento del embrión (de Miguel y Sánchez, 1992). Como se ha demostrado anteriormente, la promoción de la germinación por los fitocromos involucra cambios en la sensibilidad al GA en las semillas **(Fig. II 3)**, y las respuestas de las células del embrión al GA son dependientes de la luz **(Fig. II 5)**. Es por ello que en esta sección se investigó la posibilidad que los fitocromos también modulen la respuesta al GA de las células del endosperma micropilar.

Para ello, se evaluó el efecto de la luz R sobre la promoción por GA de la actividad endo-ß-mananasa, ß-manosidasa y acumulación de mensajeros de expansinas (*DfExpa1*) y mananasas (*DfMan*) en el endosperma micropilar. La expresión y acumulación de mensajeros de esos genes está fuertemente promovida por las giberelinas en el endosperma micropilar de *D. ferox* (Sánchez y de Miguel, 1997; Sánchez y Mella, 2004), y su medición en respuesta al agregado de GA al medio de incubación, cuando la biosíntesis de esta hormona se encuentra inhibida, es un buen indicador de la sensibilidad de este tejido al GA.

La luz R estimula la acción del GA en la promoción de las actividades endo-ß-mananasa y ß-manosidasa en el endosperma micropilar **(Fig. II 6)**. Los experimentos de RT-PCR demuestran que la acumulación de mensajeros de expansinas (*DfExpa1*) y mananasa (*DfMan*) en endosperma en respuesta al GA también está modulada por los fitocromos, a través de una LFR. El nivel de transcriptos de estos genes es mucho mayor en endospermas de semillas que fueron irradiadas con

luz R, en comparación de aquellos de semillas irradiadas con luz RL **(Fig. II 7)**. Asimismo, el agregado de zeatina a las porciones de semillas tratadas con luz RL incrementa la respuesta al GA en la promoción de las actividades endoß-mananasa y ß-manosidasa **(Fig. II 6)**, así como la acumulación de mensajeros *DfMan* y *DfExpa1* **(Fig. II 7)**. No se ha observado efectos del agregado de zeatina sobre la acumulación de transcriptos de *DfMan* y *DfExpa1* en semillas incubadas en ausencia de GA, cuando la biosíntesis de giberelinas fue inhibida por el agregado de paclobutrazol **(Fig. II 7)**, indicando que la zeatina no ejerce un efecto directo en la acumulación de transcriptos de estos genes, sino que actúa a través de la promoción de la sensibilidad al GA de las células del endosperma micropilar.

En conjunto, estos resultados demuestran que las respuestas al GA del endosperma micropilar está regulada por los fitocromos a través de una LFR, y sugieren que las citocininas son componentes de la señal lumínica que promueve la respuesta al GA en este tejido.

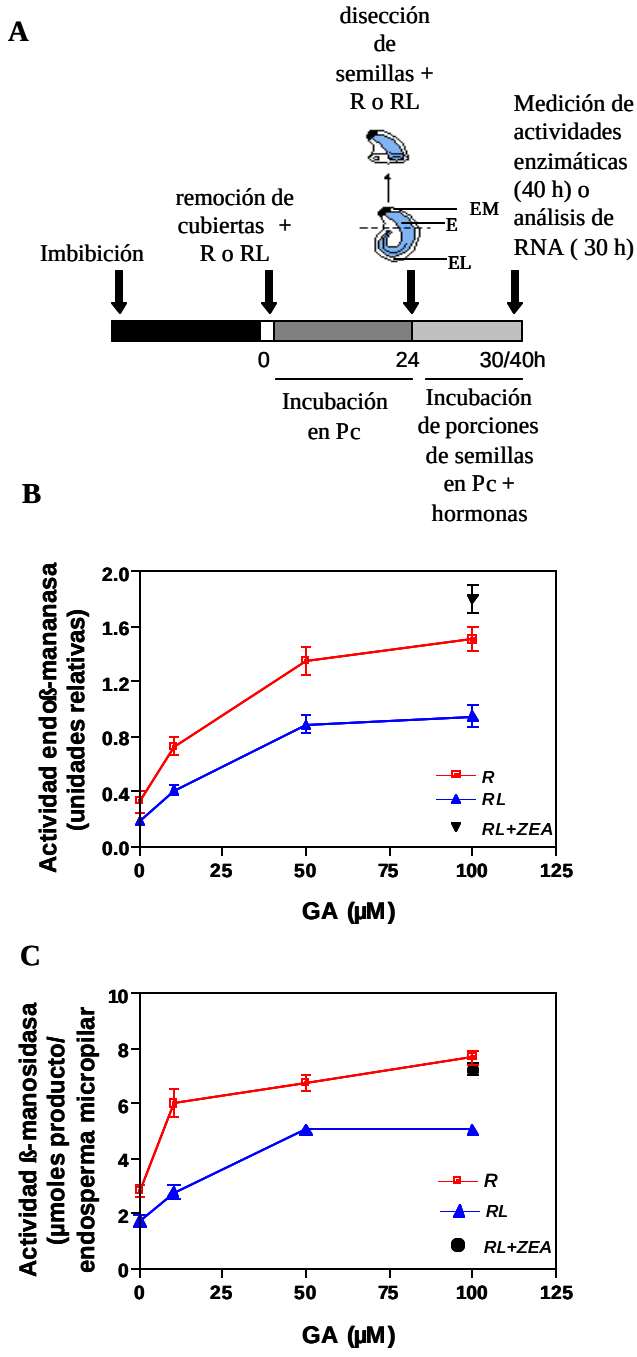
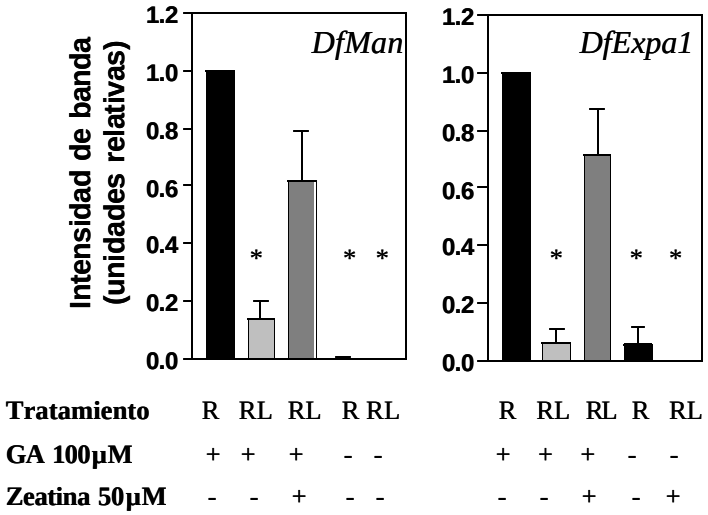


Fig. II 6. Los fitocromos, a través de una LFR, modulan la respuesta al GA para la promoción de las actividades endo ß-mananasa y ß-manosidasa en el endosperma micropilar.

(A) Protocolo experimental. Las semillas fueron embebidas en oscuridad por 24 h (20/30 °C), peladas y tratadas con un pulso de luz R o RL. Luego de 24 h de incubación en oscuridad en Pc, se llevó a cabo la disección de semillas y las porciones conteniendo el endosperma micropilar, parte del endosperma lateral y del embrión se transfirieron a un medio de incubación conteniendo Pc + GA con o sin el agregado de ZEA, y se trataron con un pulso de R o RL. Las muestras de endosperma micropilar se tomaron luego de 16 o 6 h de incubación en oscuridad, para los análisis de actividad enzimática o la medición de RNA (Fig. II 7), respectivamente. La biosíntesis de giberelinas fue inhibida por el agregado de Pc luego de la remoción de las cubiertas seminales y hasta el momento de extracción de muestras. **(B)** Actividad endoß-mananasa y **(C)** actividad ß-manosidasa en función de la concentración de GA exógeno. Las barras representan la D.E.M. de al menos 3 repeticiones independientes.

Pc: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3, *ZEA*: zeatina 50 µM. EM: endosperma micropilar, E: embrión, EL: endosperma lateral

A



B

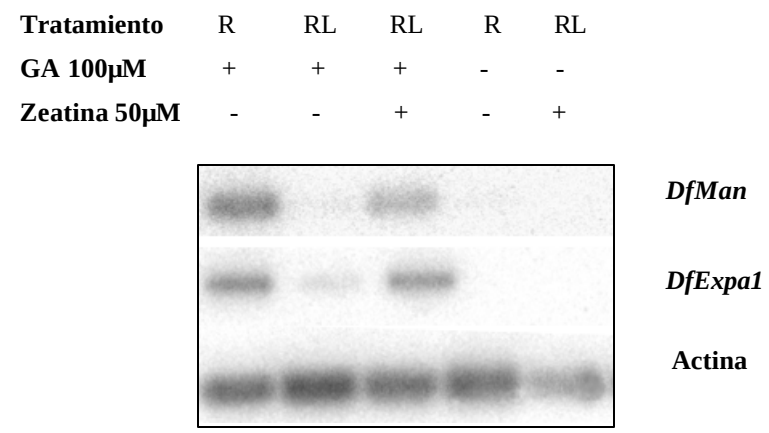


Fig. II 7. La respuesta al GA del endosperma micropilar para la acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpa1* está bajo control de los fitocromos.

(A) El protocolo experimental es similar al descprito en la Fig. II 6A. Medias y D.E.M. de las densitometrías de bandas obtenidas a partir de 3 experimentos independientes de RT-PCR. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento de R + GA ($P < 0.05$). **(B)** Autorradiografía de los productos de RT-PCR, hibridados con las sondas específicas (*DfMan*, *DfExpa1* y actina).

La señal lumínica que modula la respuesta al GA en el endosperma micropilar es percibida por el embrión

Experimentos previos demuestran que la promoción del ablandamiento del endosperma micropilar por una LFR está mediada, al menos en parte, por la acción de las giberelinas sintetizadas en las semillas en respuesta la luz R y que el embrión es el origen mas probable de estas giberelinas, las cuales se moverían al endosperma micropilar promoviendo así la degradación de las paredes celulares de este tejido (Sánchez y de Miguel, 1997).

Con el propósito de evaluar la posibilidad de que el embrión, además de ser origen de giberelinas, es fuente de señales capaces de regular las respuestas a esta hormona en el endosperma micropilar, se midió la actividad endo-ß-mananasa y ß-manosidasa así como la acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpa1* en respuesta a giberelinas en el endosperma micropilar de porciones de semillas que incluyen, o no, una parte del embrión (el eje embrionario y la radícula). En los tratamientos que involucran porciones de semillas sin embrión, este fue removido antes de realizar los tratamientos con GA. En todos los casos, una vez llevada a cabo la disección de las semillas, se inhibió la síntesis de giberelinas endógenas mediante la incubación con paclobutrazol **(Fig. II 8A)**.

La actividad endo-ß-mananasa en el endosperma micropilar en respuesta al GA está fuertemente estimulada por el contacto del endosperma con el embrión. La respuesta al GA para la actividad endoß-mananasa en endospermas micropilares provenientes de porciones de semillas con embrión es mucho mayor (2,5 veces) y se satura a concentraciones mas altas de GA que en endospermas de porciones de semillas sin embrión **(Fig. II 8B)**. Resultados similares se observan en la promoción de la actividad ß-manosidasa **(Fig. II 8C)**. Por otro lado, la luz no tuvo efectos en la regulación de la actividad endoß-mananasa por GA cuando los endospermas fueron incubados sin embrión.

Estos resultados demuestran que factores provenientes del embrión aumentan la respuesta a las giberelinas para la actividad degradadora de mananos.

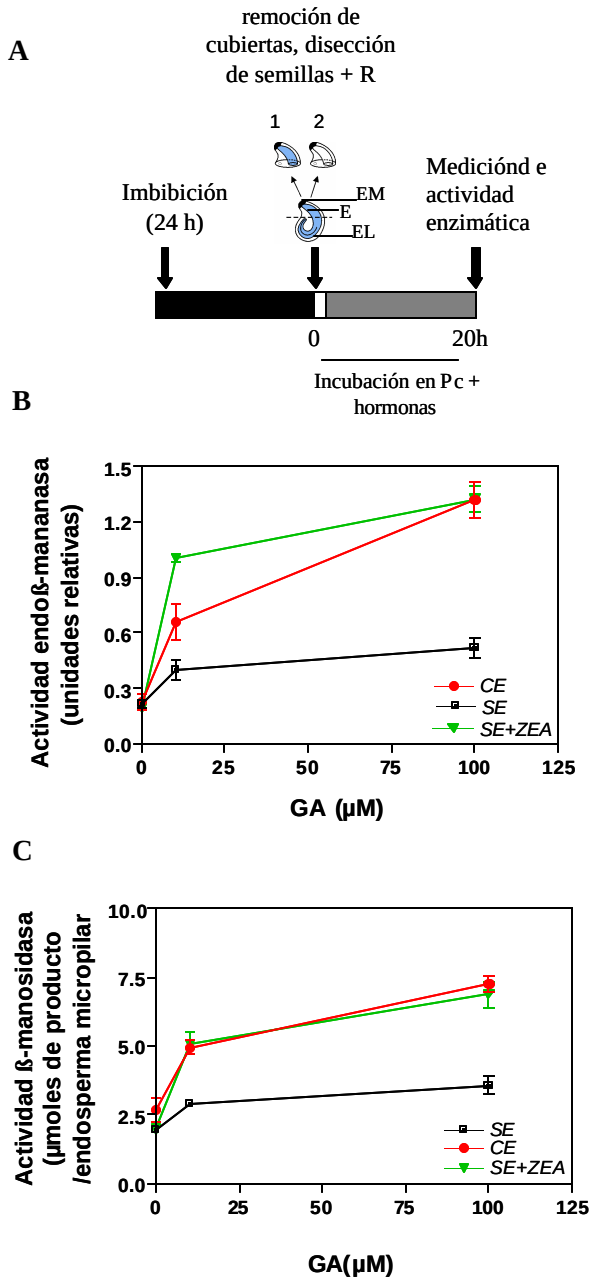


Fig. II 8. La señal lumínica que modula la respuesta al GA de la actividad degradadora de mananos en el endosperma micropilar es percibida por el embrión.

(A) Protocolo experimental. Las porciones de semillas con (1) o sin (2) embrión fueron expuestas a una solución con distintas concentraciones de GA con o sin el agregado de ZEA, tratadas inmediatamente con un pulso de luz R e incubadas en oscuridad por 20 h. Una vez peladas y cortadas, la biosíntesis de giberelinas fue bloqueada en las porciones de semillas por el agregado de paclobutrazol al medio, hasta el momento de extracción de muestras. **(B)** y **(C)** Actividad endoß-mananasa y ß-manosidasa, respectivamente, en función de concentraciones crecientes de GA. Las barras representan la D.E.M de al menos 3 repeticiones independientes.

EM: endosperma micropilar, *E*: embrión, *EL*: endosperma lateral, *CE*: porciones de semillas con embrión, *SE*: porciones de semillas sin embrión, *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM, *ZEA*: zeatina 50µM.

Con el propósito de estudiar la posible naturaleza química de la señal embrionaria que promueve la sensibilidad al GA en el endosperma micropilar, se analizó el efecto las citocininas en la promoción de la actividad endoß-mananasa y ß-manosidasa en endospermas provenientes de porciones de semillas sin embrión. El agregado de zeatina promovió fuertemente la actividad degradadora de mananos en respuesta a GA en endospermas sin embrión **(Fig. II 8)**, siendo estos

valores ahora similares al de endospermas que fueron incubados sin zeatina pero en contacto con el embrión **(Fig. II 8)**. Por otro lado, la presencia del embrión promueve fuertemente la acumulación de transcriptos de *DfMan* y *DfExpa1* en respuesta al GA en endosperma micropilar **(Fig. II 9)**. El agregado de zeatina al medio de incubación produce un aumento dramático en la acumulación de mensajeros de ambos genes en el endosperma micropilar de porciones de semillas sin embrión, ejerciendo este efecto sólo cuando son aplicadas en combinación con giberelinas **(Fig. II 9)**.

En su conjunto, los resultados aquí expuestos demuestran que la señal lumínica que modula la respuesta al GA en el endosperma micropilar es percibida por el embrión, y que las citocininas serían componentes que median la comunicación embrión-endosperma.

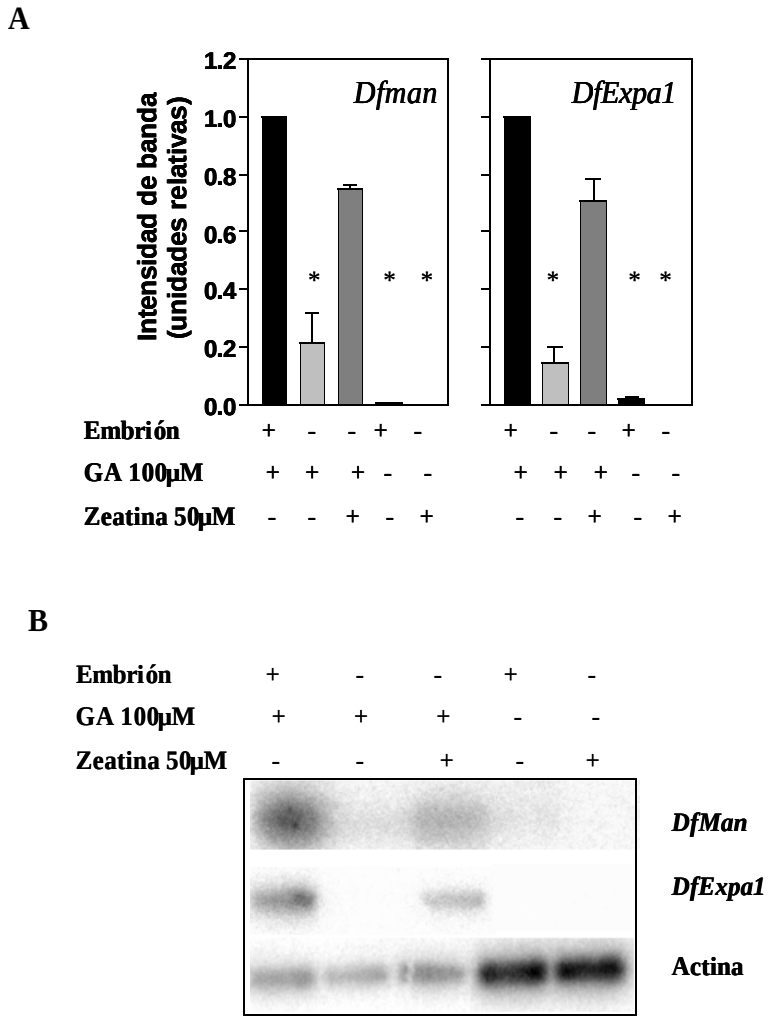


Fig. II 9. Señales provenientes del embrión modulan la respuesta al GA en el endosperma micropilar para la acumulación de mensajeros de *DfMan* y *DfExpa*. (A) Medias y D.E.M de densitometrías de bandas obtenidas a partir de 3 experimentos independientes de RT-PCR. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento CE + GA ($P < 0.05$). **(B)** Autorradiografía de los productos de RT-PCR, hibridados con las sondas específicas (*DfMan*, *DfExpa1* y actina). El protocolo experimental es similar al descripto en la Fig. II 8, a diferencia que los tratamientos hormonales consistieron en incubaciones con GA_3 100µM con o sin el agregado de zeatina.

Clonado y caracterización de fragmentos de genes que participan en la vía de transducción de las giberelinas, en embrión y endosperma micropilar

Con el propósito de estudiar las bases moleculares de los cambios en la sensibilidad a las giberelinas mediadas por fitocromos en semillas de *D. ferox*, se diseñaron cebadores específicos para amplificar, mediante RT-PCR, fragmentos de los genes *SPINDLY* (*SPY*) (Jacobsen *et al.*, 1996), *PHOR1* (Amador *et al.*, 2001) y *GAMYB* (Gubler *et al.*, 1995) a partir de ADNc total de embrión y endosperma micropilar de *D. ferox*. Estos genes participan en la señalización de las giberelinas en plantas, y fueron elegidos porque, como se indica en la introducción, podrían estar participando la señalización de las giberelinas en la germinación, como es el caso de los genes *SPY* y *GAMYB*, o estaría interaccionando con vías de señalización de la luz como es el caso del gen *PHOR1*. Los fragmentos obtenidos se denominaron *DfSPY*, *DfMYB* y *DfPHOR*, respectivamente.

La comparación de las secuencias obtenidas con otras ya publicadas, mostró que *DfPHOR* presenta un 90% de identidad, y tres deleciones, con la secuencia de ADN de papa, mientras que la traducción de este fragmento mostró una identidad de secuencia de aminoácidos del 93.17%. Por otro lado, *DfMYB* presentó un 76% de identidad de nucleótidos con una región del gen *GAmyb65* de *Arabidopsis*, y un 86% de identidad a nivel de proteína. *DfSPY* compartió un 95.1%, 94.48% y 74.3% de identidad de nucleótidos con una región de estos genes ortólogos en tomate, petunia y *Arabidopsis*, respectivamente, mientras que la identidad de las secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de la traducción del fragmento de ADN secuenciado fue del 98% para tomate, 98% con petunia y 92% con *Arabidopsis* **(Fig. II 10-11)**.

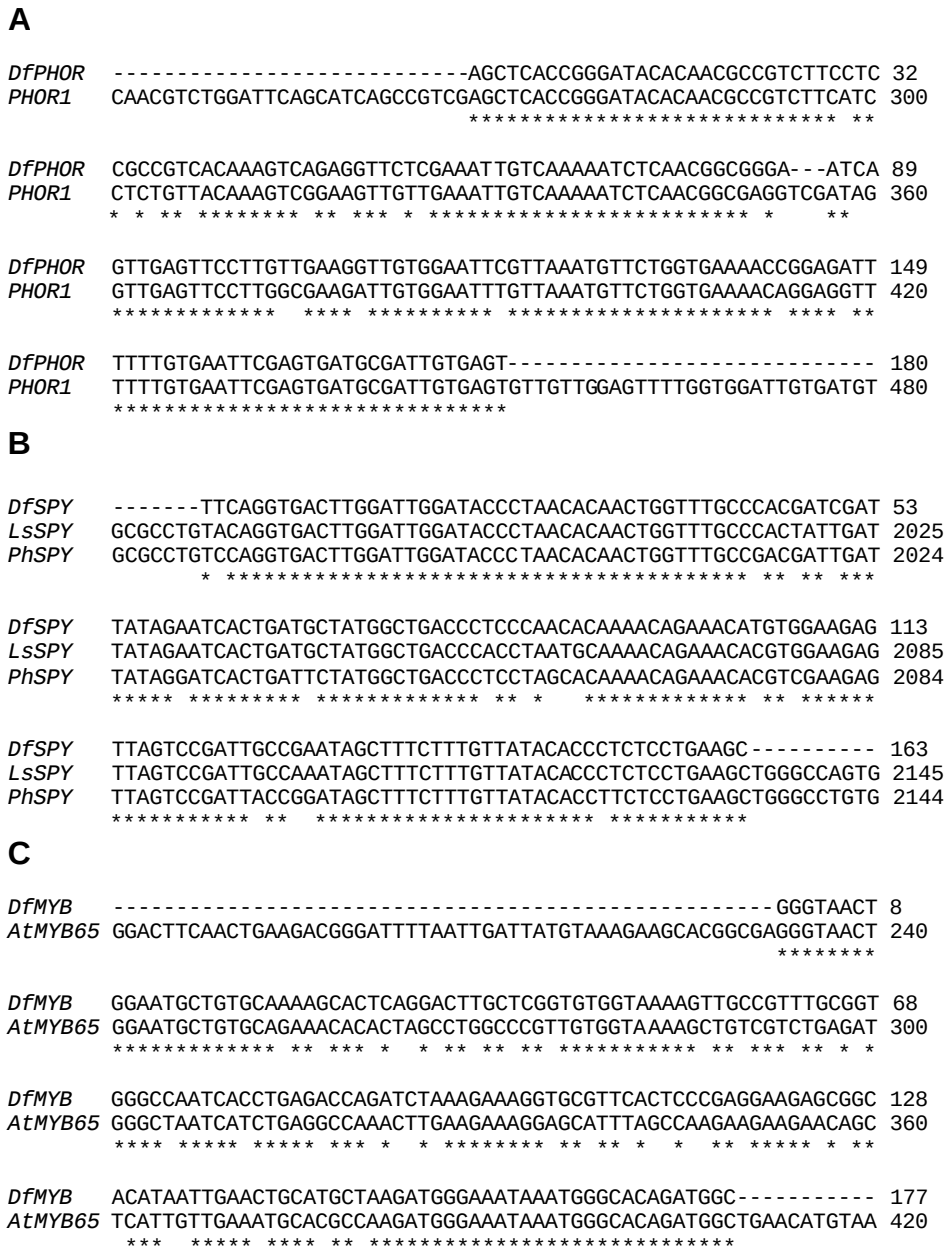


Fig. II 10. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *DfPHOR*, *DfSPY* y *DfMYB* de semillas de *D. ferox*, con genes ortólogos en otras especies. (A) *DfPHOR* fue alineada con *PHOR1* (*Solanum tuberosum*, N° de accesión en GenBank: AJ306423), **(B)** *DfSPY* fue alineada con *LsSPY* (gen *SPY* de *Lycopersicum esculentum*, N° accesión en GenBank: AJ312094) y *PhSPY* (gen *SPY* de *Petunia hybrida*, N° accesión en GenBank: Y17720), **(C)** *DfMYB* fue alineada con *AtMYB65* (gen *MYB65* de *Arabidopsis thaliana*, N° accesión en GenBank: AF048840). Los nucleótidos idénticos en cada posición se muestran debajo del alineamiento con un asterisco y el nucleótido mas cercano al poli A del mensajero se encuentra indicado en el extremo derecho de cada secuencia.

A

```
DfPHOR   -------------------------SSPGYTTPSSSAVTKSEVLEIVKNLNGG-NQLSSL 34
PHOR1    LPSTDFIPNLTLRRLINVWIQHQPSSSPGYTTPSSSSVTKSEVVEIVKNLNGEVDRLSSL 120
                                 ***********:******:********  ::****

DfPHOR   LKVVEFVKCSGENRRFFVNSSDAIVS--------------------------------- 60
PHOR1    AKIVEFVKCSGENRRFFVNSSDAIVSVVGVLVDCDVGEVCEAVVAVLDLVVSENGVKEQL 180
          *:***********************
```

B

```
DfSPY    --------------------------------------------------QVTWIGYP 8
LsSPY    MKKGGLWRDIYGIDEKKVSSMIREDKVDIMVELTGHTANNKLGTMACRPAPVQVTWIGYP 600
PhSPY    LKKGGVWRDIYGIDEKKVSSMIREDKVDIMIELTGHTANNKLGMMACRPAPVQVTWIGYP 600
                                                         ********

DfSPY    NTTGLPTIDYRITDAMADPPNTKQKHVEELVRLPNSFLCYTPSPE--------------- 53
LsSPY    NTTGLPTIDYRITDAMADPPNAKQKHVEELVRLPNSFLCYTPSPEAGPVCPAPALSNGFV 660
PhSPY    NTTGLPTIDYRITDSMADPPSTKQKHVEELVRLPDSFLCYTPSPEAGPVSPAPALTNGFV 660
         ***************:*****.:************:**********
```

C

```
DfMYB    ------GNWNAVQKHSGLARCGKSCRLRWANHLRPDLKKGAFTPEEERHIIELHAKMGNK 54
GAMYB65  VKKHGEGNWNAVQKHTSLARCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFSQEEEQLIVEMHAKMGNK 117
HvGAMYB  VKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTPEEERLIIQLHSKMGNK 118
LmGAMYB  VKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTPEEERLIIQLHSKMGNK 118
OsGAMYB  VKKHGEGNWNAVQKNTGLFRCGKSCRLRWANHLRPNLKKGAFTAEEERLIIQLHSKMGNK 116
               ********::.* ****************:******: ***: *:::*:*****
DfMYB    WAQM-------------------------------------------------------- 58
GAMYB65  WAQMAEHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRRQRAGLPLYPPEIYVDDLHWSEEYTKSNIIRVDR 177
HvGAMYB  WARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRAGLPIYP--ASVCNQSSNEDQQGSSDFNCGE 176
LmGAMYB  WARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRAGLPVYP--ASVINQSANEDQQGSSDFNCGE 176
OsGAMYB  WARMAAHLPGRTDNEIKNYWNTRIKRCQRAGLPIYP--TSVCNQSSNEDQQCSSDFDCGE 174
         **:*
```

Fig. II 11. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de *DfPHOR* (A), *DfSPY* (B) y *DfMYB* (C) de semillas de *D. ferox* con genes ortólogos en otras especies. Los nombres de las secuencias así como el número de accesión de estas en el GenBank están indicados en la Fig. II 10. *HvGAMYB, LmGAMYB, OsGAMYB* : genes *GAMYB* aislados a partir de *Hordeum vulgare*, *Lolimum temulentum* y *Oriza sativa*, respectivamente. Los números de accesiones en la base de datos GenBank para ellos son: AY008692, AF114162 y X98355, respectivamente. Los aminoácidos idénticos en cada posición se muestran debajo del alineamiento con un asterisco, mientras que las sustituciones conservativas y semiconservativas se indican con doble punto (:) y punto (.) respectivamente. El aminoáciodo más cercano al extremo carboxilo terminal se encuentra indicado en el extremo derecho de cada secuencia.

Regulación por fitocromos de la expresión de genes que participan en la vía de transducción de las giberelinas durante la inducción de la germinación en D. ferox

Con el propósito de estudiar las bases moleculares de la promoción de sensibilidad a las giberelinas mediada por luz, se procedió a analizar la acumulación de mensajeros de los genes *DfPHOR*, *DfSPY* y *DfMYB* en embrión y endosperma micropilar en la inducción de la germinación por los fitocromos. Para ello, se embebieron semillas sobre algodón saturado con agua destilada, en oscuridad, a temperaturas alternadas durante 40 h. Luego las semillas fueron peladas y tratadas con un pulso de luz R o R seguido por un pulso de RL y a continuación se incubaron en oscuridad, a temperaturas alternadas, hasta la extracción de muestras.

Como se muestra en la **Fig. II 12**, La formación de Pfr estimula la acumulación de transcriptos de *DfPHOR* y *DfMYB* en endosperma micropilar 6 h después del pulso de luz R. Este efecto es anterior a la promoción de la actividad endoß-mananasa y ß-manosidasa en endosperma micropilar. El efecto de la luz R sobre la acumulación de *DfPHOR* y *DfMYB* fue revertido cuando este tratamiento fue inmediatamente seguido de un pulso de RL, mostrando una típica respuesta LFR de los fitocromos. En el caso de *DfPHOR*, la diferencia en los niveles de transcriptos fue perceptible hasta las 44 h después de los tratamientos lumínicos. Por otro lado, si bien se observa un aumento de transcriptos de *DfMYB* 6 h luego del tratamiento de luz R, esta diferencia ya no es evidente 24 h después de los tratamientos lumínicos sugiriendo que los fitocromos inducen un aumento transitorio de la expresión de este gen en el endosperma micropilar **(Fig. II 12)**. El incremento de mensajeros de *DfMYB* y *DfPHOR* ocurre poco tiempo después del pulso de luz R, tratamiento que estimula la respuesta al GA en el endosperma micropilar y semilla entera, sugiriendo que *DfMYB* y *DfPHOR* están involucrados en el aumento de la respuesta al GA para la germinación. Por otro lado, el modo LFR de los fitocromos no regula la acumulación de transcriptos de *DfSPY* en endosperma micropilar **(Fig. II 12)**.

Los niveles de transcriptos de *DfPHOR* o *DfMYB* no cambiaron en embriones de semillas tratadas con R o RL **(Fig. II 13)**, sugiriendo que los factores que modulan la expresión de estos genes son distintos en el embrión a comparación del endosperma micropilar. En este caso, la luz tampoco tiene efecto en la acumulación de mensajeros de *DfSPY* **(Fig. II 13)**. Este último resultado es coincidente con lo observado en el endosperma micropilar, y sugiere que la expresión de *DfSPY* en semillas no se encuentra bajo control de la LFR de los fitocromos.

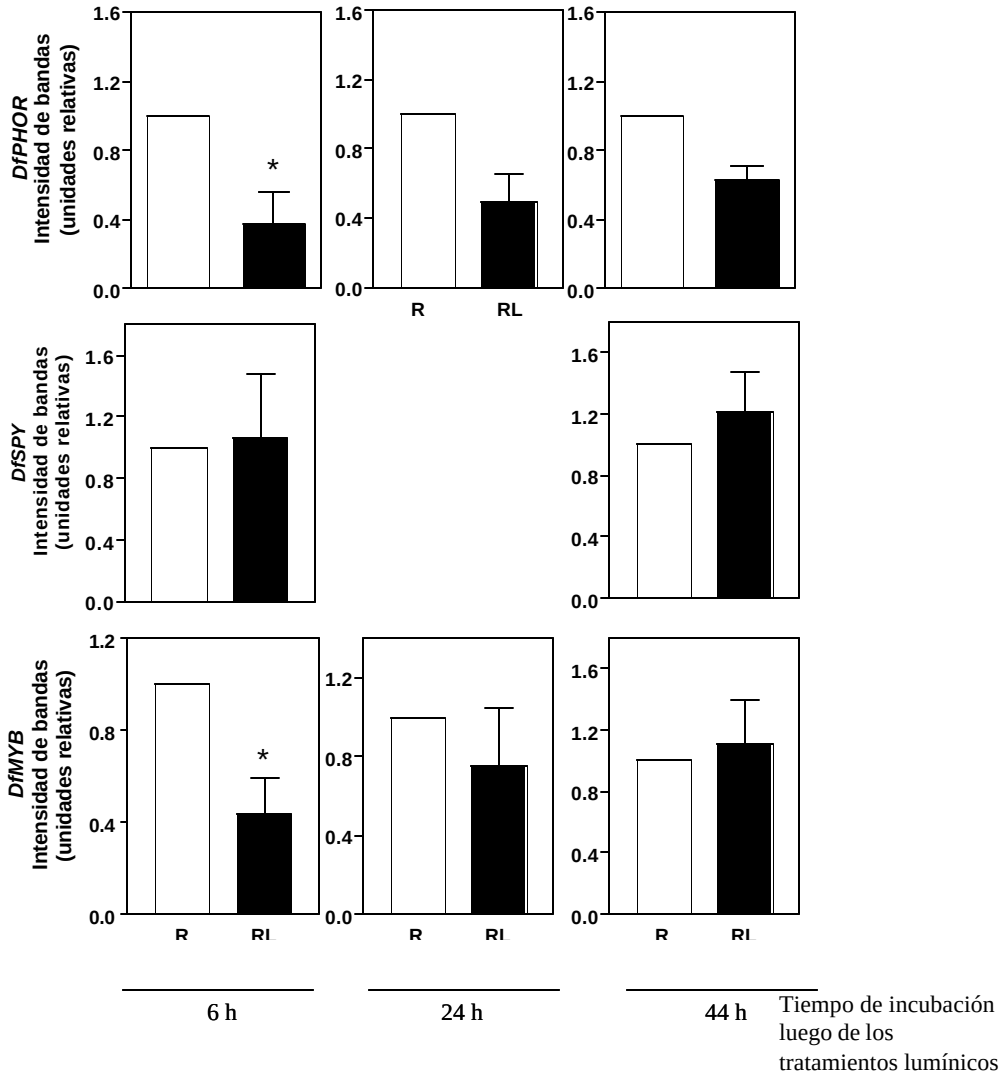


Fig. II 12. Los fitocromos, mediante una LFR, promueven la acumulación de mensajeros de *DfPHOR* y *DfMYB* en el endosperma micropilar.

Medias y D.E.M de las densitometría de bandas obtenidas a partir de al menos 4 experimentos independientes de RT-PCR. Las semillas fueron embebidas por 40 h en oscuridad (20/30 °C), peladas irradiadas con luz R o RL e incubadas en agua, en oscuridad hasta el momento de la extracción de muestras. La porción micropilar del endosperma de las semillas fue extraída 6, 24 y 44 h después de los tratamientos lumínicos. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento de luz R ($P < 0.1$)

Influencia del embrión sobre la acumulación de mensajeros de DfPHOR, DfMYB y DfSPY en endosperma micropilar

Teniendo en cuenta que la señal lumínica que aumenta la respuesta al GA en el endosperma micropilar es percibida por el embrión, se estudió la posibilidad que los niveles de transcriptos de *DfPHOR* y/o *DfMYB* estuvieran controlados por el factor embrionario que aumenta la respuesta al GA en el endosperma micropilar. Para ello, se midió el nivel de mensajeros de estos genes en endospermas provenientes de porciones de semillas con o sin embrión irradiadas con luz R, e incubadas en presencia de distintas soluciones hormonales. Los niveles de mensajeros se midieron 6 h después de la incubación de los endospermas en las distintas soluciones hormonales, teniendo en cuenta que el efecto de la luz sobre los niveles de transcriptos de *DfPHOR* y *DfMYB* en endosperma micropilar fue observado en ese lapso.

El contacto con el embrión no ejerce influencias sobre la acumulación de mensajeros de *DfPHOR* en endosperma micropilar; el nivel de mensajeros de este gen no fue significativamente distinto en los endospermas provenientes de porciones de semillas con embrión, a comparación de aquellos provenientes de porciones de semillas sin embrión **(Fig. II 14)**. Sin embargo, cuando la biosíntesis de giberelinas fue inhibida mediante la adición de paclobutrazol, los niveles de transcriptos de *DfPHOR* fueron significativamente menores en endospermas provenientes de porciones de semillas incubadas sin GA, a comparación de los de endospermas incubados en presencia de GA **(Fig. II 14)**. Estos resultados indican que el GA promueve la acumulación de transcriptos de *DfPHOR* en endosperma micropilar, sugiriendo que los fitocromos estimulan la acumulación de *DfPHOR* en este tejido **(Fig. II 12)** a través de cambios en los niveles de giberelinas en el endosperma micropilar.

Por otro lado, la acumulación de mensajeros de *DfMYB* fue mucho mayor en endospermas provenientes de porciones de semillas con embrión, a comparación de aquellos provenientes de porciones de semillas sin embrión **(Fig. II 14)**. El agregado de zeatina reemplazó el contacto con el embrión para el estímulo de la expresión de *DfMYB* en el endosperma micropilar, y tanto el efecto de la zeatina como del contacto con el embrión fue independiente de la presencia del GA en el medio de incubación **(Fig. II 14)**. Estos resultados demuestran que el contacto entre embrión y endosperma promueve la acumulación de mensajeros de *DfMYB* en el endosperma, y que la zeatina reemplaza el requerimiento del embrión para esta promoción. En las condiciones experimentales evaluadas, ni el embrión ni el agregado de GA o de zeatina al medio de incubación tuvieron un efecto significativo sobre los niveles de transcriptos de *DfSPY* en el endosperma

micropilar **(Fig. II 14)**. Estos resultados son consistentes con la hipótesis que la expresión de *DfSPY* en el endosperma micropilar es independiente de la acción de los fitocromos en las semillas.

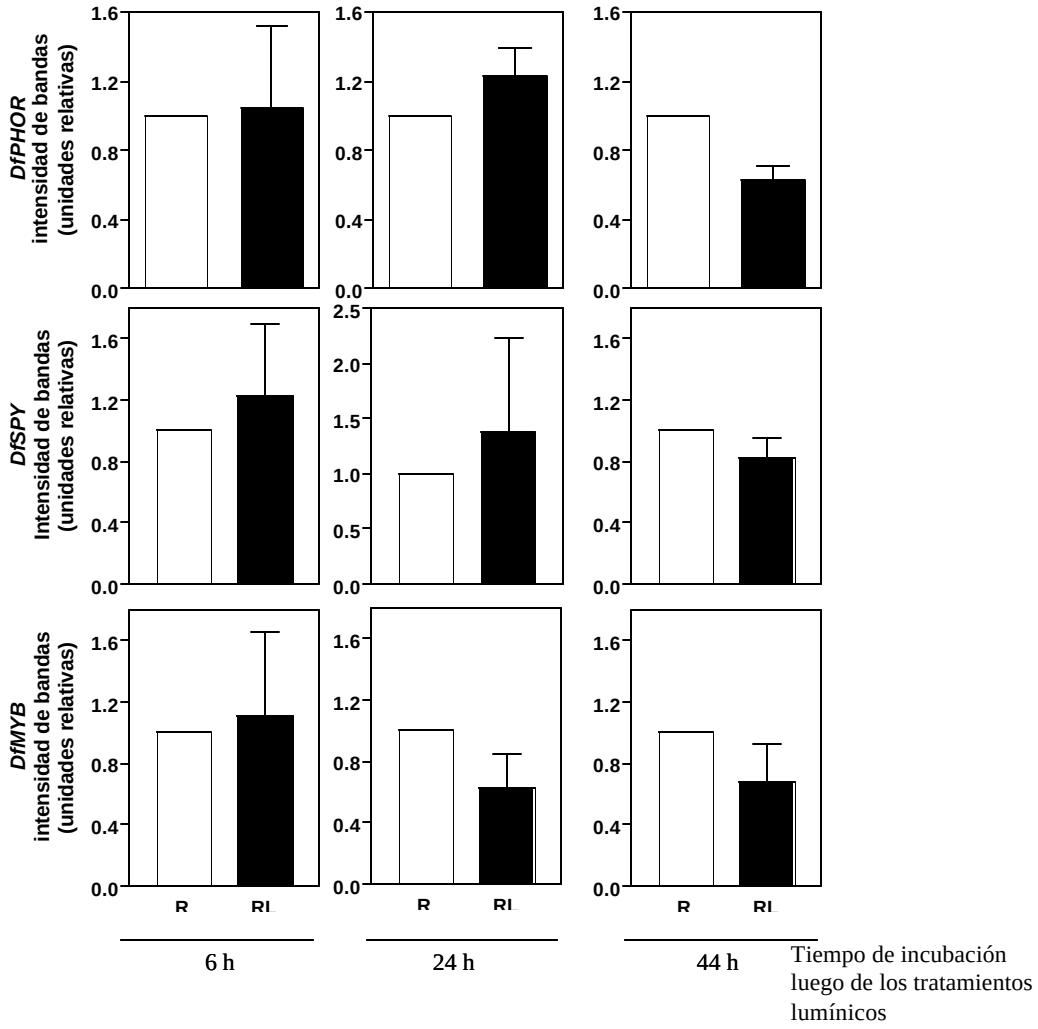


Fig. II 13. Estudio de la expresión de los genes *DfPHOR, DfSPY* y *DfMYB* en embrión, en semillas estimuladas a germinar por una LFR.

Los gráficos muestran las medias y D.E.M de las densitometría de bandas obtenidas a partir de al menos 4 experimentos independientes de RT-PCR. El protocolo experimental es similar al de la Fig. II 12. Los embriones fueron extraídos 6, 24 y 44 h después de los tratamientos lumínicos.

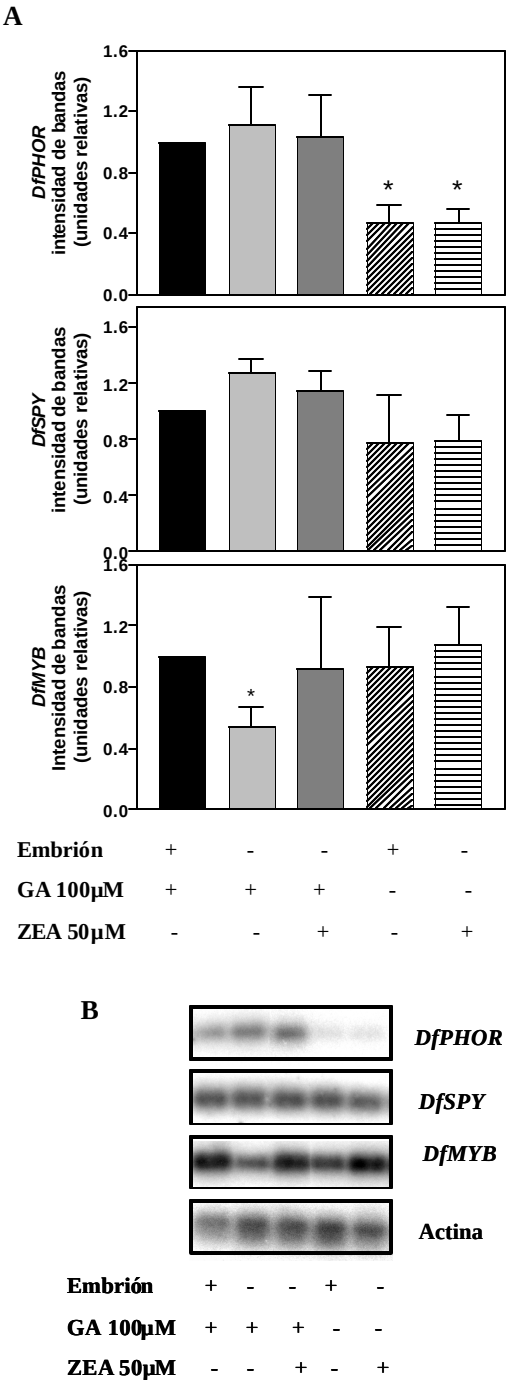


Fig. II 14. El nivel de mensajeros de *DfMYB* en el endosperma micropilar está controlado por señales provenientes del embrión, mientras que la acumulación de mensajeros de *DfPHOR* está promovida por el GA.

Medias y D.E.M de las densitometría de bandas obtenidas a partir de al menos 6 experimentos independientes de RT-PCR. Las porciones de semillas con o sin embrión fueron incubadas en Pc con o sin el agregado de GA o ZEA, como se indica en la figura. El protocolo experimental es similar al indicado en la Fig. II 8, a diferencia que la extracción de muestras se realizó 6 h después de la incubación de las porciones de semillas en las distintas soluciones hormonales. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el tratamiento con embrión + GA ($P < 0.1$).

El aumento de los niveles de citocininas endógenas, por medio de la sobreexpresión del gen isopentil-adenina trasferasa en Arabidopsis, aumenta la sensiblidad a las giberelinas de en semillas tratadas con un pulso de RL

Los resultados descriptos en secciones las anteriores utilizando semillas de *D. ferox* demuestran que la respuesta de la germinación al GA es promovida por una LFR, y está asociada a cambios en la sensibilidad a esta hormona tanto en el embrión como en el endosperma micropilar. Asimismo, estos datos sugieren fuertemente que las citocininas son componentes río debajo de la señal lumínica que estimula la sensibilidad al GA en semillas. Con el propósito de avanzar en el conocimiento sobre las posibles interacciones entre citocininas y giberelinas en la germinación, se estudió la promoción por los fitocromos de respuesta a las giberelinas (GA_{4+7}) en la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes del gen isopentil-adenina-transferasa (*IPT*). Esta línea fue construida por Van der Graaf en 1996, mediante la transformación de la accesión C24 de *Arabidopsis* con el plásmido PCYT::IPT, y fue llamada entonces *ipt161*. Las plantas transgénicas *ipt161* poseen un contenido 10 veces mayor de zeatina a comparación con correspondiente genotipo salvaje, poseen tallos pequeños y el crecimiento de raíces reducido (www.Arabidopsis.org).

Como se demuestra en la **Fig. II 15A**, los fitocromos, mediante una LFR, modulan la respuesta a las giberelinas en semillas de la accesión C24 de *Arabidopsis*; la germinación en respuesta a GA_{4+7} es mucho mayor en semillas tratadas con un pulso de luz R, a comparación de la de semillas tratadas con luz RL. De forma contraria, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos lumínicos para la sensibilidad a las giberelinas de las semillas *ipt161* ($P < 0.05$). Si bien estas semillas poseen una respuesta a las giberelinas similar al de su genotipo salvaje cuando son tratadas con R, la germinación en respuesta a esta hormona es notablemente mayor a comparación del genotipo C24 cuando las semillas son tratadas con luz RL. Estos resultados demuestran que el aumento de citocininas endógenas suprimen los requerimientos de Pfr para la promoción de la sensibilidad a las giberelinas en la germinación. De manera coherente, la incubación con bencilaminopurina, promueve la respuesta a las giberelinas de semillas salvajes irradiadas con luz RL **(Fig. II 15B)**.

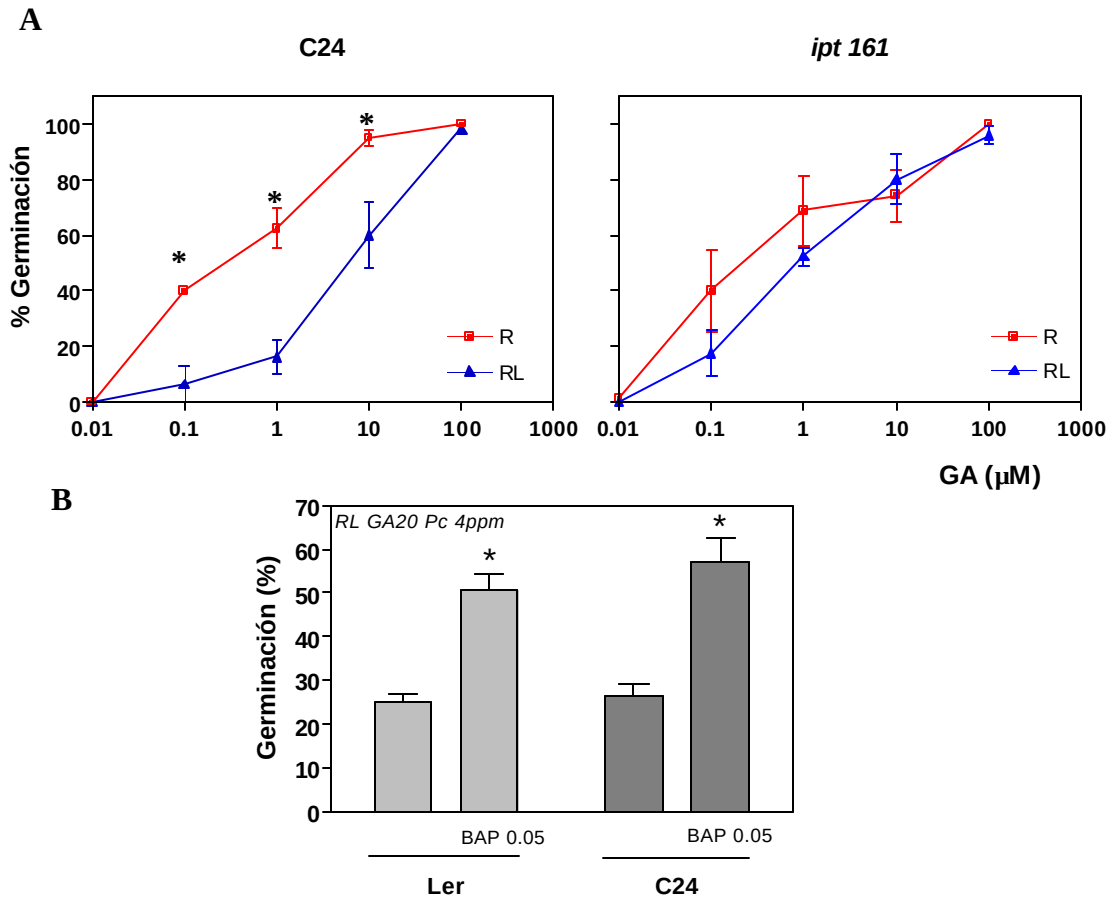


Fig. II 15. Un incremento en los niveles endógenos de citoquininas promueve la respuesta al GA_{4+7} para el estímulo de la germinación por RL de semillas de *Arabidopsis*.

(A) Respuesta a distintas concentraciones de GA_{4+7} de C24 y el sobreproductor de citoquininas *ipt 161* para la germinación inducida por luz R o RL. Las semillas fueron sembradas en medios conteniendo paclobutrazol 4ppm más distintas concentraciones de GA_{4+7}, como se indica en la figura. Una hora después de la siembra, las semillas fueron tratadas con un pulso de RL (Pfr/P = 3 %), e incubadas en oscuridad a 4 °C por 48 h. A continuación, distintos grupos de semillas fueron irradiadas con pulsos de luz que establecieron distintos porcentajes de fitocromo activo (Pfr), e incubadas en oscuridad a 25 °C por otras 48 h, momento en que se evaluó el porcentaje de germinación. **(B)** Respuesta al GA_{4+7} de semillas de *Arabidopsis* tratadas con luz RL. El protocolo experimental es similar al descrito en **(A)**, con la diferencia que las semillas se incubaron en paclobutrazol 4ppm y GA_{4+7} 20 µM con o sin el agregado de BAP 0.05 µM. El gráfico muestra la media y D.E.M obtenidos a partir de 3 experimentos independientes, cada uno conteniendo 3 réplicas por tratamiento. Germinación en R GA 20 µM, Pc 4ppm: *Ler*: 66 $\pm$ 4; *C24*: 85 $\pm$ 6. *GA20*: GA 20 µM, *Pc*: paclobutrazol 4ppm; *BAP 0.05*: bencilaminopurina 0,05 µM. Los asteriscos muestran diferencias signifcativas entre los tratamientos lumínicos (A) o GA20 Pc 4ppm y GA20 Pc 4ppm BAP 0.05 (B) para cada ecotipo ($P < 0.05$).

La respuesta a la luz de las semillas *ipt161* es significativamente mayor que la del genotipo salvaje para los tratamientos lumínicos que establecen porcentajes de Pfr/P entre 3 y 22 % **(Fig. II 16)**, indicando que un aumento en los contenidos de citocininas endógenas promueve la respuesta de la germinación a la luz. Estas diferencias no fueron observadas en porcentajes de Pfr cercanos a los niveles de saturación.

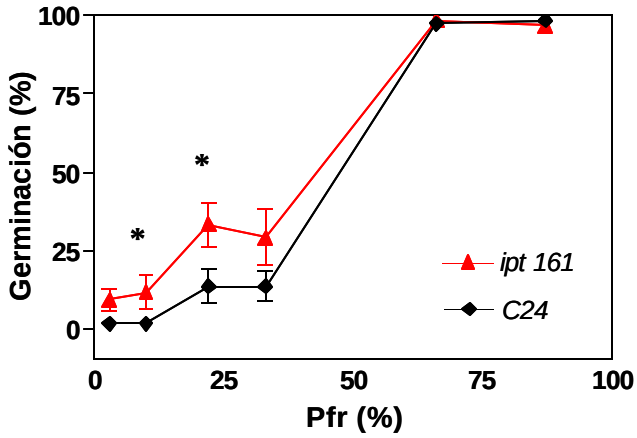


Fig. II 16. Un incremento en los niveles endógenos de citoquininas promueve la respuesta de la germinación a la luz en semillas de *Arabidopsis*.

Germinación en respuesta a distintos porcentajes de Pfr/P. Las semillas fueron sembradas en agar-agua, tratadas con un pulso de RL como se describió en la Fig. II 15 e incubadas a 4 °C por 48 h. Luego cada grupo de semillas recibió un pulso de luz que estableció, en cada caso, un 3, 10, 22, 33, 66 u 87 % de Pfr/P o se mantuvieron en oscuridad (control). Luego de esos tratamientos las semillas se incubaron a 25 °C en oscuridad completa por otras 48 h, momento en el cual se evaluó el porcentaje de germinación. Germinación en oscuridad completa: C24: 0%, *ipt161* 0%. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre la línea *ipt161* y el C24 ($P < 0.05$)

La pérdida de función de los alelos CKH1-1 y CKH2-1, los cuales regulan negativamente la acción de las citocininas en cultivos in vitro, promueve la respuesta de la germinación a las giberelinas

Los genotipos *ckh1-1* y *ckh2-1* fueron obtenidos por Kubo y Kakimoto (2000) a partir de mutagénesis química con etil-metano-sulfonato sobre la accesión Landsberg *erecta* (Ler). Los mutantes se aislaron por su mayor respuesta a las citocininas para la proliferación de callos y desarrollo de cloroplastos *in vitro*. Los loci *CKH1-1* y *CKH2-1* se localizan en los cromosomas 1 y 2, respectivamente, y se propone que sus productos regulan negativamente la señalización de citocininas. Si bien estas mutantes tienen una mayor respuesta a citocininas en cultivo *in vitro*, los niveles de esta hormona son similares al de su genotipo salvaje.

Una LFR promueve la respuesta a las giberelinas de la accesión Ler de *Arabidopsis* (**Fig. II 17** y Yang et al., 1995). Tanto en los tratamientos con R como con RL las semillas *ckh1-1* poseen una respuesta mayor que la de Ler al GA_{4+7}, y la misma no es modulada por los fitocromos por los mutantes**(Fig. II 17A; Tabla II 2)**. La elevada respuesta a las giberelinas en el tratamiento de RL no se debe a una VLFR, ya que esta es similar a la respuesta en oscuridad **(Fig. II 17B)**. Esta mayor respuesta al GA_{4+7} en *ckh1-1* estuvo asociada con una mayor sensibilidad a la luz en fotoequilibrios que establecen relaciones Pfr/P del 22 y 66 % **(Fig. II 17C)**. Esto sugiere que la mayor respuesta a las giberelinas en esta mutante tiene repercusión tanto en las respuestas VLFR como LFR de la germinación. Por otro lado, las semillas *ckh2-1* poseen una mayor respuesta al GA_{4+7} tanto para los tratamientos de luz R como de luz RL, en comparación con su control **(Fig. II 18A)**. Es interesante notar que en Ler, la regulación de la respuesta al GA_{4+7} por los fitocromos es clara para concentraciones que rondan los 10µM, mientras que en *ckh2-1*, la respuesta a 10 µM de GA_{4+7} se encuentra cercana a la saturación y no presenta diferencias entre los tratamientos de R y RL. Sin embargo, en *ckh2-1*, los fitocromos modulan la respuesta las giberelinas para la germinación a concentraciones de 1 y 0.1 µM. En este rango de concentraciones, la respuesta al GA_{4+7} de Ler es casi nula, y no presenta diferencias entre los tratamientos de luz y oscuridad **(Fig. II 18A)**. La germinación de *ckh2-1* fue mayor a la del control bajo fotoequilibrios que establecieron porcentajes de Pfr/P de 66 y 87, indicando el incremento en la respuesta a las giberelinas está asociada a una mayor respuesta a la luz en el rango de fotoequilibrios que inducen una LFR.

En conjunto, estos resultados demuestran que la pérdida de función de los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1*, la cual confiere una elevada respuesta a las citocininas en tejidos vegetales (Kubo y

Kakimoto, 2000), reducen los requerimientos de luz para la promoción la sensibilidad a las giberelinas en las semillas. La pérdida de función de estos alelos también está asociada a una mayor respuesta a la luz en la germinación.

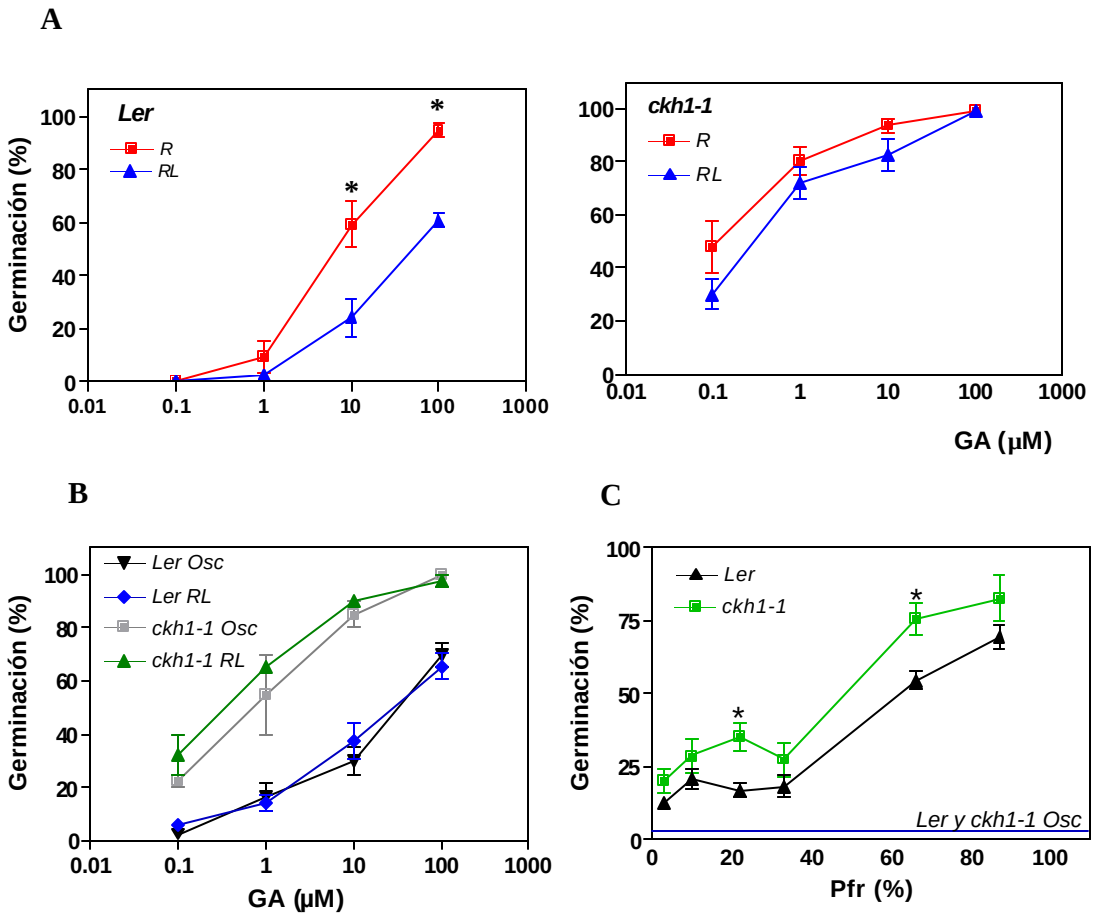
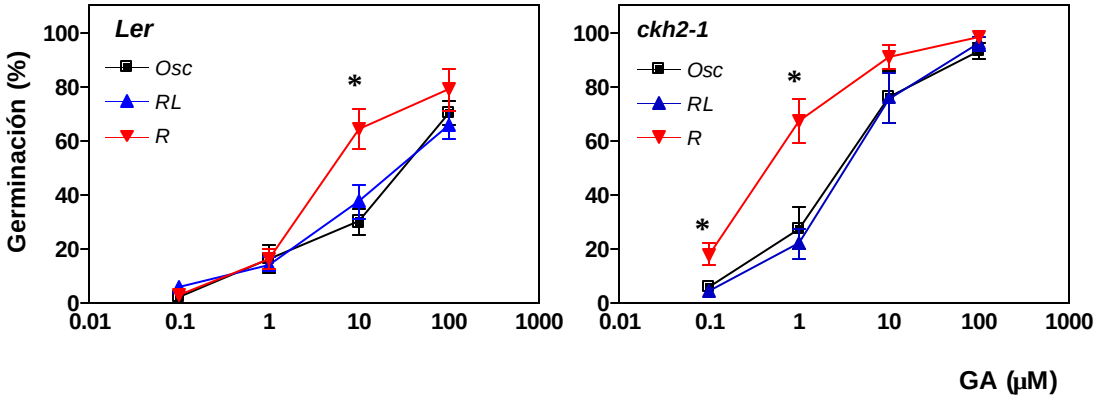


Fig. II 17. La pérdida de función del alelo *CKH1-1*, la cual está relacionada con una elevada sensibilidad a las citoquininas, promueve la respuesta a las giberelinas y a la luz para la germinación. (A) y **(B)** Respuesta distintas concentraciones de GA_{4+7} en Ler y el mutante *ckh1-1* para la germinación inducida por R, RL u oscuridad (Osc). El protocolo experimental es mismo que el descrito en II. 15 A. **(C)** Germinación de semillas Ler o *ckh1-1* en respuesta a la luz. El protocolo experimental es similar al descrito en II 16. Los asteriscos muestran diferencias significativas en los porcentajes de germinación entre los tratamientos lumínicos en cada ecotipo (A) o para la respuesta de la germinación a la luz entre Ler y *ckh1-1* (C) ($P < 0.05$).

Genotipo	***Tratamiento lumínico***	
	RL	**R**
Ler	0	0
ckh1-1	0	8,125 ± 4,323678

Tabla II 2. Germinación de semillas *ckh1-1* en presencia de paclobutrazol 4 ppm, sin el agregado de GA_{4+7} al medio

A



B

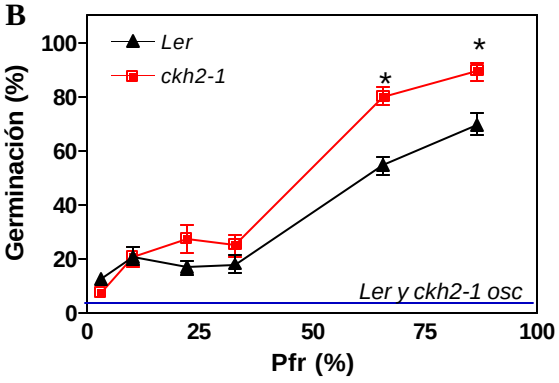


Fig. II 18. La pérdida de función del alelo *CKH2-1*, la cual está relacionada con una elevada sensibilidad a las citoquininas, promueve la respuesta a las giberelinas y a la luz para la germinación. (A) Respuesta a distintas concentraciones de GA_{4+7} en Ler y el mutante *ckh2-1* para la germinación inducida por R, RL u oscuridad. El protocolo experimental es mismo que el descrito en la Fig. II. 15 A. **(B)** Germinación de semillas Ler o *ckh2-1* en respuesta a la luz. El protocolo experimental es similar al descrito en la Fig. II 16.

DISCUSIÓN

Respuesta de las semillas de D. ferox a las giberelinas, y su relación con el estímulo lumínico de la germinación

En semillas que poseen dormición impuesta por las cubiertas, la inducción de la germinación a través de los fitocromos involucra cambios coordinados en el embrión y la región micropilar del endosperma, que permiten al embrión sobreponerse a las restricciones físicas para su crecimiento (Carpita *et al.*, 1979; Psaras *et al.*, 1981; Sánchez y de Miguel, 1985; de Miguel y Sánchez, 1992; Bewley y Black, 1994). Estos cambios son de vital relevancia para que ocurra germinación en *D. ferox*, ya que la misma depende del balance entre la capacidad expansiva del embrión y la resistencia mecánica que ejerce el tejido que lo rodea (endosperma micropilar).

En *Datura ferox* los fitocromos, mediante una LFR, regulan la expresión de genes que participan en la biosíntesis de giberelinas. Esta regulación ocurre en células del embrión, y sugiere fuertemente que el estímulo de la germinación mediado por la luz involucra un aumento en los niveles de giberelinas en semillas (Mella *et al.*, 2004).

En este capítulo de tesis se muestra que en semillas de *D. ferox* una LFR de los fitocromos modula la respuesta de la germinación a las giberelinas **(Fig. II 3)**, indicando que el Pfr no sólo promovería la biosíntesis de giberelinas, sino que también aumenta la respuesta de las semillas a esta hormona. Estos resultados concuerdan con estudios en *Arabidopsis*, donde la luz roja promueve la respuesta a las giberelinas en la germinación (Yang et al., 1995). En *D. ferox*, la incubación de semillas con citocininas reemplaza el requerimiento de luz en esta promoción **(Fig. II 3)**. Los resultados descriptos sugieren que las citocininas son parte de la señal lumínica que aumentan la respuesta a las giberelinas, y no participa de una vía diferente, ya que su adición al medio de incubación no ejerce un efecto significativo en la germinación en ausencia de GA exógeno, cuando la biosíntesis de giberelinas endógenas en las semillas es inhibida con paclobutrazol. Entonces, el aumento en la sensibilidad a las giberelinas a través de los fitocromos involucraría la liberación o cambios en la sensibilidad a las citocininas en la semilla. Sin embargo no puede descartase que el efecto de la alteración de los niveles o sensibilidad a las citocininas esté asociado a modificaciones en las semillas durante su desarrollo, lo que podría influenciar su respuesta posterior a las señales ambientales o endógenas.

Las observaciones descriptas en este capítulo sobre el rol de las citoquininas en la promoción de la germinación por luz están fuertemente apoyadas por los experimentos realizados con semillas de *Arabidopsis* con niveles o sensibilidad a citocininas alterados **(Fig. II 17-18)**, así como por estudios realizados en otras especies. Por ejemplo, en apio, la luz R promueve la germinación de semillas con un alto nivel de dormición, y los requerimientos de luz en estas semillas son reemplazados por la aplicación de giberelinas más citocininas en el medio de incubación (Thomas *et al.*, 1975). Por otro lado, en semillas de Pino silvestre, la luz R promueve la germinación, y este evento está asociado con un dramático y transitorio aumento en la concentración de citocininas en las semillas (Qamaruddin y Tillberg, 1989).

En *D. ferox* la modulación de la respuesta a las giberelinas para la germinación está asociada con cambios en la sensibilidad al GA en las células del embrión y endosperma micropilar. El GA estimula el potencial de crecimiento del embrión, y la acción de la luz R sobre el potencial de crecimiento requiere de la biosíntesis de giberelinas **(Fig. II 4)**. Esto sugiere que el estímulo de la capacidad expansiva del embrión mediado por los fitocromos puede involucrar un incremento en los contenidos de giberelinas en este órgano. Asimismo, los resultados descriptos demuestran por primera vez que los fitocromos, mediante una LFR promueven la respuesta al GA de las células del embrión **(Fig. II 5)**, y esto indica un doble control por parte del R sobre la expansión embrionaria. Por un lado, los fitocromos inducirían un aumento en la cantidad de giberelinas activas en este órgano, y por el otro, también promoverían la capacidad de percepción de giberelinas en las células del embrión.

Es interesante notar que si bien es reconocido el rol de las giberelinas en otros procesos fisiológicos relacionados con la germinación, como ser el ablandamiento del endosperma (Groot y Karssen, 1987; Bewley *et al.*, 1997; Chen y Bradfrod, 2000), todavía es discutida la acción de esta hormona sobre el potencial de crecimiento del embrión (Mo y Bewley, 2003). Los resultados descriptos en esta tesis sobre la acción de las giberelinas sobre el potencial de crecimiento del embrión están en acuerdo con estudios realizados en lechuga por Carpita et al. (1979b), los cuales indican una efecto positivo de esta hormona sobre la capacidad expansiva del embrión mediada por R. Por otro lado, estudios realizados en mutantes de tomate *gib-1* (Groot y Karssen, 1987) y *ga-1* de *Arabidopsis* (Debeaujon y Koornneef, 2000), en los cuales la biosíntesis de giberelinas está fuertemente afectada, demuestran que la falta de giberelinas no impide el crecimiento del embrión cuando este es liberado de la resistencia mecánica que le ofrecen las cubiertas. Sin embargo, los embriones *gib-1* poseen una tasa de crecimiento menor que su genotipo salvaje

(Groot y Karssen, 1987), indicando que las giberelinas estimulan el crecimiento del embrión. Es probable que las giberelinas entonces contribuyan al potencial de crecimiento del embrión de manera que le permitan a este sobreponerse a las resistencias internas para su crecimiento, por ejemplo, mediante el aumento de la extensibilidad de sus paredes celulares (Chen *et al.*, 2001; Mella *et al.*, 2004), facilitando así su emergencia a través de los tejidos que lo rodean.

Los resultados aquí expuestos sugieren fuertemente que las citocininas son componentes río debajo de la señal lumínica que promueve la sensibilidad a las giberelinas en las células del embrión. Sobre este tema no hay antecedentes bibliográficos en otras especies. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en la respuesta a las giberelinas en semillas enteras, evidenciando un importante papel de las citocininas en la germinación mediada por luz.

Los fitocromos además estimulan la respuesta a las giberelinas de las células del endosperma micropilar **(Fig. II 6-7)**. En este caso, los resultados nuevamente apuntan a las citocininas como componentes río debajo de la señal lumínica que estimula la respuesta a las giberelinas en este tejido. En combinación con las observaciones sobre los cambios en la sensibilidad al GA en el embrión **(Fig. II 5)**, estos resultados constituyen la primera evidencia de un control, mediado por luz, sobre la respuesta a las giberelinas en dos procesos indispensables en la promoción de la germinación de semillas con dormición impuesta por las cubiertas; el ablandamiento del endosperma y el incremento de la capacidad expansiva del embrión. La señal que promueve la sensibilidad a las giberelinas en embriones y endosperma micropilar es originada en el embrión **(Fig. II 8-9)**, el sitio donde se percibe el estímulo lumínico. Esta señal entonces tiene un efecto local; sobre las mismas células del embrión **(Fig. II 5)** y también difunde al endosperma, promoviendo la respuesta las giberelinas **(Fig. II 8-9)**. Este factor embrionario promueve fuertemente el estímulo por el GA de la actividad degradadora de mananos y la acumulación de transcriptos de *DfMan* y *DfExpa1*. En cebada, las células de la aleurona proximales al embrión poseen una respuesta mayor a las giberelinas para la vacuolización, inducción de actividad a-amilasa y secreción de ß-glucanasas, a comparación de las distales (Ritchie *et al.*, 1999). Esta respuesta diferencial sugiere la producción, por parte del embrión, de un factor que difundiría a través de la aleurona estableciendo un gradiente a través de la misma, más concentrado en la zona proximal. Asimismo, en tomate, el contacto del endosperma con el embrión aumenta la respuesta a las giberelinas para el estímulo de la actividad endoß-mananasa (Mo y Bewley, 2003). Esto sugiere que la influencia del contacto con el embrión sobre la

respuesta del endosperma a las giberelinas es un efecto conservado entre especies. Sin embargo, en tomate se desconoce si la luz ejerce algún rol en esta regulación.

Los datos aquí presentados sugieren además que el factor difusible que media la comunicación entre el embrión y el endosperma micropilar es una citocinina. Esto se evidencia en el hecho que la adición de zeatina al medio de incubación mimetiza el contacto con el embrión para la promoción de las respuestas del endosperma micropilar a las giberelinas **(Fig. II 8-9)**.

Bases moleculares de la modulación por fitocromos de la respuesta a las giberelinas en semillas

El estímulo de la germinación por los fitocromos está asociado con un incremento de los niveles de transcriptos de *DfMYB* y *DfPHOR* en endosperma micropilar **(Fig. II 12)**. Estos transcriptos presentan una alta similitud de secuencia con los genes *AtMYB65* y *PHOR1*, los cuales son reguladores positivos de la señalización de las giberelinas (Amador *et al.*, 2001; Gocal *et al.*, 2001). Seis horas después del tratamiento con luz R, es posible observar un incremento en la acumulación de mensajeros de *DfMYB* y *DfPHOR* en endosperma micropilar, en comparación con los controles tratados con luz RL. En ese entonces, aun no se observan cambios estructurales en las células del endosperma micropilar (Mella *et al.*, 1994), y el efecto de la luz R sobre la actividad degradadora de mananos en este tejido aún no es detectable (Sánchez y de Miguel, 1997). Estos resultados constituyen la primera evidencia sobre una asociación entre la alteración en la expresión de componentes de la señalización de giberelinas y la acción de los fitocromos en semillas, y sugieren que genes relacionados a *GAMYB* y *PHOR1* están involucrados en la acción de las giberelinas sobre el ablandamiento del endosperma micropilar. En este sentido, aunque la luz R estimula la acumulación de transcriptos de *DfPHOR* y *DfMYB*, el efecto es mediado por distintas vías de regulación para cada gen. La acumulación de transcriptos de *DfPHOR* es dependiente de las giberelinas **(Fig. II 14)**, sugiriendo que la expresión de *DfPHOR* en endosperma micropilar es estimulada por los fitocromos a través del incremento de giberelinas activas en este tejido. Esta sugerencia está apoyada por el hecho que los niveles de transcriptos de *DfPHOR* en el endosperma micropilar son altos siempre que el GA está presente en el medio, independientemente del contacto endosperma-embrión o del agregado de zeatina. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados en papa, donde las giberelinas promueven un aumento en los niveles de trascriptos de *PHOR1* en raíces (Amador *et al.*, 2001). Por otra parte, la expresión de *DfMYB* podría ser

estimulada por la liberación de citocininas de parte del embrión en respuesta al pulso de R, teniendo en cuenta que el contacto con el embrión o la incubación con zeatina de las porciones de semillas sin embrión promueven un aumento en los niveles de mensajeros de *DfMYB* en el endosperma micropilar **(Fig. II 14)**. Estos resultados sugieren que, si bien *DfPHOR* podría estar participando en la señalización de las giberelinas, su expresión estaría relacionada a la acción de las giberelinas en el endosperma micropilar. Por otro lado, los cambios en la expresión de *DfMYB* depende de una señal del embrión con características similares a la que regula la respuesta al GA, y por lo tanto la modulación de la sensibilidad al GA por la luz involucraría cambios en la expresión de *DfMYB*.

Por otra parte, no se observó ningún efecto de la luz, del contacto con el embrión o del agregado de zeatina al medio sobre la acumulación de transcriptos de *DfSPY* **(Fig. II 12 y 14)**. Estos resultados son coherentes con observaciones en *Arabidopsis*, donde no se detectó una interacción entre las citocininas y la expresión de *SPY* en la germinación (Greenboim-Wainberg *et al.*, 2005).

Los fitocromos también modulan la respuesta al GA en las células del embrión **(Fig. II 5)**. Sin embargo, este efecto no está relacionado con cambios en los niveles de transcriptos de *DfPHOR*, *DfSPY* o *DfMYB* **(Fig. II 13)**. No se observan diferencias en la acumulación de transcriptos de estos genes 6 h después del pulso de R, momento en el cual las diferencias en los niveles de mensajeros de *DfPHOR* y *DfMYB* son evidentes en el endosperma micropilar. Tampoco se observan cambios en los niveles de transcriptos en embriones 24 y 44 h después de los tratamientos lumínicos **(Fig. II 13)**. Si bien no deben descartarse posibles cambios postransduccionales, es probable que en el embrión la regulación de la respuesta a las giberelinas esté mediada por genes diferentes a *DfPHOR*, *DfMYB* y *DfSPY*. La **Fig. II 19** muestra un modelo para la percepción de las giberelinas en *D. ferox* en la promoción de la germinación por luz.

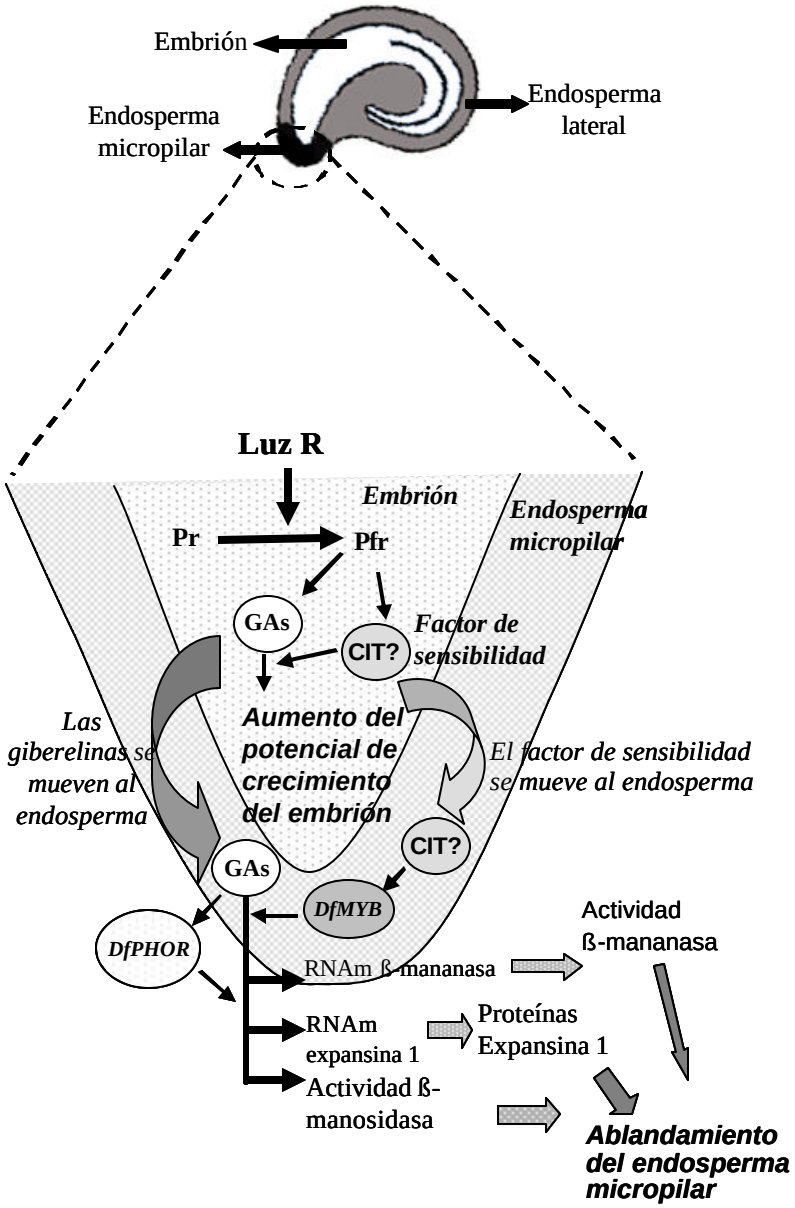


Fig. II 19. Modelo propuesto para los cambios en la respuesta a las giberelinas en semillas de *D. ferox*.

Las flechas indican efectos promotores. *GAs*: giberelinas. *CIT*: citoquininas.

Relación entre giberelinas y citocininas en la promoción de la germinación por los fitocromos en semillas de Arabidopsis

La germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* es estimulada tanto por una LFR (Shinomura *et al.*, 1994; Botto *et al.*, 1995) como por una VLFR (Botto *et al.*, 1996) de los fitocromos. Estas semillas poseen dormición impuesta por las cubiertas, y se ha demostrado que en este caso la testa ofrece una considerable resistencia mecánica para el crecimiento del embrión (Debeaujon y Koornneef, 2000). Como se mencionó anteriormente, una LFR de los fitocromos promueven la respuesta a las giberelinas de estas semillas (Yang *et al.*, 1995), y se sabe que las características de la testa y los niveles de ácido abscísico en embriones determinan los requerimientos de giberelinas para la germinación (Debeaujon y Koornneef, 2000). La secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis* así como su gran disponibilidad de genotipos mutantes, proveen la posibilidad de explorar en profundidad las bases genéticas de los procesos fisiológicos en plantas. Es por ello que, mediante experimentos realizados con genotipos de *Arabidopsis* que exhiben alteraciones en los niveles o respuestas a las citocininas, se estudió con mayor profundidad las bases genéticas que median las interacciones entre citocininas y giberelinas en el estímulo de la germinación mediado por luz.

Un aumento en los niveles endógenos de zeatina, mediante la sobreexpresión del gen isopentil-adenina transferasa, estimula la respuesta a las giberelinas de semillas tratadas con luz RL **(Fig. II 15A)**. Es interesante notar que, cuando la germinación es inducida por un pulso saturante de luz R, la respuesta a las giberelinas en *ipt161* es similar a la de su control. Este resultado es coherente con la propuesta que las citocininas son componentes río debajo de la señal lumínica que promueve la sensibilidad a las giberelinas. En ese modelo, la luz R promovería un incremento de citocininas activas en las semillas salvajes, y la respuesta a las giberelinas aumenta a niveles comparables a la de *ipt161*, el cual posee la vía de síntesis de citocininas constitutivamente activa. El hecho que no se observen diferencias significativas en la respuesta a las giberelinas de semillas *ipt 161* irradiadas con luz RL a comparación de semillas C24 irradiadas con R avala esta propuesta. Asimismo, al igual que en *D. ferox* **(Fig. II 3)**, en *Arabidopsis* la adición de citocininas al medio de incubación promueve la respuesta a las giberelinas en semillas tratadas con luz RL **(Fig. II 15 B)**.

Por otro lado, la respuesta a la luz de las semillas *ipt161* es mayor que su control. Esta diferencia es observada en fotoequilibrios que establecen porcentajes de Pfr entre 10 y 22 **(Fig. II 16)**. Es probable que en estas condiciones, el contenido de giberelinas y citocininas en semillas

control sean menores a los establecidos luego de un pulso saturante de luz R. Los contenidos de giberelinas en *ipt161* serían similares a los del control, pero el nivel de citocininas en estas semillas es mayor, debido a la sobreexpresión del gen *IPT*. Esto promovería en mayor grado la respuesta a las giberelinas en *ipt161* en porcentajes intermedios de Pfr, y en consecuencia, un mayor porcentaje de germinación que el control. Esta propuesta es coherente con el hecho que en el rango de Pfr/P entre 66 y 87 %, los cuales establecerían cantidades mayores de giberelinas y citocininas en C24, y de giberelinas en *ipt161*, ambos genotipos germinan en un 100% **(Fig. II 16)**.

Un trabajo publicado recientemente muestra que dobles o triples mutantes de pérdida de función de alelos *AHK2*, *AHK3* y *CRE1/AHK4* de *Arabidopsis*, los cuales codifican para histidina-kinasas que participan en la percepción de citocininas, está asociada con un menor requerimiento de luz para la germinación, a comparación con el control (Reifler *et al.*, 2006). Esto indicaría que la percepción de citocininas inhibe la germinación, y es opuesto a los resultados de este capítulo de tesis así como a observaciones de numerosos autores (Miller, 1956; Khan, 1971; Thomas *et al.*, 1975; Qamaruddin y Tillberg, 1989). Los niveles de citocininas están fuertemente incrementados en estos mutantes y, a diferencia con lo observado por Werner *et al.*, (2003), donde la reducción de los contenidos de citocininas está asociada con la detención del crecimiento del meristema apical de las plántulas, los mutantes dobles y triples poseen un meristema aún funcional. Reifel y colaboradores proponen entonces que la percepción de citocininas no ocurriría exclusivamente a través de *AHK2*, *AHK3* y *CRE1/AHK4* y que otras vías, aún desconocidas, deben estar participando en el proceso. En este sentido, es probable que otros receptores participen en la percepción de citocininas en la germinación, y que el incremento en los niveles de citocininas de los mutantes, promuevan la germinación por esas vías alternativas.

El papel de las citocininas como promotoras de la germinación es fuertemente avalado por el hallazgo que, la pérdida de función de los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1*, la cual está relacionada con una hipersensibilidad a las citocininas en cultivos *in vitro*, promueven la respuesta a las giberelinas en las semillas en luz R y RL, a comparación con su control **(Fig. II 17-18)**. Este resultado aporta la primera evidencia que los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1* participan en la modulación de la sensibilidad a las giberelinas en la germinación.

La mayor respuesta a las giberelinas en los mutantes *ckh1-1* y *ckh2-1* está asociada con el incremento de la sensibilidad a la luz de las semillas **(Fig. II 17 y 18)**. Entonces, los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1* modulan la sensibilidad a la luz para la germinación y este efecto estaría mediado, al menos en parte, a través de la regulación de la repuesta a las giberelinas de las semillas.

Cao *et al.*, (2005) demostró que *RGL2* es el principal represor de la germinación en *Arabidopsis*, y su acción es estimulada por otras proteínas *DELLA* como ser *GAI, RGA* y *RGL1*. De forma contraria con lo observado para el mutante *rgl2 ga1-3*, los cuales poseen la pérdida de función de *RGL2* y no son capaces de sintetizar giberelinas, la germinación de las cuádruple mutante *rgl2 rga gai ga1-3* es independiente de la luz. En base a estos resultados, los autores sugieren que la luz podría ejercer un control independiente al de los contenidos de las giberelinas sobre la desestabilización de los alelos *RGA* y *GAI*. Por lo tanto, estos genes también serían puntos de convergencia entre la señal lumínica y la vía de acción de las giberelinas en la germinación.

En base a todo lo aquí discutido, es interesante preguntar; ¿qué relación existe entre los genes *MYB, PHOR, CKH1-1 y CKH2-1* y de la familia *DELLA* en el control de la respuesta a las giberelinas por los fitocromos? ¿Serán las citocininas componentes de la señal lumínica que media la inactivación de *RGA* y *GAI* en la semilla? Los fitocromos, además de inducir el aumento en los contenidos de citocininas aquí propuesto, ¿estarán también mediando cambios en la respuesta a las citocininas de semillas? Si esos cambios ocurren, ¿estará el alelo *CKH1-1* involucrado en ellos? ¿Qué componentes de la señalización de las giberelinas tendrán un efecto importante la respuesta a esta en embriones? En la **Fig. II 20** se muestra un modelo general explicando posibles relaciones entre componentes de la señalización de giberelinas y citocininas en la germinación regulada por luz. La contestación de estas preguntas brindará importantes avances en el estudio de la transición de la dormición a la germinación mediada por factores ambientales, así como en el estudio de las redes bioquímicas y moleculares que subyacen a las diversas respuestas de los organismos al medio donde habitan.

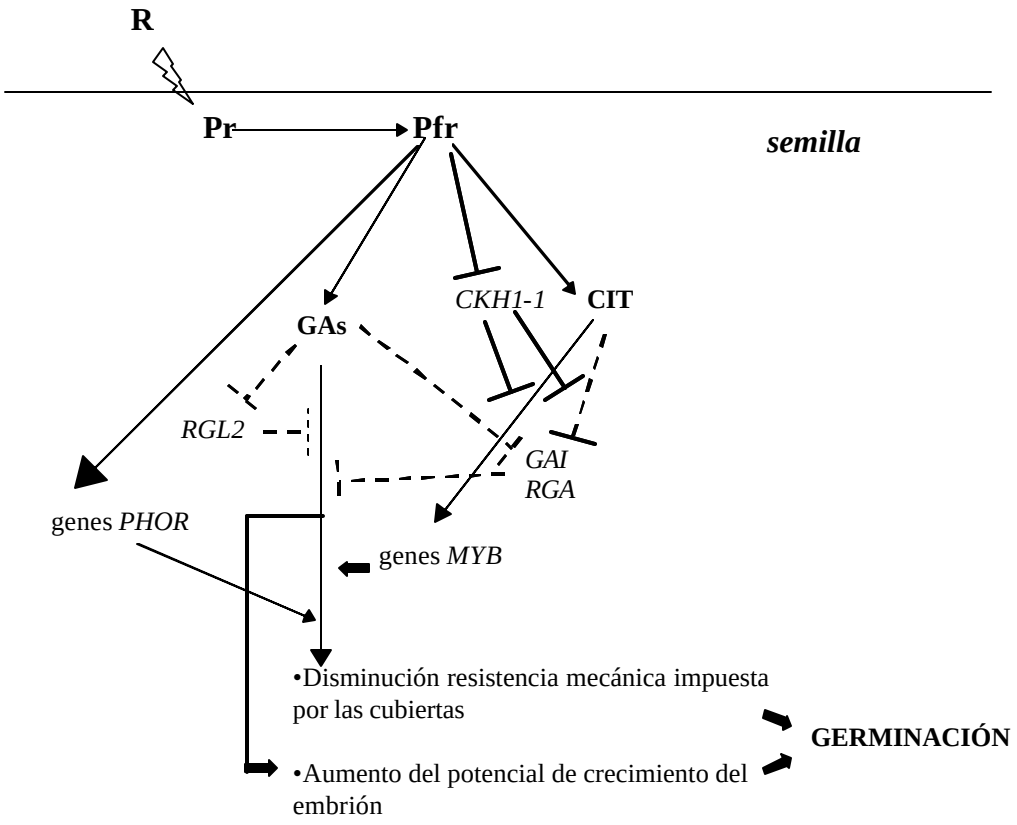


Fig. II 20. Modelo integral propuesto para los cambios en la respuesta a las giberelinas en la germinación estimulada por luz. Las flechas indican efectos promotores. Las barras perpendiculares indican efectos inhibitorios. Mientras que las líneas llenas indican propuestas en base a estudios de esta tesis, los componentes relacionados con líneas de punto fueron agregados a partir de búsquedas bibliográficas sobre datos obtenidos por otros laboratorios. GAs: giberelinas, CIT: citocininas

CONCLUSIONES

En las semillas cuyo embrión está completamente rodeado por el endosperma como en el caso de las solanaceas, las compuestas y otras familias, la germinación depende de procesos que cambian el balance entre la resistencia mecánica del endosperma y la capacidad de expansión del embrión, favoreciendo el crecimiento del eje embrionario a través del endosperma. La promoción de la germinación por la luz incluye el estimulo del potencial de crecimiento del embrión y el ablandamiento de la región micropilar del endosperma. Esos cambios coordinados en el embrión y

el endosperma dependen de procesos iniciados en el embrión, que es donde se percibe la señal lumínica. Se sabía que en ambos procesos las giberelinas juegan un papel importante en este efecto de la luz. Cuando se activan los fitocromos aumenta el contenido de giberelinas activas, en buena medida mediante el estímulo la trascripción de genes que codifican para 3- ß-hidroxilasas (enzimas clave en la regulación de la biosíntesis de giberelinas activas). Tanto el incremento en el potencial de crecimiento del embrión como el ablandamiento del endosperma dependen de esa síntesis de giberelinas. El gen de 3-ß-hidroxilasa se expresa solamente en el embrión por lo que la fuente de giberelinas para ambos tejidos es la misma: el embrión, lo que implica que las giberelinas, además de estimular la expansión del embrión, se mueven del embrión al endosperma y allí promueven la expresión de genes vinculados con el ablandamiento del endosperma. Los resultados descriptos en este capítulo demuestran por primera vez que: (a) en el embrión se produce, además de la síntesis de giberelinas, una señal dependiente del fitocromo que aumenta la sensibilidad a las giberelinas en el embrión y en el endosperma micropilar (b) una citocinina puede reemplazar a esa señal dependiente del fitocromo con lo que se abre la posibilidad de que las citocininas formen parte de la señal embrionaria y (c) el fitocromo regula la expresión en el endosperma micropilar de *DfPHOR* y *DfMYB*, genes con alta similitud a componentes que intervienen en la señalización de las giberelinas en otros órganos. (d) mientras la expresión de *DfPHOR* aparentemente está regulada de forma indirecta por los fitocromos por medio de un incremento en los contenidos de giberelinas en semillas, la expresión de *DfMYB* está regulado por un factor embrionario, que posee varias características en común con el que regula la sensibilidad a las giberelinas en embrión y endosperma micropilar. Esta regulación permite proponer la vinculación de *DfMYB* con la modulación de la sensibilidad de las semillas a las giberelinas. La participación de estos dos genes en el control de la germinación había sido, hasta ahora, ignorada. (e) Tanto un aumento de los niveles de citocininas endógenas como de la sensibilidad a estas en semillas, promueve la respuesta a las giberelinas para la germinación. Los alelos *CKH1-1* y *CKH2-1* están involucrados en la percepción del estímulo de la respuesta a las giberelinas así como en la modulación de la respuesta a la luz en la germinación. El papel de estos genes en la inducción de la germinación por luz había sido hasta el momento ignorado.

CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LOS FITOCROMOS INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS GIBERELINAS EN LA GERMINACIÓN

INTRODUCCIÓN

La aparición de distintos genes de la familia de los fitocromos y su divergencia a lo largo de la evolución de las plantas terrestres ha originado un sistema de percepción y discriminación de señales lumínicas en un rango extraordinariamente amplio de intensidades y duración. Las numerosas señales provenientes del ambiente pueden activar a más de un fitocromo en un momento determinado, y un determinado proceso fisiológico puede estar controlado por más de un fitocromo. Por ejemplo, los mutantes de *Arabidopsis* deficientes en PHYA poseen un fenotipo prácticamente indistinguible del tipo salvaje en luz blanca (Whitelam *et al.*, 1993). Esos fenotipos demuestran que múltiples fitocromos regulan la morfología de la planta madura en parte en forma redundante. Sin embargo, se ha demostrado que existe una jerarquía entre los fitocromos en la modulación de los distintos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas. En ella, el PHYB ejerce roles en todos los estadios del ciclo de vida del vegetal, mientras que el PHYA, PHYD y PHYE ejercen sus funciones más evidentes en estadios selectos del desarrollo (Smith, 2000). A su vez, los fotorreceptores no actúan de forma independiente entre sí sino que son parte de una red compleja de interacciones que involucra la acción de otros miembros de su familia, así como de la familia de los criptocromos (Neff *et al.*, 2000). Por ejemplo, varios trabajos demuestran una acción sinérgica del PHYA con el PHYB en plántulas (Casal, 1995; Henning *et al.*, 1999; Neff *et al.*, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que el PHYB es necesario para la función de PHYC en la des-etiolación (Monte *et al.*, 2003). Por otro lado, se han reportado interacciones inhibitorias entre fotorreceptores, por ejemplo, la sobreexpresión de PHYB disminuye la inhibición del alargamiento del hipocotilo en luz RL por el PHYA (Wagner *et al.*, 1996).

En semillas de *Arabidopsis*, se ha determinado que el PHYA es el fotorreceptor que estimula la germinación en respuesta a RL (Botto *et al.*, 1996; Shinomura *et al.*, 1996) mientras que el principal fitocromo que media el estímulo de la germinación por una LFR es el PHYB (Botto *et al.*, 1995). Más tarde se demostró que aparte de PHYA y PHYB otros fotorreceptores de la familia de los fitocromos son capaces de modular la respuesta a la luz en la germinación. Por ejemplo, se ha observado que la luz R estimula la germinación de los dobles mutantes *phyA phyB*, y que este efecto es cancelado cuando el pulso de luz R es seguido por un pulso de luz RL,

indicando que otros fotorreceptores, distintos al PHYB participan en el estímulo por una LFR de la germinación (Poppe y Shäfer, 1997).

En los últimos años se ha demostrado que tanto PHYD como PHYE modulan la germinación de *Arabidopsis.* Por ejemplo, se ha demostrado que le PHYE media la LFR cuando las semillas son expuestas por períodos prolongados a la luz R (Henning *et al.*, 2002) y su acción es requerida para el estímulo de la germinación bajo luz RL continua, a través de PHYA. Esta interacción entre PHYA y PHYE parece no ser común en todos los estadios de desarrollo, ya que la mutación *phyE* no afecta la inhibición del alargamiento del hipocotilo y la inducción de la apertura de cotiledones de las plántulas bajo luz RL (Henning *et al.*, 2002). La pérdida de función de PHYD o de PHYB estimula la germinación en luz RL, indicando que estos fitocromos interfieren con la inducción de la germinación por PHYA. Este efecto también es observado en los dobles mutantes *phyB phyD* e indica que tanto el PHYB como el PHYD interfieren con la inducción de la germinación por una VLFR (Henning *et al.*, 2001). En conjunto, estos resultados demuestran que la regulación de la germinación por luz comprende la acción de numerosos miembros de la familia de los fitocromos, los cuales interaccionan entre sí en forma compleja, estableciendo relaciones sinérgicas o antagónicas de acuerdo a las características del estado fisiológico de la semilla y del ambiente lumínico al que estas se exponen.

Como se describió en el capítulo anterior, la inducción de la germinación por los fitocromos involucra la modulación de la respuesta a las giberelinas en el embrión y endosperma micropilar de *D. ferox*. Tanto en *D. ferox* como en *Arabidopsis*, las citocininas serían componentes de esta señal lumínica que estimula la respuesta a las giberelinas en la germinación.

En cuanto a la identificación de los fotorreceptores que regulan la respuesta a las giberelinas en las semillas, aún no existe información concreta sobre este tema. Yang et al., (1995) fueron los primeros en observar que la respuesta a las giberelinas estaba controlada por una LFR de los fitocromos en *Arabidopsis*. Estos autores estudiaron la regulación por la luz de la respuesta a distintos tipos de giberelinas, entre ellos, GA_9, GA_{20}, GA_1 y GA_4, y encontraron que la LFR modula la respuesta a todos estos tipos de giberelinas. Sin embargo, en las condiciones experimentales utilizadas, no observaron diferencias en la regulación de la sensibilidad a las giberelinas por la LFR entre los mutantes simples *phyB*, *phyA* o en el doble *phyA phyB* y su control. Esto indicaría, en un principio, que la percepción de las giberelinas no estaría regulada, al menos solamente, por los PHYA o PHYB. El hecho que la regulación de la respuesta a la luz en la germinación involucra la acción de múltiples fotorreceptores conduce a pensar que la

respuesta a las giberelinas de las semillas es mediada por relaciones complejas entre los mismos, y que más de un fotorreceptor puede estar involucrado en la regulación. En ese caso, el estudio de la respuesta a las giberelinas de dobles y triples mutantes de distintos fitocromos constituye una estrategia interesante para avanzar en el conocimiento de las interacciones entre la luz y las giberelinas en la germinación.

En este capítulo de tesis se estudió la respuesta a las giberelinas en la germinación de los mutantes fondo genético Columbia, *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyE* y *phyD*, así como de distintas combinaciones de mutantes dobles y del triple *phyB phyE phyD*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las semillas y condiciones de incubación

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas mediante una colaboración con el Dr. Pablo Cerdán (Fundación Leloir). Luego de su cosecha y una vez secas, las semillas se almacenaron a 4°C en oscuridad hasta el momento de los experimentos, los cuales se llevaron a cabo dos meses después de la cosecha.

Para los experimentos de germinación, las semillas fueron embebidas sobre dos láminas de papel de filtro en cajas trasparentes, en soluciones de Paclobutrazol 4ppm (2RS, 3RS-1-(4 clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H1,2,4-Triazol-1-il) pentan-3-ol, CRESTAR, SYNGENTA) en combinación con distintas concentraciones de GA_4 (SIGMA). Los controles de germinación fueron embebidos sobre láminas de papel de filtro conteniendo agua destilada. Debido a que las semillas poseen una alta proporción Pfr/P establecido durante su formación en la planta madre, las mismas fueron irradiadas por 25 min con luz RL, como se indica en el Capítulo II. Luego de este tratamiento con luz RL, las cajas fueron envueltas con plásticos negros e incubadas a 4 °C por 48 h (estratificación). Finalizado este tratamiento, las semillas fueron irradiadas con pulsos horarios de 3 min de luz R o RL por 24 h, e incubadas a 25 °C en oscuridad por 3 días hasta el conteo de germinación. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Análisis de la Varianza (ANVA), utilizando la transformación angular de los porcentajes de germinación obtenidos en cada tratamiento. Los resultados significativos fueron determinados a valores de *P* menores de 0.05.

Fuentes de luz

La fuente de luz R (120 µmol m^{-2} seg^{-1}) estaba compuesta por diodos de luz R (emisión máxima a 660 nm). La fuente de luz RL (40 µmol m^{-2} seg^{-1}) constaba de un conjunto de lámparas reflectoras incandescentes de 150 W en combinación con un filtro de vidrio RG9 Schott (Mainz, Alemania) y un filtro de agua de 10 cm. La proporción calculada de Pfr/P fue de 0.87 y 0.03 para las fuentes de R y RL, respectivamente.

RESULTADOS

Los PHYB y PHYE participan en la promoción de la respuesta a las giberelinas en la germinación de semillas de Arabidopsis

En forma coherente con lo observado para semillas de *Arabidopsis* de los ecotipos Landsberg *erecta* y C24 **(Fig. II 15, 17 y 18)**, la respuesta a las giberelinas del ecotipo Columbia es controlada por una LFR de los fitocromos. Los pulsos horarios de tres minutos de luz R promueven fuertemente la respuesta al GA_4 a comparación de los pulsos horarios de luz RL. En los tres tratamientos realizados: luz R, luz RL y oscuridad esta respuesta es saturada con 10 µM de GA_{4+7} y, la respuesta en RL es similar a la de oscuridad **(Fig. III 1A)**. Por otro lado, la respuesta del mutante *phyB* al GA_{4+7} en luz R es significativamente menor que su control **(Fig. III 1B)**. Este efecto es particularmente notable a concentraciones de giberelinas menores a 10 µM indicando que, en las condiciones experimentes utilizadas para estos ensayos, la regulación de la respuesta de las semillas a las bajas concentraciones de giberelinas es mediada mayoritariamente por el PHYB. Es interesante notar que esta mutante conserva el control por una LFR de la respuesta a concentraciones altas de giberelinas, indicando que además de PHYB, otros fitocromos regulan la sensibilidad a esta hormona en la germinación. La respuesta a las giberelinas en luz R disminuye aún en mayor medida en la doble mutante *phyB phyE*, y no presenta diferencias con la respuesta en RL, indicando que el PHYE también contribuye a la regulación de la respuesta a las giberelinas en la germinación **(Fig. III 1 C)**. La germinación en las distintas concentraciones de GA_{4+7} del simple mutante *phyE* no difirió significativamente con su control **(Fig. III 1D)**, indicando que el efecto de la pérdida de función de *PHYE* es evidente cuando el PHYB no es activo en las semillas. Esto indica que existe una jerarquía entre fotorreceptores en la respuesta a las giberelinas, y que esta respuesta está regulada, al menos en parte, por PHYB y PHYE.

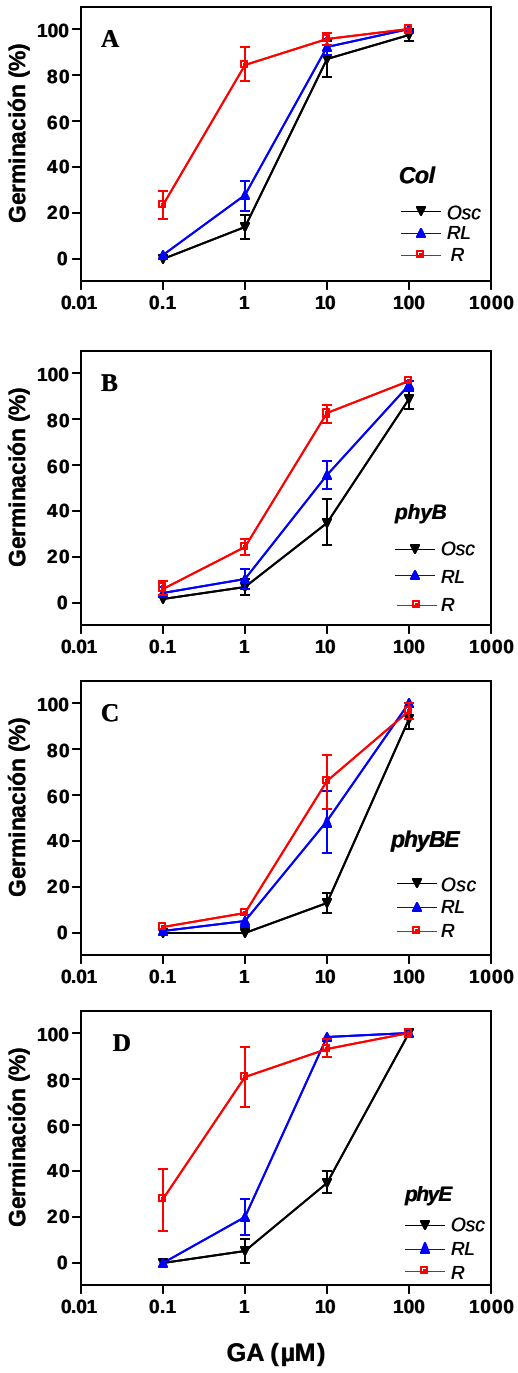


Fig. III 1. Los PHYB y PHYE están involucrados en la promoción por la LFR de la respuesta a las giberelinas en semillas .

(A), (B), (C) y (D): respuesta a concentraciones crecientes de GA_{4+7} de Columbia, *phyB*, *phyB phyE* y *phyE*, respectivamente. El protocolo experimental de los ensayos es similar al utilizado en la Fig. II 15. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independientes. *Osc*: Oscuridad, *RL*: pulsos horarios de luz RL por 24h, *R*: Pulsos horarios de luz R por 24h.

La respuesta a las giberelinas del mutante triple phyB phyE phyD está bajo el control de los fitocromos

Los resultados descriptos hasta el momento indican que PHYB y PHYE promueven la respuesta a las giberelinas en la germinación, ya que los dobles mutantes *phyB phyE* pierden por completo la diferencia entre la luz R y RL en la regulación de la respuesta a las giberelinas **(Fig.**

III 1C). Sin embargo, esta diferencia se reestablece en la triple mutante *phyB phyE phyD* **(Fig. III 2)**. En particular, la pérdida de función de PHYD promueve la respuesta a las giberelinas bajo luz R en el fondo genético *phyB phyE*; y este efecto es notable en la concentración de GA_{4+7} de 10µM **(comparación Fig. III 1C y Fig. III 2)**, lo que sugiere que el PHYD es un regulador negativo de la respuesta a las giberelinas en la germinación. Sin embargo, la respuesta a las giberelinas del mutante simple *phyD* es similar al de su control **(Fig. III 3B)**, indicando que en las condiciones de estos ensayos, el efecto de este fitocromo sobre esta respuesta es evidente cuando PHYB y PHYE no son funcionales.

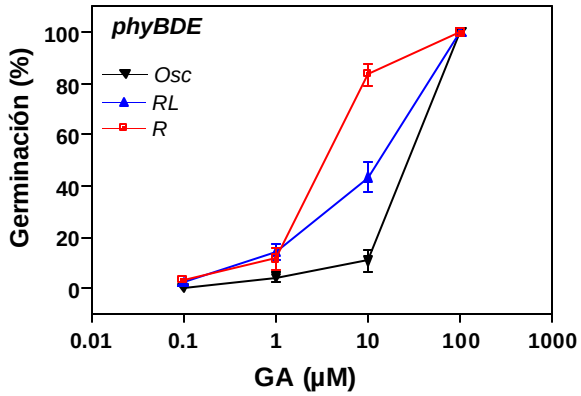


Fig. III 2. La pérdida de función de PHYD restaura la regulación por luz de la respuesta a las giberelinas del doble mutante *phyB phyE*.
El protocolo experimental de los ensayos es similar al utilizado en la Fig. II 15. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres. *Osc*: Oscuridad, *RL*: pulsos horarios de luz RL por 24h, *R*: Pulsos horarios de luz R por 24h.

El hecho que la triple mutante *phyB phyE phyD* muestre diferencias en la respuesta a las giberelinas entre los tratamientos de luz R y RL indicaría, de forma implícita, un rol para el PHYC en la regulación de la sensibilidad a las giberelinas en semillas, debido a que este es el único fitocromo que permanece activo en la triple mutante que podría mediar una respuesta del tipo LFR. La germinación de la mutante simple *phyC* es similar a su control **(Fig. III 3C)**, indicando que el efecto de este fotorreceptor sería notado en ausencia de PHYB, PHYE y PHYD.

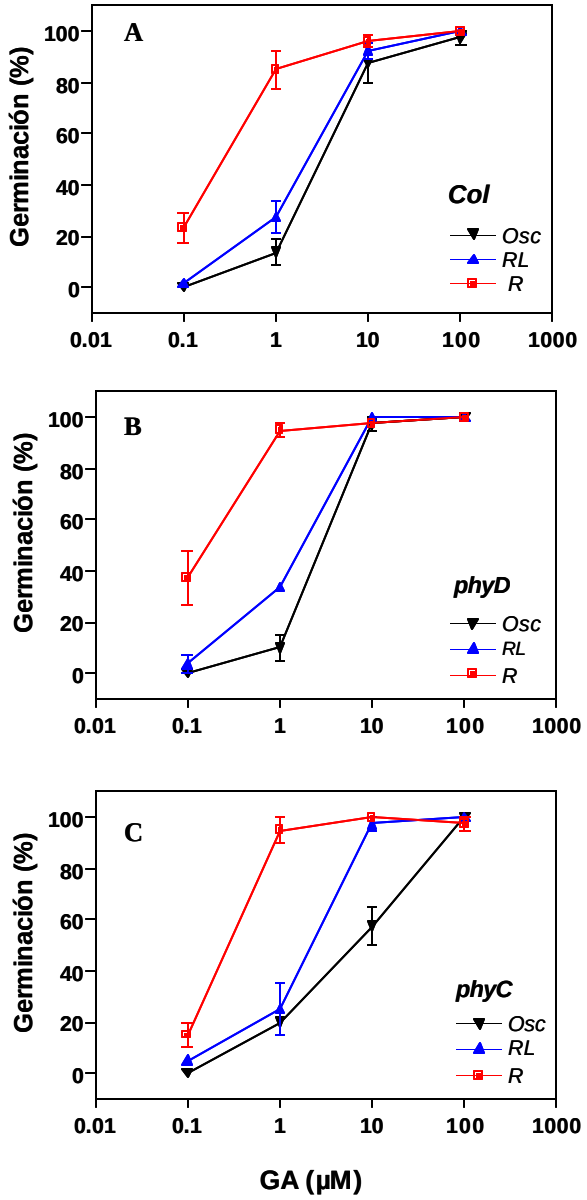


Fig. III 3. Respuesta a las giberelinas de mutantes simples *phyD* y *phyC* y su control Columbia.

(A), (B) y (C); germinación en respuesta a concentraciones crecientes de GA_{4+7} de Columbia, *phyD* y *phyC*, respectivamente. El diseño experimental es similar al de la Fig. III 1. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres El gráfico de Columbia fue repetido de la Fig. I con el propósito de facilitar su comparación. *Osc*: Oscuridad, *RL*: pulsos horarios de luz RL por 24h, *R*: Pulsos horarios de luz R por 24h.

La pérdida de función de PHYD estimula la respuesta a las giberelinas bajo RL en mutantes phyB y en RL y oscuridad en las mutantes phyE

Los resultados descriptos en la sección anterior indican que, mientras PHYB y PHYE son promotores de la respuesta a las giberelinas en la germinación, el PHYD podría ejercer una acción inhibitoria en este proceso. Sin embargo, la mutante simple *phyD* no mostró diferencias en esta respuesta a comparación con su control **(Fig. III 3B)**. Con el propósito de analizar en más detalle el efecto de *phyD* en la modulación de las respuestas a las giberelinas en semillas, se

estudió el efecto de la mutación *phyB phyD o phyE phyD* en el proceso. La respuesta a las giberelinas bajo luz R de la doble mutante *phyB phyD* no difiere significativamente de la respuesta de *phyB*. Sin embargo, cuando las semillas son irradiadas con pulsos de RL, esta respuesta es mayor en la doble mutante a comparación de *phyB* ($P < 0.05$) **(Fig. III 4)** indicando que, en el fondo genético *phyB*, la pérdida de función de PHYD estimula la sensibilidad a las giberelinas bajo RL. Asimismo, la pérdida de función de PHYD estimula la respuesta a las giberelinas en tanto en oscuridad como en RL de la mutante *phyE*. En respuesta a 1µM de GA_{4+7}; la germinación en oscuridad o en luz RL de *phyD phyE* es significativamente mayor a la de *phyE* ($P < 0.05$) **(Fig. III 5)**.

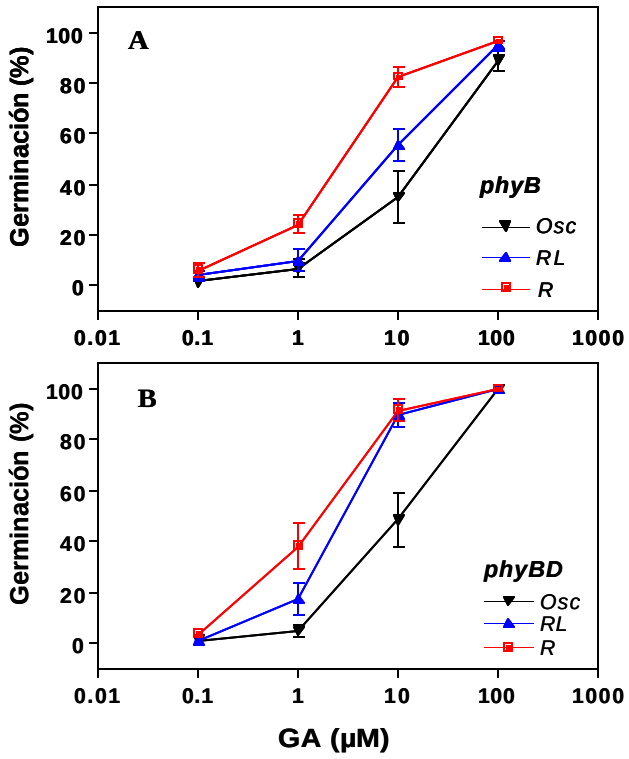


Fig. III 4. La pérdida de función de PHYD promueve la respuesta a las giberelinas bajo luz RL en las mutantes *phyB*.

(A) y (B); germinación en respuesta a concentraciones crecientes de GA_{4+7} de *phyB* y *phyB phyD*, respectivamente. El diseño experimental es similar al de la Fig. III 1. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres El gráfico de la mutante *phyB* fue repetido de la Fig. I con el propósito de facilitar su comparación. *Osc*: Oscuridad, *RL*: pulsos horarios de luz RL por 24 h, *R*: Pulsos horarios de luz R por 24 h.

Por otro lado, en luz R, la media del porcentaje de germinación a 0.1 µM de GA_{4+7} es mayor en *phyE phyD* a comparación con *phyD*, pero estas diferencias son marginalmente significativas ($P = 0.068$), indicando que en este fondo genético, la pérdida de función de PHYD afecta principalmente la sensibilidad a las giberelinas en RL **(Fig. III 5)**.

En conjunto, estos resultados indican que PHYD ejerce un efecto supresor en la respuesta a las giberelinas de las semillas.

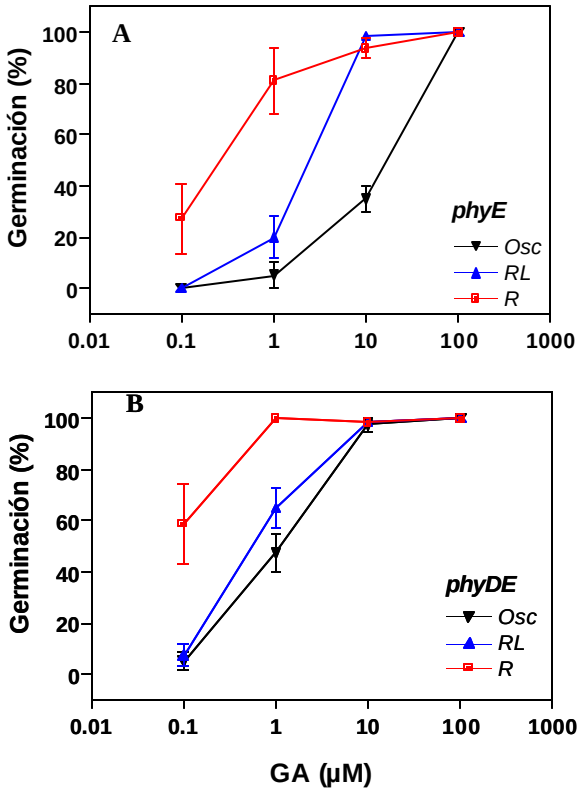


Fig. III 5. La pérdida de función de PHYD promueve la respuesta a las giberelinas bajo luz RL en la mutante *phyE*.

(A) y (B); germinación en respuesta a concentraciones crecientes de GA_{4+7} de *phyE* y *phyD phyE*, respectivamente. El diseño experimental es similar al de la Fig. III 1. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres. El gráfico de la mutante *phyE* fue repetido de la Fig. I con el propósito de facilitar su comparación. *Osc*: Oscuridad, *RL*: pulsos horarios de luz RL por 24h, *R*: Pulsos horarios de luz R por 24h.

Respuesta a las giberelinas en oscuridad

En Columbia, el porcentaje de germinación en respuesta a giberelinas en oscuridad es similar al de RL **(Fig. III 1)**. Sin embargo, la respuesta a las giberelinas bajo pulsos de RL de los mutantes dobles y triples, a excepción de PHYA y PHYB es mayor que en oscuridad **(Fig. III 1, 2, 4, 5)**. Con el fin de estudiar la posibilidad que estas diferencias se deban a un efecto del PHYA, se analizó la respuesta a las giberelinas de la mutante simple de este fotorreceptor bajo luz R, RL y oscuridad.

Como se muestra en la **Fig. III 6**, la germinación de este mutante no difirió significativamente con su control Col. Entonces, el PHYA no ejercería un rol principal en la regulación de la respuesta a las giberelinas para la germinación al menos cuando el resto de los fitocromos están presentes en las semillas.

Es interesante notar que la respuesta a las giberelinas en completa oscuridad para los mutantes simples y dobles, a excepción de *phyA*, *phyB* y *phyD phyE* es menor que en Col **(Fig. III 1, 2, 4)**.

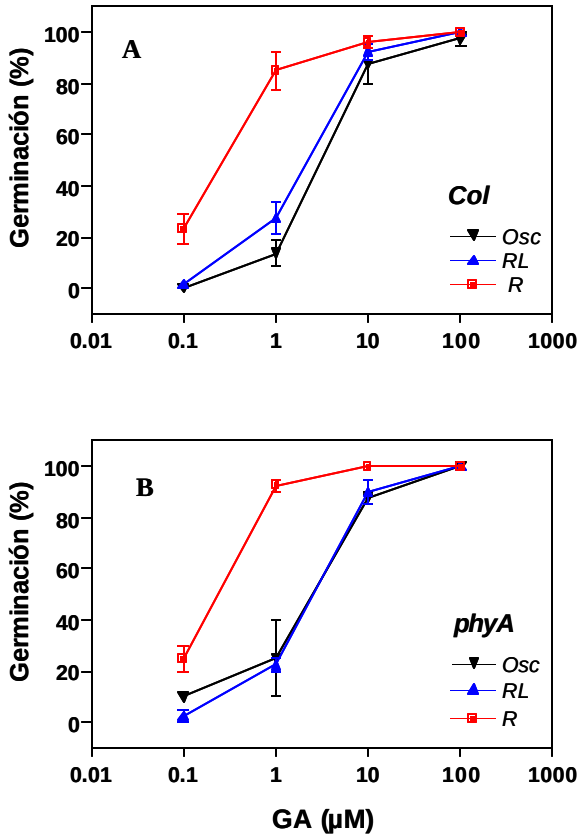


Fig. III 6. La respuesta a las giberelinas para la germinación de la mutante simple *phyA* no presenta diferencias s ignificativas con su control.

(A) y (B); germinación en respuesta a concentraciones crecientes de GA_{4+7} de Columbia y *phyA*, respectivamente. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres El gráfico de Columbia fue repetido de la Fig. I con el propósito de facilitar su comparación.

Respuesta a la luz de los mutantes de fitocromo

En las condiciones experimentales utilizadas, la luz R estimuló la germinación de aproximadamente un 94 % de la población de semillas Columbia, mientras la germinación en respuesta a pulsos de RL fue del 12%, mostrando una típica respuesta del tipo LFR de los fitocromos **(Fig. III 7)**. En contraste, la germinación en respuesta a la luz R del mutante simple *phyB*, los dobles *phyB phyD* y *phyB phyE* y el triple *phyB phyD phyE* fue significativamente menor a la de Columbia. En estos mutantes, la germinación en respuesta a pulsos de luz RL no difirió significativamente con el control **(Fig. III 7)**.

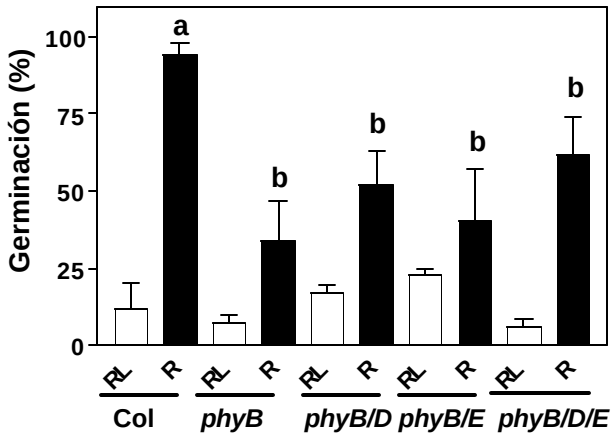


Fig. III 7. Respuesta a la luz de los mutantes *phyB, phyB phyD, phyB phyE, phyB phyD phyE* y el control Columbia.

Las semillas fueron sembradas en agar y luego de la imbibición fueron tratadas durante 20 min con un pulso de RL. A continuación las semillas fueron incubadas a 4°C en oscuridad por 48 h, tratadas luego por 24 h con pulsos horarios de luz R o RL. Los controles se mantuvieron en oscuridad, hasta el momento de contar la germinación. El gráfico muestra la media y D.E.M de al menos 3 experimentos independientes. Porcentaje de germinación en oscuridad: Col: 0, *phyB*: 1 $\pm$ 1, *phyB/D*: 0, *phyB/E*: 0, *phyB/D/E*: 0.

El análisis de la germinación de mutantes simples *phyA, phyE, phyC y phyD* mostró que la pérdida de función de cada uno de estos genes cuando los otros fotorreceptores estaban presentes no tuvo un efecto significativo en la respuesta a luz R o RL para la germinación. Sin embargo, la mutante doble *phyD phyE* mostró un dramático aumento de la germinación en RL en comparación con Columbia **(Fig. III 8)**. Este incremento es coherente con la observación que la pérdida simultánea de función de PHYD y PHYE promueve la respuesta a las giberelinas en RL, a comparación con su control **(Fig. III 5)**.

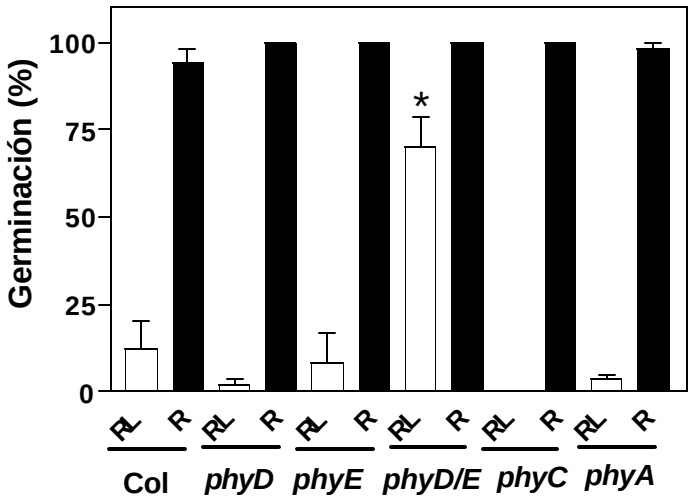


Fig. III 8. Respuesta a la luz de los mutantes *phyD, phyE, phyD phyE phyD, phyC* y *phyA*. El protocolo y diseño experimental es similar al de la Fig. III 7. Los datos corresponden a la media y D.E.M provenientes de al menos 3 experimentos independieres. El control Columbia es el mismo de la Fig. III 7, y fue agregado al gráfico para facilitar su comparación. Porcentaje de germinación en oscuridad: Col: 0, *phyD*: 0, *phyE*: 0, *phyD/E*: 3.33 $\pm$ 3, *phyC*: 0,

DISCUSIÓN

En las primeras etapas de la investigación de los fitocromos, se creyó en la existencia de un único fotorreceptor que mediaba las múltiples respuestas de las plantas a la luz. Más adelante, alrededor de 1980 los estudios espectrofotométricos indicaron que existían al menos dos grupos distintos de fitocromos, los de tipo I o foto-lábiles, y los de tipo II, que son estables a la luz (Neff *et al.*, 2000). El clonado de múltiples genes de los fitocromos ha demostrado que existen múltiples fotorreceptores de esta familia (Sharrock y Quail, 1989). El análisis de mutantes que carecen en una o más funciones de estos fotorreceptores constituyen una buena estrategia para la atribución de los roles específicos de cada uno en el desarrollo de las plantas. Los análisis de sobreexpresantes o mutantes dobles y triples de fitocromos han sido dirigidos al estudio de la interacción entre fotorreceptores en la des-etiolación, floración, desarrollo de la hoja y germinación. Estos trabajos han demostrado que existen interacciones complejas y en algunos casos redundantes entre los fotorreceptores (Qin *et al.*, 1997; Henning *et al.*, 2001; Henning *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2003; Monte *et al.*, 2003). Hasta el momento de realizar esta tesis, no existía información sobre los fitocromos específicos que participan en la modulación de la sensibilidad a las giberelinas en semillas.

Los experimentos descriptos en este capítulo de tesis demuestran que el PHYB es el principal regulador de las respuestas a la giberelinas en la germinación **(Fig. III 1)**. Este resultado es distinto al observado por Yang et al., (1995), y esto puede estar relacionado con la diferencia en el fondo genético de las semillas, ya que los autores llevaron a cabo los estudios con semillas del ecotipo Landsberg *erecta.* Asimismo, puede ser una consecuencia de la existencia de diferencias en el estado fisiológico de las semillas utilizadas en cada caso. Por ejemplo, no es claro el tiempo de post-maduración de las semillas utilizadas por estos autores, y en consecuencia, el nivel de dormición y envejecimiento de las mismas. Las semillas de *Arabidopsis* que poseen dormición requieren de un periodo de estratificación para responder a la luz y aún así, en general la germinación en oscuridad ocurre en un bajo porcentaje de la población. Por ejemplo, el porcentaje de germinación en oscuridad de las semillas utilizadas en los experimentos de esta tesis no superó el 2% luego de la estratificación. En forma contraria, la germinación de las semillas utilizadas por Yang y colaboradores fue de un 95 % en luz R y un 36 % en oscuridad luego de 2 h de imbibición a temperatura ambiente (sin periodo de

estratificación). Estos datos sugieren que el nivel de dormición de esas semillas era muy reducido. En ese caso, es posible que, a medida que ocurre la post-maduración y el nivel de dormición de las semillas disminuye, la respuesta a las giberelinas se independice de la acción del PHYB, y otros PHY regulen esta respuesta. En este sentido, nuestros datos indican que otros fotorreceptores, además del PHYB están participando en la regulación a las giberelinas **(Fig. III 1-2)**.

En comparación con el control, la pérdida de función de PHYB afecta la promoción de la respuesta a las giberelinas por luz R, y este efecto es particularmente visible a bajas concentraciones de GA_4. El rol de PHYB en esta regulación está fuertemente apoyado por el hecho que la sensibilidad a esta hormona en luz R es menor al de la del control siempre que la mutación *phyB* esta presente **(Fig. III 1C, 2 y 4)**. Los experimentos descriptos indican que el PHYE también regula la respuesta a las giberelinas en la germinación **(Fig III 1C)**. Sin embargo, la ausencia de diferencias en la germinación en respuesta a las giberelinas entre la mutante simple *phyE* y Columbia bajo R y RL **(Fig. III 1)** indica que existe una relación jerárquica entre estos fotorreceptores, donde el PHYB es el principal fotorreceptor que estimula esta respuesta. Esto es coherente con el hecho que las curvas de respuesta a las giberelinas en R y RL de todos los otros mutantes simples *phyA, phyC* y *phyD* son similares al control **(Fig. III 3 y 6)**.

En plántulas, las mutantes *phyB* muestran una marcada insensibilidad a la inhibición del alargamiento del hipocotilo, la promoción de la expansión de cotiledones y la síntesis de antocianinas bajo tratamientos prolongados de luz R (Devlin *et al.*, 1992; Reed *et al.*, 1993) demostrando que en este estadio de desarrollo el PHYB también ejerce el rol principal en la respuesta a la luz R. Los mutantes de *phyE* no poseen diferencias con el control en la expansión de los cotiledones bajo luz R. Sin embargo, el área de los cotiledones del doble mutante *phyB phyE* es menor a la del *phyB*, indicando que el PHYE también participa en este proceso, y su efecto estaría enmascarado, en la planta salvaje, por la acción del PHYB (Franklin *et al.*, 2003). Esto se asemeja a las relaciones observadas entre PHYB y PHYE en la regulación de la respuesta a las giberelinas en las semillas aquí descriptas **(Fig. III 1)**.

La pérdida de función de PHYD estimula la sensibilidad a las giberelinas en RL en el fondo genético *phyB* **(Fig. III 4)**, sugiriendo que el PHYD regula de forma negativa la respuesta a las giberelinas de las semillas. Esta propuesta es coherente con la observación que la pérdida de función de PHYD también estimuló la respuesta a las giberelinas en el fondo genético *phyE*

(Fig. III 5). La germinación de *phyD phyE*, además, es extraordinariamente sensible al RL **(Fig. III 8)**. Es probable que, en este caso, si hay formación de pequeñas cantidades de giberelinas bajo el tratamiento de RL, estas mutantes sean capaces de responder a las mismas y germinar en alta proporción bajo este tratamiento. Esta sensibilidad a la luz RL de *phyE phyD* es perdida en la triple mutante *phyB phyE phyD* **(Fig. III 8)**, indicando que el Pfr del fitocromo B promovería la respuesta en la mutante doble *phyE phyD* **(Fig. III 7)**.

El rol de PHYD como regulador negativo de la respuesta a las giberelinas es además evidenciado por el hecho que mientras en *phyB phyE* la respuesta a esta hormona bajo luz R es baja y similar a la de RL, esta se incrementa en la triple *phyB phyE phyD*, indicando que el PHYD modularía negativamente la sensibilidad a las giberelinas en luz R **(Fig. III 2)**. También es interesante notar que en *phyB phyE phyD* esta respuesta es mayor en R que en RL sugiriendo, de forma indirecta, un rol para el PHYC en la regulación de la respuesta a las giberelinas en las semillas.

En Columbia, la respuesta a las giberelinas bajo luz RL es similar a la de oscuridad **(Fig. III 1A)**. Sin embargo, en la mayoría de los mutantes a excepción de *phyA*, *phyB* y *phyD*, la germinación en RL es significativamente mayor que en oscuridad **(Fig. III 1-4)**. Esto sugiere un rol para el PHYA en la regulación de la respuesta a las giberelinas, el cual sería anulado cuando otros fotorreceptores están presentes en las semillas **(Fig. III 6)**. Como segunda opción, es posible que el 3% de Pfr de otros fotorreceptores distintos a PHYA formado durante el tratamiento con luz RL esté mediando la respuesta a las giberelinas. Son necesarios más estudios del rol del PHYA y PHYC para avanzar en el entendimiento de esta regulación. La respuesta a las giberelinas en total oscuridad es distinta entre los mutantes y su control, a excepción de *phyA* y *phyD* **(Fig. III 1-6)**. Esta diferencia podría estar originada por el establecimiento de distintos niveles de dormición en las semillas debido a la falta de algunos de estos fotorreceptores durante su desarrollo en la planta madre.

En *Arabidopsis*, se ha demostrado que la inducción de la germinación por R involucra el aumento de la expresión de dos genes que codifican para GA3ß-hidroxilasas: *GA4* y *GA4H*. Mientras que la expresión de *GA4H* no es inducida por R en mutantes de *phyB*, la expresión de *GA4* aún lo es, indicando que el efecto de la luz sobre la expresión de estos genes involucra la acción de distintos fotorreceptores (Yamaguchi *et al.*, 1998). Este capítulo de tesis aporta por

primera vez información sobre el rol de los distintos fitocromos en la regulación de la sensibilidad a las giberelinas en las semillas, siendo el PHYB el principal modulador de esta respuesta bajo luz R. Esto es coherente con la observación que las mutantes *phyB* poseen una respuesta reducida a la luz R para la germinación, en comparación con su control **(Fig. III 7)**. En este contexto, el PHYB entonces controlaría dos procesos claves en la inducción de la germinación; la biosíntesis de giberelinas activas y la promoción de la sensibilidad de las semillas a las giberelinas. En concentraciones altas de giberelinas, las cuales saturan la respuesta a la germinación en el genotipo salvaje, la relación entre los fotorreceptores en el control de la respuesta a las giberelinas es más compleja, siendo además, PHYE y aparentemente PHYC reguladores positivos, y PHYD un regulador negativo en la misma. En la **Fig. III 10** se propone un esquema que describe la acción de los distintos fotorreceptores sobre la sensibilidad a las giberelinas en la promoción de la germinación por luz.

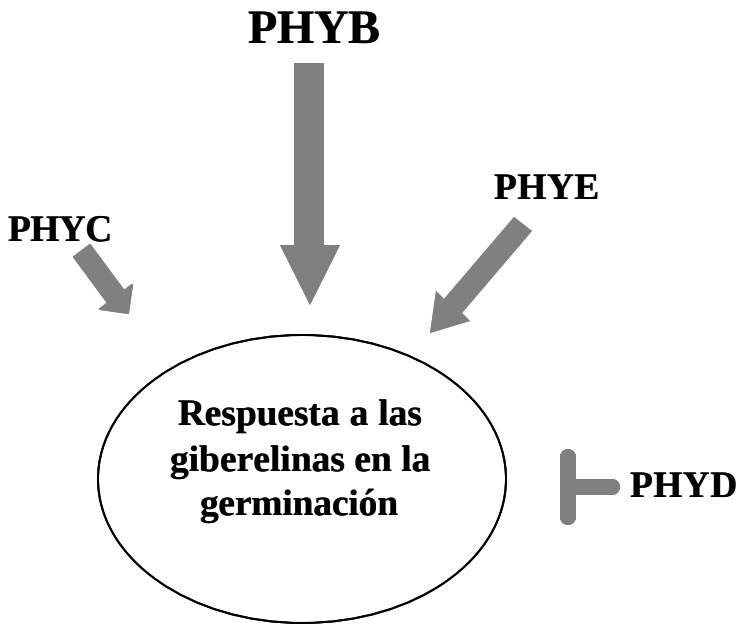


Fig. III 10. Modelo propuesto para la modulación de la respuesta a las giberelinas en la germinación por los distintos *PHY*. Las flechas indican efectos promotores, y las barras indican efectos inhibitorios. La jerarquía de cada fotorreceptor en la modulación de la respuesta es indicada por los distintos tamaños de los símbolos.

CONCLUSIONES

La promoción de la germinación por luz involucra una compleja interacción entre distintos fitocromos. En las especies estudiadas, estas son *Datura ferox* y *Arabidopsis thaliana*, los fitocromos regulan la respuesta a las giberelinas en la germinación, y hasta el momento no se conocían los fotorreceptores involucrados. En esta tesis, se demuestra por primera vez que 1) Existe una jerarquía entre los fotorreceptores que controla la respuesta a las giberelinas en la germinación, siendo el PHYB el principal modulador de la misma 2) El PHYE y, aparentemente el PHYC estimulan la respuesta a las giberelinas. 3) El PHYD es un modulador negativo de la respuesta a las giberelinas en la germinación. 4) La promoción de la germinación por luz en los distintos mutantes de los fitocromos está asociada a su capacidad de respuesta a las giberelinas de las semillas.

CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE ALGUNOS COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ABA Y LOS FITOCROMOS EN LA GERMINACION Y FOTOMOFOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

En las plantas superiores, numerosos procesos modulados por los fitocromos tales como el alargamiento del coleoptilo (Kutschera y Schopfer, 1986), del eje embrionario durante la germinación (Sánchez y Mella, 2004), la abscisión (Craker y Zhao, 1987), y los movimientos estomáticos (Holmes y Klein, 1985) son también controlados por el ácido abscísico (ABA) (Taiz y Zeiger, 1998). La luz podría mediar estos procesos al menos en parte a través de la modificación de niveles o de la respuesta al ABA de los tejidos. Por ejemplo, un aumento en los contenidos o sensibilidad al ABA promueve la dormición en semillas de numerosas especies (Koornneef *et al.*, 1982; Koornneef *et al.*, 1984; Grappin *et al.*, 2000; Thompsom *et al.*, 2000; Qin y Zeevaart, 2002; Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y, en ciertos casos, el estímulo de la germinación por luz R está asociado a la disminución de los contenidos de esta hormona antes de la emergencia de la radícula. En *Nicotiana plumbaginifolia*, la luz R promueve la germinación, y estudios con mutantes *aba1* y *pew1*, deficientes en ABA y fitocromos respectivamente, revelan que los fitocromos promueven la disminución de los contenidos de ABA en semillas (Kraepiel *et al.*, 1994). Asimismo, en *Pinus silvestris* la ruptura de la dormición por los fitocromos está asociada a la disminución de los contenidos de ABA de las semillas (Tillberg, 1992; Tillberg y Björkman, 1993) y las temperaturas altas, las cuales inhiben la germinación en lechuga, suprimen la reducción en los contenidos de ABA asociados al estímulo de la germinación por luz (Yoshioka *et al.*, 1998). Si bien todos estos resultados demuestran que en estas especies los fitocromos controlan los niveles de ABA en semillas, el antagonismo ABA-fitocromos en la germinación podría también involucrar el control de la sensibilidad de las semillas a esta hormona. Hasta el momento, esta posibilidad no ha sido explorada.

La germinación del cultivar *Grand Rapids* de lechuga es dependiente de los fitocromos, y el agregado de cumarina y zeaxantina, dos inhibidores naturales de la germinación, tiene efectos antagónicos a los de la luz. El efecto de estos inhibidores no es revertido por la adición de giberelinas al medio de incubación, pero sí por la aplicación de citocininas junto con el tratamiento de luz R, indicando un antagonismo entre la curmarina o zeaxantina con las citocininas en la germinación mediada por luz (Khan y Tolbert, 1965). El papel de las citocininas exógenas como supresoras de la acción de inhibidores de la germinación fue demostrada en numerosas especies y ha llevado a Khan, en 1971, a proponer un modelo donde las citocininas

promueven indirectamente la germinación, mediante la supresión de la acción inhibitoria del ABA en las semillas. Según este modelo, que todavía no ha sido completamente comprobado, las citocininas se requerirían para desbloquear la acción del ABA, y la germinación ocurriría siempre y cuando las giberelinas ejerzan su efecto promotor en el este proceso.

En *Datura ferox*, el ABA inhibe la promoción de la germinación por los fitocromos, y existe una correlación entre la disminución de inhibidores de naturaleza ácida en semillas y el aumento de la sensibilidad de estas a la luz (de Miguel, 1980). En esta especie el ABA afecta mayoritariamente la acción de los fitocromos sobre el potencial de crecimiento del embrión, mientras que el ablandamiento del endosperma prácticamente no es influenciado por esta hormona (de Miguel *et al.*, 1999). El agregado de giberelinas en combinación con luz R no contrarresta el efecto inhibitorio del ABA en la germinación (de Miguel, comunicación personal). Una posibilidad en la que se puede pensar es que el ABA actúe sobre la sensibilidad a las giberelinas de las células del embrión, y que las citocininas antagonicen este efecto. Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido explorada.

Una vez ocurrida la germinación, un período prolongado de crecimiento de las plántulas en oscuridad promueve el estado de quiescencia, caracterizado por el detenimiento de la división celular en el meristema apical. El estado de quiescencia aporta a la plántula una mayor resistencia a condiciones ambientales adversas, en comparación al estado de activo crecimiento, y el mismo es rápidamente superado cuando las características ambientales se tornan favorables para el desarrollo. Este estado de quiescencia establecido en oscuridad está asociado a una fuerte expresión del gen *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*); un modulador positivo de las respuestas al ABA, y de las proteínas de reserva de semillas *2S* y *VSP* (Rohde *et al.*, 1999) en el meristema apical de las plántulas. Es probable que el desarrollo de plántulas en oscuridad promueva las respuestas al ABA, y que las señales que promueven la fotomorfogénesis supriman en cierto grado las respuestas a esta hormona. En este sentido, en *Lemna gibba*, la expresión de los genes *NPR1* y *NPR2* la cual es inducida por ABA, es negativamente regulada por los fitocromos a través de la disminución de los contenidos de esta hormona (Williams *et al.*, 1994; Weatherwax *et al.*, 1998). En tomate, soja y *Lemna*, la acumulación de mensajeros de las de proteínas fotosintéticas *Lhcb* y *rbcS* en presencia de luz R, es suprimida por la incubación con ABA (Bartholomew *et al.*, 1991; Chang y Walling, 1991; Weatherwax *et al.*, 1996), mientras la luz R inhibe la inducción por ABA de la expresión del gen *Em* (Weatherwax *et al.*, 1996).

Ha sido observado en plántulas, y aún más frecuentemente en semillas, que las condiciones ambientales experimentadas durante una etapa del desarrollo condicionan las respuestas al ambiente en etapas posteriores (Revisado por Fenner, 1991; Wulff, 1995). Asimismo, muchas especies requieren un período de exposición al frío para florecer (vernalización), y en algunos casos, como ser en *Hyoscyamus niger*, la vernalización sólo es inductiva de la floración cuando es seguida por días largos. Esta señal, inducida por la vernalización, es mantenida durante muchas rondas de divisiones celulares, y se sugiere que el tratamiento de frío causa cambios en el patrón de la expresión de genes (Taiz y Zeiger, 1998). Sin embargo, las bases bioquímicas y moleculares involucradas en la percepción de cambios en el ambiente y su transmisión entre distintos estadios de desarrollo aun no son claras. En *Arabidopsis*, la expresión de un número importante de genes que contienen el dominio *RY* cis, el cual es un sitio de unión del factor de transcripción *ABI3*, está fuertemente promovida en plántulas mutantes *phyB*, a comparación con su genotipo salvaje (Mazzella *et al.*, 2005). Esto abre la posibilidad que la acción del PHYB en la supresión de este conjunto de genes podría estar mediada, al menos en parte, por cambios en la expresión de *ABI3*. Las diferencias en la expresión de genes entre mutantes *phyB* y su genotipo salvaje son observadas aún en plántulas desarrolladas en completa oscuridad, indicando que esta regulación no implicaría la acción de los fitocromos presentes en las plántulas sino que estaría mediada por la percepción del ambiente lumínico, a través del fitocromo B, en estadios de desarrollo anteriores. Por ello, se consideró apropiado estudiar la influencia del ambiente lumínico experimentado por la semilla, a través de los fitocromos, sobre la expresión de genes y respuesta a la luz de las plántulas derivadas de estas.

En este capítulo se ha estudiado la interacción entre el ABA, las citocininas y las giberelinas en la promoción de la germinación por fitocromos en *D. ferox*, así como la interacción de los fitocromos y componentes de la vía de señalización del ABA en la germinación y fotomorfogénesis de *Arabidopsis.* También se ha evaluado la posibilidad que, el ambiente lumínico experimentado por las semillas condicionen la sensibilidad a la luz de las plántulas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las semillas

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en estos ensayos fueron gentilmente cedidas por los Doctores Eiji Nambara (*abi3-6*), Francoise Parcy (líneas 35S::ABI3; las cuales fueron llamadas *ABI3-OX4* y *ABI3-OX6*), Julian Shroeder (*abi1-1* y *era1-2*) y Jorge Casal (*abi4-1*, *abi5-1*, *det3*, columbia, C24 y WS).

Fuentes de luz

La luz R (30 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) estaba compuesta por tubos fluorescentes rojos, mientras que la fuente de luz RL (40 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) consistió en lámparas incandescentes las cuales se interpusieron con un filtro de agua en combinación con filtros plásticos amarillos, naranjas y azules en distintas relaciones, con el propósito de establecer un fotoequilibrio de Pfr/Pr de 0.1 y 0.3. Las fuentes de luz utilizadas para lograr los distintos porcentajes de fitocromo activo en las semillas son similares a las descriptas en el Capítulo II.

Medición del largo del hipocotilo y de la apertura entre cotiledones

Las semillas se sembraron en cajas trasparentes que contenían agar-agua 1% p/v (15 semillas por caja) y fueron incubadas durante 3 días a 5°C en oscuridad (tratamiento de estratificación). Luego de la estratificación, las semillas fueron expuestas a 25 minutos de luz R (inducción de la germinación) e incubadas 24 hs en oscuridad absoluta. Las semillas entonces fueron expuestas a tres tratamientos lumínicos: pulsos horarios de 3 minutos de RL (RLp), pulsos horarios de 3 minutos de luz R (Rp) o a luz RL contínua (RLc) por 3 días. El largo del hipocotilo fue medido con una regla con división mínima de 0.5 mm en las 10 plántulas mas largas de cada caja (esto elimina la incorporación de datos de plantas defectuosas). El ángulo entre cotiledones fue medido con un transportador, en las mismas 10 plántulas utilizadas en las mediciones de largo del hipocotilo. Los experimentos se realizaron por triplicado tomándose 3 datos por experimento. Cada dato corresponde al promedio de la medición de 10 plántulas por caja.

Estudio del ambiente lumínico percibido por las semillas y su relación con la expresión del gen ABI3 en plántulas

Las semillas de plantas transgénicas portadoras de la construcción *ABI3::GUS* fueron sembradas en agar-agua 1% p/v, irradiadas con un pulso de 25 min de RL, con el propósito de eliminar la mayor cantidad posible de fitocromos activos en las semillas, e incubadas a 5 °C en oscuridad por 5 días. Luego de la estratificación en frío, las semillas fueron incubadas en oscuridad a 22 °C (promoción de la germinación en oscuridad) o irradiadas con luz R por 8 h y luego incubadas 22 °C, en oscuridad. Las muestras para medición de la actividad GUS fueron cosechadas 4 d después de la inducción de la germinación, y en el caso de la tinción de la plántula, se cosecharon muestras los días 1, 2, 3 y 4 luego de la inducción de la germinación. Para los experimentos donde se estudia la posibilidad que la señal que se transmite de la semilla a la plántula sea la forma activa del PHYB, las semillas y plántulas fueron expuestas a los mismos tratamientos descriptos anteriormente, con la diferencia que las plántulas fueron tratadas con un pulso de luz RL 24 h después de la inducción de la germinación.

Para estudiar el tipo de respuesta que origina la señal en la semilla, estas fueron estratificadas en frío como se describió anteriormente y luego fueron sometidas a (1) pulsos horarios de 3 min de luz R durante 8 h, (2) pulsos horarios de 3 min de luz R seguidos por 15 min de luz RL, (3) Pulsos horarios de 18 min de luz RL, (4) Oscuridad. Luego, las semillas fueron incubadas en oscuridad a 22 °C por 48h, momento en que se realizaron las tinciones histoquímicas.

Medición de la actividad del promotor ABI3

Para medir la actividad del promotor *ABI3* en plántulas, las muestras cosechadas se molieron en tubos eppendorf con 50 µl de buffer de extracción GUS (Buffer fosfato 50mM, ß-mercaptoetanol 10mM; EDTA pH8 10mM, SDS 0,1%, Tritón 0,1%). Luego las muestras fueron centrifugadas a 4 °C por 10 min a máxima velocidad, y los sobrenadantes se guardaron a -80 °C por un tiempo máximo de 1 semana, donde se midió la actividad GUS utilizando el reactivo 4-metilumeliferlil-ß-glucuronido (SIGMA) como sustrato. Las curvas estándar se prepararon con el reactivo 4-metilumbeliferona (SIGMA). El protocolo utilizado se encuentra descripto en Cerdán *et al.*, (2000).

La tinción *in vivo* de actividad GUS fue realizada según Blázquez *et al.*, (1999). Las plantas transgénicas se incubaron a 37 °C entre 45 min y 1 h 15 min en la solución de tinción

(2mM 5-bromo-4cloro-3-indolilß-glucurónido, 2mM de ferrocianida en buffer fosfato de sodio 50 mM). Las plántulas teñidas se fijaron por 30 minutos en etanol 20% y se transfirieron luego a etanol 35%, donde fueron inmediatamente analizadas y fotografiadas.

RESULTADOS

El ABA inhibe la germinación mediada por luz en D. ferox, y el agregado de zeatina antagoniza este efecto

Con el propósito de estudiar posibles interacciones entre el ABA y las citocininas en el estímulo de la germinación por luz, las semillas de *D. ferox* fueron preincubadas en temperaturas alternadas, peladas, e incubadas en soluciones que contenían ABA, zeatina, o una combinación de ambas. Las semillas fueron irradiadas entonces con un pulso de luz R o RL, e incubadas en completa oscuridad, a temperaturas alternadas, hasta evaluar el porcentaje de germinación **(Fig. VI 1A)**.

Mientras que la germinación del control y luz R fue del 100 %, ninguna semilla germinó luego del tratamiento con luz RL, indicando que en estas condiciones experimentales, la germinación de las semillas de *D. ferox* fue promovida por una LFR. El agregado de ABA al medio de incubación inhibió el estímulo de la germinación por R, y el efecto del ABA fue reducido por el agregado de zeatina ($P < 0.001$) **(Fig. IV 1B)**.

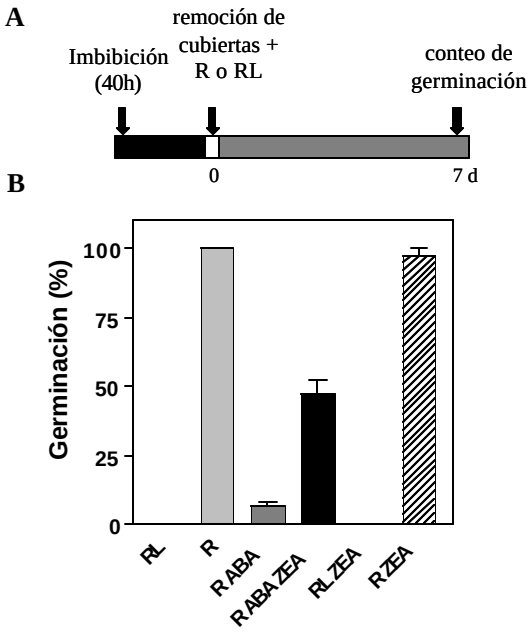


Fig. IV 1. La zeatina reduce el efecto del ABA en la inhibición de la germinación de *D. ferox*. **(A)** Protocolo experimental. Las semillas fueron preincubadas en agua, peladas e incubadas en ABA 100 µM con o sin el agregado de zeatina 50 µM, mientras que los controles se mantuvieron en agua. Las semillas fueron entonces inmediatamente tratadas con un pulso de luz R o RL y luego incubadas en oscuridad (20/30 °C) hasta el conteo de germinación. **(B)** Porcentaje de germinación medido 7 días después de los tratamientos lumínicos. *ABA*: ácido abscísico 100 µM, *ZEA*: zeatina 50µM.

El ABA disminuye la respuesta de las células del embrión al GA, y el agregado de zeatina suprime este efecto

La acción inhibitoria del ABA en la germinación de *D. ferox* está asociada principalmente a la supresión del potencial de crecimiento del embrión mediado por la luz R (de Miguel *et al.*, 1999). El efecto del ABA sobre el potencial de crecimiento del embrión es más pronunciado cuanto mayor es la concentración de esta hormona en el medio de incubación **(Fig. IV 2A)**. Debido a que el estímulo del potencial de crecimiento por una LFR requiere de la biosíntesis de giberelinas **(Fig. II 4)**, y que la luz aumenta la respuesta a las giberelinas en de las células del embrión **(Fig. II 5)**, se estudió la posibilidad que la inhibición del potencial de crecimiento del embrión por ABA esté mediada al menos en parte, por un efecto de esta hormona sobre la sensibilidad al GA de las células del embrión. Para ello, se midió el estímulo del potencial de crecimiento por una LFR, en semillas incubadas sólo con GA o con ABA y GA y a las cuales se les inhibió la biosíntesis de giberelinas activas.

La incubación con ABA disminuyó la respuesta al GA para el estímulo del potencial de crecimiento, observándose una relación inversa entre el aumento de la concentración de ABA en el medio y la respuesta al GA de los embriones **(Fig. IV 2B)**. Debido a que la zeatina estimula la respuesta al GA de las células del embrión **(Fig. II 5)** y revierte significativamente el efecto del ABA como inhibidor de la germinación **(Fig. IV 1)**, se estudió la posibilidad que la zeatina

suprima el efecto del ABA en la respuesta al GA del embrión. En las condiciones experimentales utilizadas, la zeatina suprimió el efecto del ABA en la respuesta al GA de las células del embrión, cuando las semillas fueron irradiadas con luz R. Este efecto fue evidente para concentraciones de ABA de 10 y de 100 µM **(Fig. IV 3A-B)**. En conjunto, estos resultados indican que la supresión del efecto de R por ABA involucra una disminución de la respuesta las giberelinas de las células del embrión. Es probable que en presencia de luz R, las citocininas contrarresten los efectos del ABA en la germinación **(Fig. IV 1)** mediante el re-establecimiento de la respuesta a las giberelinas para el estímulo del potencial de crecimiento del embrión.

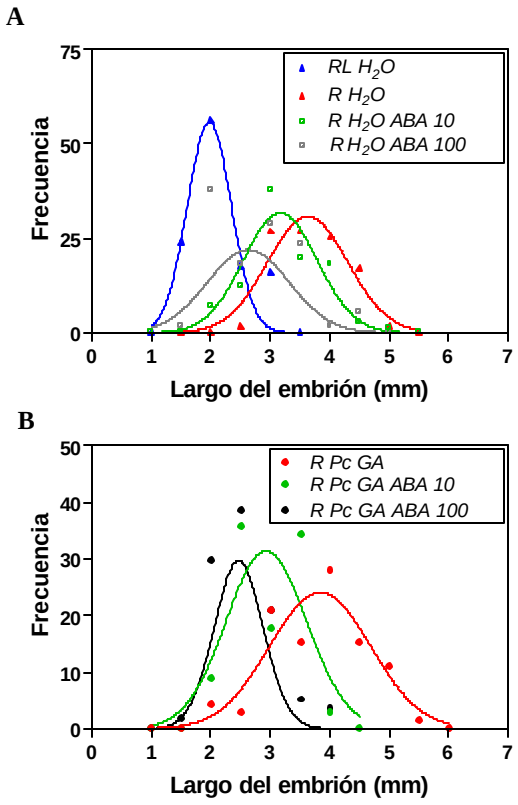


Fig. IV 2. El ABA disminuye la respuesta al GA de las células del embrión.

(A) y (B) Frecuencia de distribución del largo del embrión luego de los distintos tratamientos lumínicos y hormonales. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes, utilizando 25 embriones por muestra. El protocolo experimental es similar al descrito en la Fig. II 4, con la diferencia que los tratamientos hormonales consistieron en incubaciones con: ABA 10µM (rectángulos verdes), ABA 100 µM (rectángulos grises), paclobutrazol y GA_3 (círculos rojos), paclobutrazol GA_3 y ABA 10 µM (rombos verdes) o paclobutrazol, GA_3 y ABA 100 µM (rombos negros). Los controles fueron incubados en agua e irradiados con luz R (triángulos rojos) o RL (triángulos azules). *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM, *ABA 10*: ácido abscísico 10 µM, *ABA 100*: ácido abscísico 100 µM *ZEA*: zeatina 50µM.

Interacciones entre las vías de señalización del ABA y los fitocromos en el estímulo de la germinación mediada por luz de Arabidopsis

Los experimentos realizados en *D. ferox* demuestran que el ABA inhibe el estímulo de la germinación mediada por los fitocromos (de Miguel *et al.*, 1999; **Fig. IV 1**). Con el propósito de estudiar algunos de los componentes de la señalización del ABA involucrados en esta inhibición, se caracterizó la germinación inducida por luz en mutantes *abi3-6*, *abi4-1* y *era1-2* de *Arabidopsis*. Tanto *abi3-6* como *abi4-1* poseen una menor sensibilidad al ABA que su genotipo salvaje Columbia (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein, 1994). De forma contraria, la respuesta al ABA en de la mutante *era1-2* es mayor que en su control Columbia (Culter *et al.*, 1996).

Como se demuestra en la **Fig. IV 4A**, mientras que *abi4-1*, *era1-2* y Columbia requieren luz para germinar, la germinación de *abi4-1* en fotoequilibrios que establecen Pfr/P de 66 % es significativamente mayor que su control. Por otro lado, la mutante *era1-2* mostró una respuesta menor a la luz que el control. Estos resultados indican que el antagonismo entre el Pfr y ABA aparentemente involucra la acción de los genes *ABI4* y *ERA1*.

Por otro lado, la germinación de semillas *abi3-6* en oscuridad completa fue notablemente mayor que la de Columbia, y las características de la curva de germinación en respuesta a la luz son similares en ambos casos; no hubo diferencias entre la germinación en oscuridad y en luz en el rango de fotoequilibrios de 0.03 a 0.66, mientras que esta fue promovida, con respecto a la oscuridad, en fotoequilibrios de 0.87 **(Fig. IV 4B)**. Estos resultados sugieren que si bien el gen *ABI3* regula la dormición de las semillas (Koornneef *et al.*, 1984), no participaría en la regulación de la acción de los fitocromos en la germinación.

Con el propósito de estudiar con mayor profundidad la relación entre nivel de dormición de semillas y la expresión de *ABI3*, se analizó la actividad del promotor de este gen durante tratamientos de estratificación y de inducción de la germinación tanto por una VLFR como por una LFR de los fitocromos. Para ello se utilizaron semillas transgénicas que contenían el gen reportero GUS bajo el promotor de *ABI3* (Parcy *et al.*, 1994), midiéndose la actividad GUS en dos grupos de semillas; uno llamado 1.1, cuya germinación es promovida por una LFR, y otro denominado 29, cuyo nivel de dormición es relativamente menor, ya que una VLFR estimula la germinación en un 60 % de las semillas **(Fig. IV 5A)**. Estos dos grupos de semillas se obtuvieron a partir de la línea ABI3::GUS original, y el distinto grado de dormición de las semillas fue logrado al someter a los grupos a distintos tiempos de postmaduración.

Independientemente del nivel de dormición inicial de las semillas, la actividad del promotor *ABI3* fue similar en ambos casos, y prácticamente no fue modificada por la incubación de las semillas embebidas en frío. La actividad de este promotor tampoco estuvo relacionada con la inducción de la germinación por una LFR o una VLFR; ya que en ambas líneas no se detectaron diferencias significativas en las mediciones GUS luego del pulso de luz R, RL u oscuridad, y entre semillas que germinaron en comparación con aquellas que no **(Fig. IV 5B-C)**. Estos resultados indican que la actividad del promotor *ABI3*, no está asociada con la promoción de la germinación por una VLFR o una LFR, y están en concordancia con lo observado en la **Fig. IV 4**.

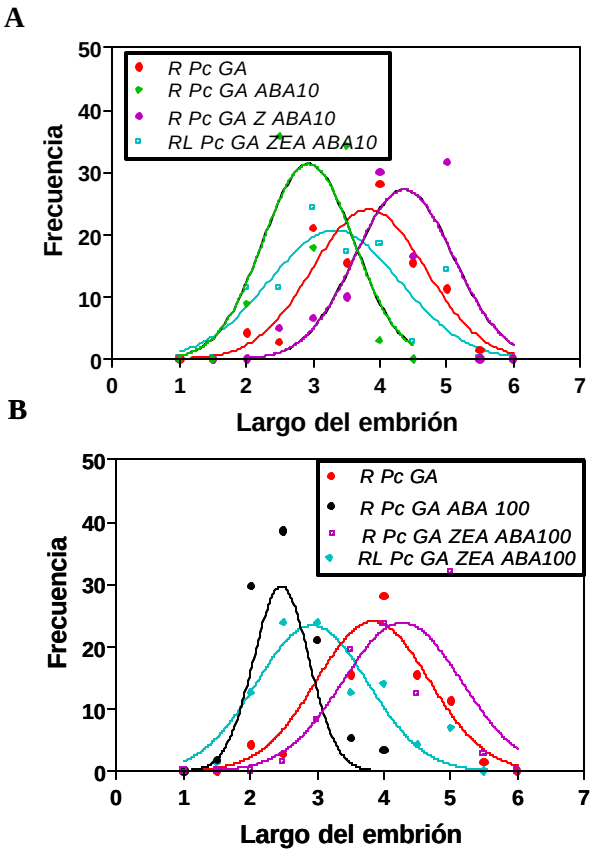


Fig. IV 3. El tratamiento simultaneo de las semillas con zeatina y luz R suprime la inhibición del potencial de crecimiento del embrión por ABA.

(A) y **(B)** Frecuencia de distribución del largo del embrión luego de los distintos tratamientos lumínicos y hormonales. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes, utilizando 25 embriones por muestra. El protocolo experimental es similar al descripto en la Fig. II 4, con la diferencia que los tratamientos hormonales consistieron en incubaciones con paclobutrazol y GA_3 (círculos rojos), paclobutrazol GA_3 y ABA 10 µM (rombos verdes), paclobutrazol GA_3, zeatina y ABA 10 µM (círculos violetas), paclobutrazol GA_3, zeatina y ABA 100 µM (rombos celestes). *Pc*: paclobutrazol 4ppm, *GA*: GA_3 100 µM, *ABA 10*: ácido abscísico 10 µM, *ABA 100*: ácido abscísico 100 µM *ZEA*: zeatina 50µM.

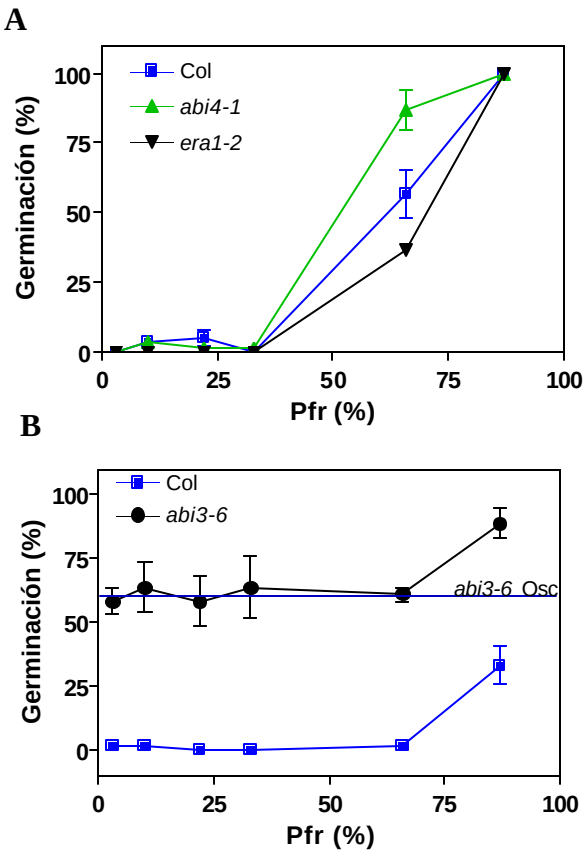


Fig. IV 4. Germinación en respuesta a la luz de mutantes *era1-2*, *abi4-1* y *abi3-6* de *Arabidopsis*. Germinación de mutantes *era1-2* y *abi4-1* **(A)** y *abi3-6* **(B)** en función de porcentajes crecientes de Pfr. Las semillas fueron sembradas sobre agar, irradiadas con RL e incubadas en frío por 48 h. Luego, las semillas recibieron distintos pulsos de luz que establecieron fotoequilibrios de 0.03, 0.1, 0.22, 0.33, 0.66 o 0.87 (Pfr/P) y luego se incubaron en oscuridad a 25 °C por 72 h, momento en que se midió el porcentaje de germinación. Germinación en oscuridad (%): Col: 0, *era 1-2*: 0, *abi4-1*: 0, *abi3-6*: 58, 3 $\pm$ 8.

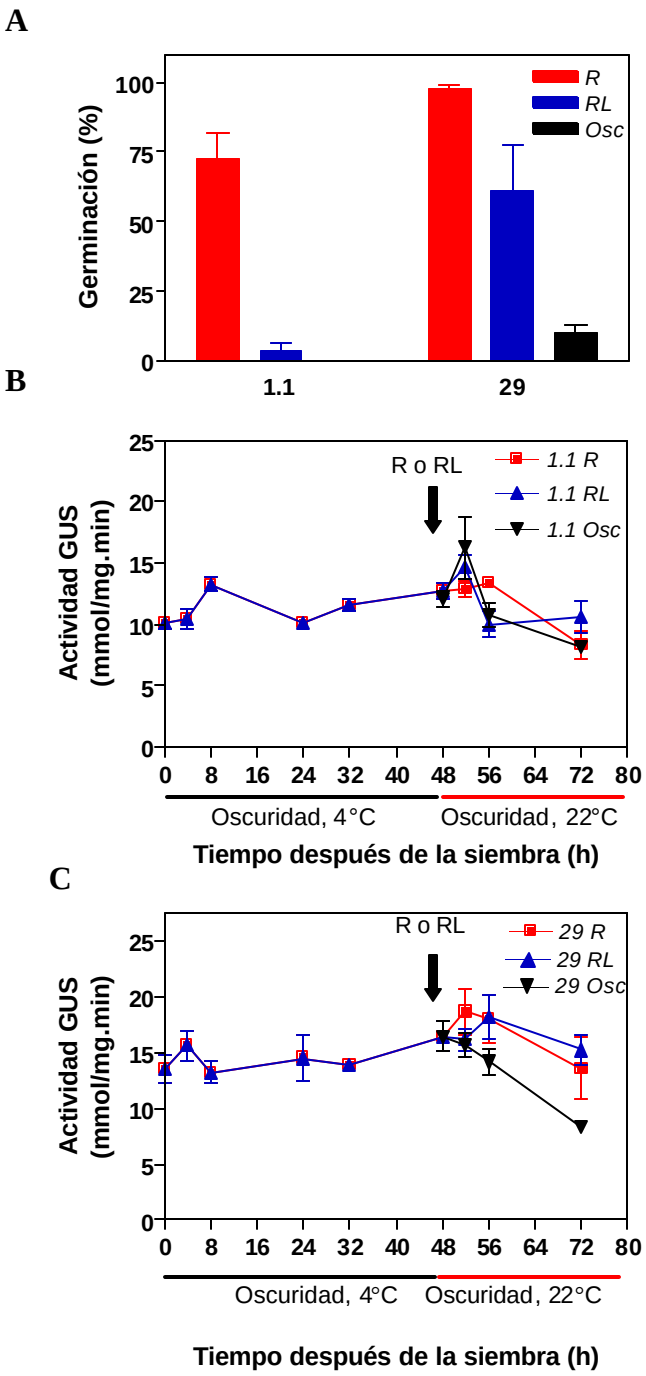


Fig. IV 5. Actividad del promotor *ABI3* en semillas de *Arabidopsis*.

(A) Germinación en respuesta a la luz de dos subpoblaciones de semillas con distinto nivel de dormición. **(B)** y **(C)** actividad del promotor *ABI3* en semillas 1.1 y 29, respectivamente, en función del tiempo de incubación. El gráfico muestra las medias y D.E.M obtenidos a partir de 3 experimentos independientes, con 5 réplicas por tratamiento.

Interacciones entre las vías de señalización del ABA y los fitocromos en la desetiolación

Los resultados obtenidos utilizando semillas de *D. ferox* y *Arabidopsis* indican que existe una interacción negativa entre la acción del ABA y los fitocromos en la germinación, y que esta eventualmente involucraría la acción de *ABI4* y *ERA*, pero no a *ABI3*. Con el propósito de estudiar si esta interacción tiene lugar exclusivamente en relación con la germinación o también alcanza a otros estadios de desarrollo, se analizó la respuesta a la luz en plántulas mutantes de distintos componentes de señalización del ABA en *Arabidopsis*. Para ello, se analizó la inhibición del alargamiento del hipocotilo mediada por una VLFR, LFR y HIR en plántulas mutantes *abi1-1*, *abi3-6*, *abi4-1* y *abi5-1* las cuales poseen la sensibilidad al ABA reducida con respecto a sus genotipos salvajes (Finkelstein *et al.*, 2002). También se analizaron estas respuestas en plántulas *era1-2* la cual posee una mayor respuesta a esta hormona a comparación con su genotipo salvaje Columbia (Culter *et al.*, 1996), y *det3*, una mutante de una subunidad de una protón-ATPasa relacionada con el cierre de estomas y elongación celular (Schumacher *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000).

En comparación con Columbia, la inhibición del alargamiento del hipocotilo y apertura de cotiledones en respuesta a pulsos de RL fue mayor en los mutantes *abi3-6* y *abi4-1*, y menor en *era1*-2. Por otro lado, la mutante *abi5-1* mostró una mayor respuesta a la luz que su control en pulsos de R, mientras que la respuesta de *det3* fue menor. La respuesta a la luz de la mutante *abi1-1* fue similar a su control, bajo todos los tratamientos lumínicos **(Fig. IV 6)**. Estos resultados indican que mientras los genes *ABI3* y *ABI4* modulan la acción del PHYA en la VLFR, los genes *ABI5* y *DET3* están implicados en el control de la acción de los fitocromos que participan en la LFR. Es interesante notar que el efecto de la mutación *era1-2* sobre la respuesta a la luz de las plántulas no fue exclusivamente para un modo de acción particular, sino que alteró todas las respuestas de los fitocromos, inclusive la respuesta a la luz azul, la cual está mediada mayoritariamente por los criptocromos **(Fig. IV 6)**. Estos experimentos demuestran una interacción negativa entre la vía de señalización del ABA y de la luz en plántulas.

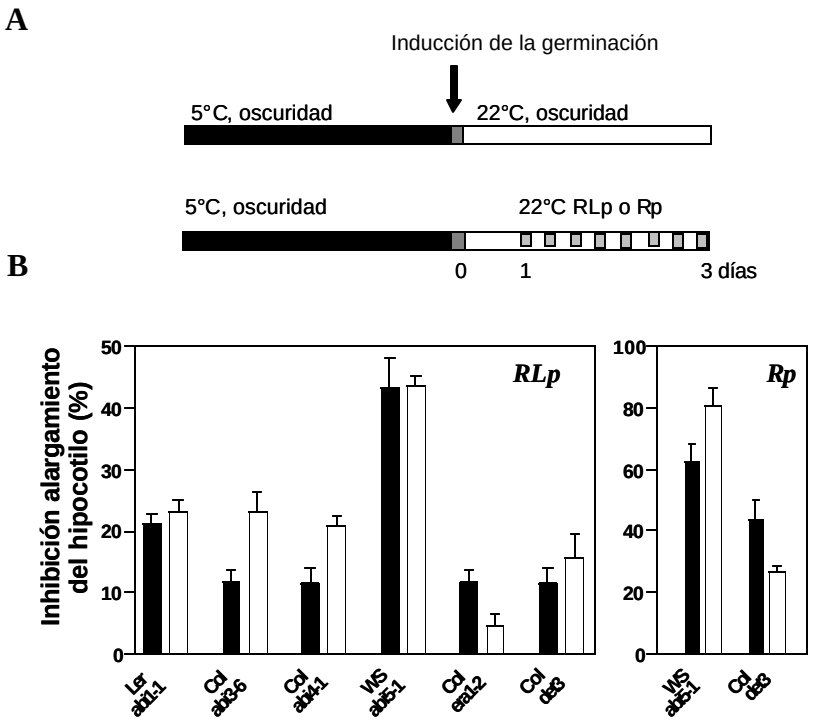


Fig. IV 6. Respuesta a la luz de plántulas con alteraciones en secuencias de componentes reguladores de la respuesta al ABA.

(A) Protocolo experimental. Las semillas fueron incubadas en frío, luego tratadas con un pulso de luz R (inducción de la germinación), e incubadas 24 h en oscuridad a 22°C. Las semillas luego fueron transferidas a una cámara de pulsos horarios de luz R o RL hasta el momento de las mediciones. Los controles fueron mantenidos en oscuridad. **(B)** Porcentaje de inhibición del alargamiento del hipocotilo relativo a los controles mantenidos en oscuridad. Los gráficos muestran las medias y D.E.M obtenidos a partir de 10 réplicas (100 plántulas totales) medidas en tres experimentos independientes. Largo de hipocotilos en oscuridad (mm): Col: 11.150±0.353; *era1-2*: 8,6 ± 0,3; Ler-0: 11.478±0.186; *abi1-1*: 11.284±0.158, Col: 11.150±0.353; *abi4-1*: 10.502±0.756; WS: 1.455 ±0.854; *abi5-1*: 8.752±1.122;C24: 11,1± 0,4, *det3*: 8.056±0.792.

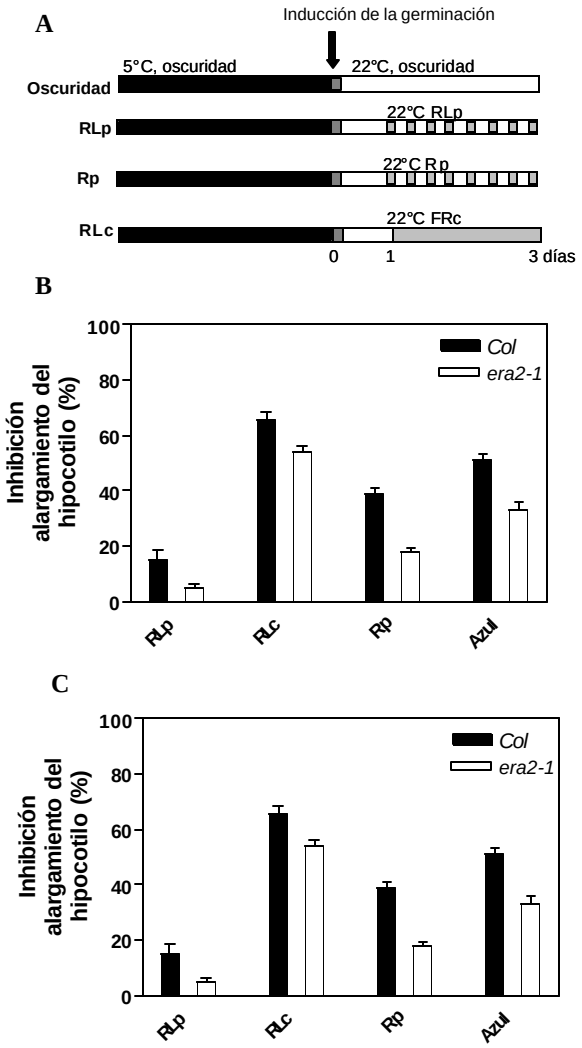


Fig. IV 7. Respuesta a la luz de plántulas del mutante *era1-2*.

(A) Protocolo experimental. Las semillas fueron incubadas en frío, luego tratadas con un pulso de luz R (inducción de la germinación), e incubadas 24 hs en oscuridad a 22°C. Las semillas luego fueron transferidas a una cámara de pulsos horarios de luz R, RL o en luz RLc hasta el momento de las mediciones. Los controles fueron mantenidos en oscuridad hasta el momento de las mediciones. **(B)** Porcentaje de inhibición del alargamiento del hipocotilo relativo a los controles mantenidos en oscuridad. **(C)** Apertura de cotiledones en los distintos tratamientos lumínicos. Los gráficos muestran las medias y D.E.M obtenidos a partir de 10 réplicas (100 plántulas totales) medidas en tres experimentos independientes. Largo de hipocotilos en oscuridad (mm): Col: 11.150 $\pm$ 0.353; *era1-2*: 8,6 ± 0,3.

En conjunto, los resultados demuestran antagonismos entre algunos elementos de la señalización del ABA y la acción de los fitocromos en semillas y plántulas.

La luz, percibida por los fitocromos en las semillas, controla la expresión del gen ABI3 en las plántulas derivadas de estas

En comparación con las plántulas salvajes, las mutantes *phyB* poseen un incremento en la expresión de genes que poseen el dominio RY en sus promotores, el cual es un sitio de unión al factor *ABI3*. Esto es coherente con los resultados descriptos hasta el momento en este capítulo. Estas diferencias son detectadas aún cuando las plántulas se desarrollaron en oscuridad completa. Se ha observado que la pérdida de función de PHYB, o el establecimiento de bajos niveles de Pfr en las semillas salvajes, promueven la expresión de genes de proteínas de reserva y LEAs, las cuales serían reguladas positivamente por *ABI3* **(Fig. IV 8)**. Entonces, el establecimiento de bajos niveles de fitocromo activo en las semillas, promovería la acción de *ABI3* en las plántulas.

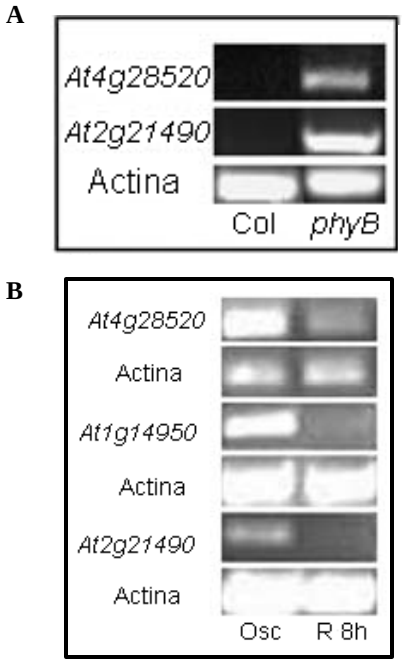


Fig. IV 8. El ambiente lumínico experimentado por las semillas a través de PHYB modula la expresión de genes en las plántulas derivadas de estas.
(A) Luego de ser incubadas en frío, las semillas Columbia y *phyB* fueron tratadas con 8 h de luz R, y luego mantenidas en oscuridad completa por 3 días, momento en que las plántulas se cosecharon para determinar los niveles relativos de los mensajeros de actina y de los genes de una proteína de reserva y una dehidrina, *At4g28520* y *At2g21490*, respectivamente **(B)** Luego de ser incubadas en frío, las semillas fueron transferidas a 8h de luz R o a oscuridad completa, las plántulas fueron cosechadas 3 días después para la determinación de los niveles relativos de mensajeros de actina y de los genes: *At4g28520* (proteína de reserva), *At1g14950* (proteína latex) y *At2g21490* (dehidrina). Las extracciones de RNA y análisis de RT-PCR fueron realizados por la Dra. Agustina Mazzella (INGEBI-UBA)

Entonces, se exploró la influencia de la percepción de la luz por la semilla sobre la regulación de la expresión de *ABI3* y de la respuesta a la luz de las plántulas originadas a partir de estas semillas. Para este propósito, se utilizaron semillas transgénicas ABI3::GUS (Parcy *et al.*, 1994), y se midió la actividad del promotor *ABI3* en plántulas de 4 días, provenientes de semillas que germinaron después de ser expuestas por 8 h en luz R o que fueron mantenidas en oscuridad **(Fig. IV 9A)**.

Los resultados demuestran que las plántulas provenientes de semillas que fueron expuestas a la luz R poseen una actividad del promotor *ABI3* significativamente menor a las que germinaron en completa oscuridad **(Fig. IV 9B)**. La localización de la expresión del promotor *ABI3* en plántulas provenientes de semillas que germinaron en absoluta oscuridad se centra en la base de los cotiledones y parte superior del hipocotilo **(Fig. III 9C)**. Con el propósito de investigar en mayor detalle la expresión del promotor *ABI3* en plántulas, se estudió su cinética y localización utilizando el protocolo descripto en la Fig. **III 10A**.

Un día después de los tratamientos lumínicos, no se observaron diferencias en la tinción GUS entre los tratamientos de luz y oscuridad dados a las semillas, siendo esta intensa en los cotiledones de todas las plántulas. Al segundo día, sólo el 8% de las plántulas derivadas de semillas irradiadas con luz R retuvieron la tinción en los cotiledones, mientras que la tinción GUS fue observada en un 86% de las plántulas derivadas de las semillas mantenidas en total oscuridad ($P < 10^{-15}$). Por otro lado, independientemente del tratamiento lumínico que recibieron las semillas, la tinción GUS no fue visible en las plántulas cuando estas fueron mantenidas por 3 días en oscuridad, y reapareció al cuarto día en un 73 % de las plántulas originadas de semillas mantenidas en oscuridad, y sólo en un 22 % de las plántulas derivadas de semillas tratadas con luz R ($P < 10^{-11}$) **(Fig. III 10)**. Estos resultados demuestran que el ambiente lumínico percibido por la semilla regula la actividad del promotor *ABI3* en plántulas.

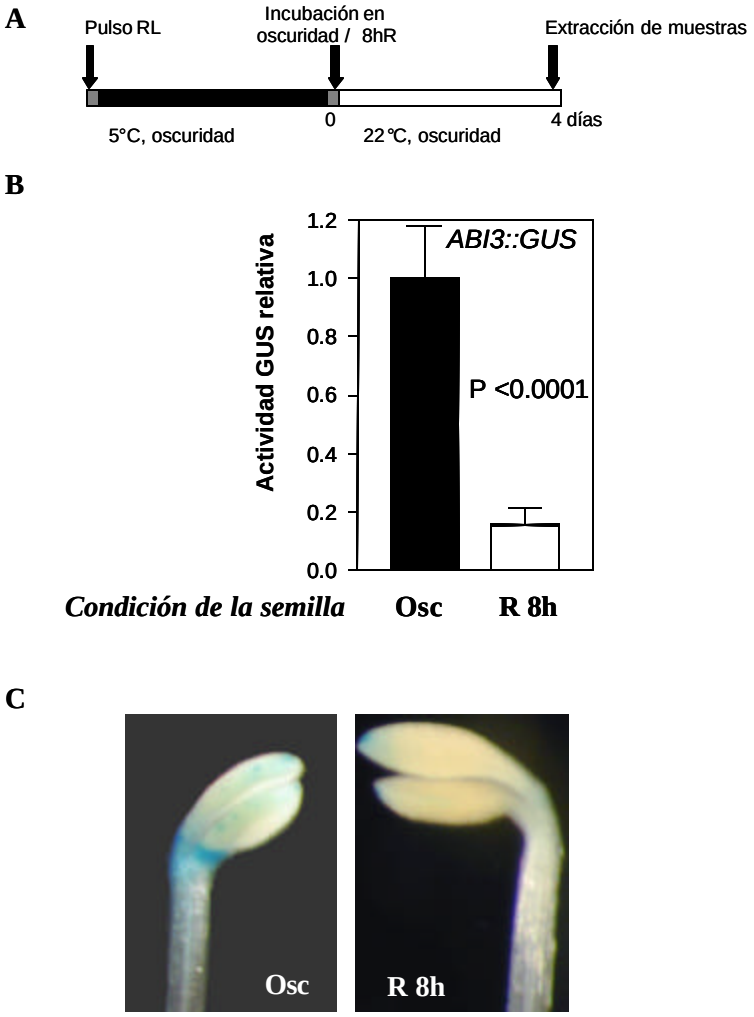


Fig. IV 9. Expresión de *ABI3* en plántulas derivadas de semillas maduras, tratadas con 8 h de R o mantenidas en completa oscuridad.

(A) Las semillas fueron incubadas en frío, y luego tratadas por 8 h con luz R o mantenidas en completa oscuridad. A continuación las semillas fueron incubadas en oscuridad por 4 días, momento en que se extrajeron muestras para las mediciones de actividad GUS **(B)** o su detección por tinción histoquímica **(C)**. Las medias y desvíos estándar en **(B)** corresponden a los valores de actividad GUS detectados en 3 experimentos independientes, conteniendo 10 réplicas por tratamiento. **(C)** Fotografías representativas de la localización de la actividad GUS en plántulas (aumento 60 X).

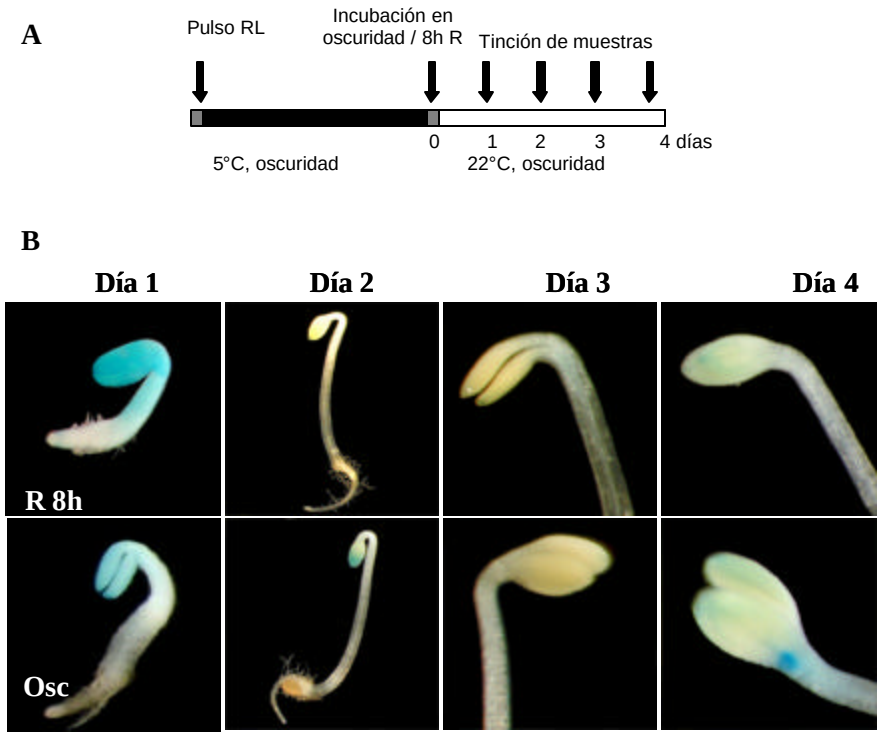


Fig. IV 10. Cinética de la actividad del promotor *ABI3* en plántulas.
(A) Las semillas fueron incubadas en frío, luego expuestas a 8 h de luz R o mantenidas en oscuridad (inducción de la germinación) e incubadas a 22°C hasta el momento de las tinciones. **(B)** Localización de la actividad GUS. Las fotografías muestran un individuo representativo de cada tratamiento (aumento: 15 X en día 2 o 60 X).

La respuesta que controla la actividad del promotor ABI3 en plántulas es del tipo LFR, y su intensidad es dependiente del tiempo de exposición de la semilla a la luz R

Con el propósito de estudiar las características de la señal lumínica que modula la expresión de *ABI3* en plántulas, las semillas fueron sometidas por 8 h a los siguientes tratamientos: (1) pulsos horarios de 3 min de luz R seguidos por 15 min de luz RL, (2) pulsos horarios de 18 min de luz RL (3) Pulsos horarios de 3 min de luz R y (4) Oscuridad. Luego, las semillas fueron incubadas en oscuridad a 22 °C por 48 h, momento en que se realizaron las tinciones histoquímicas.

Como se observa en la **Fig. III 11A-B**, el tratamiento de las semillas durante 8 h con pulsos horarios de luz R redujo significativamente la tinción en las plántulas de dos días desarrolladas en oscuridad completa, y este efecto fue revertido cuando los pulsos de luz R

fueron seguidos por luz RL, mostrando una típica respuesta LFR de los fitocromos. Por otro lado, la exposición de las semillas a pulsos horarios de luz RL tuvo efectos pequeños pero significativos sobre la actividad del promotor *ABI3*, en comparación con los tratamientos en oscuridad. Este resultado también fue observado en los experimentos de microarreglos mencionados en la introducción y descriptos en Mazzella et al., (2005), indicando una contribución de la forma activa del fitocromo A establecida en las semillas en la modulación de la expresión de *ABI3* en plántulas. Asimismo, el porcentaje de plántulas con tinción GUS al segundo día disminuyó conforme aumentó la duración del tratamiento de las semillas con luz R **(Fig. III 11C)**.

Estos resultados indican que la actividad del promotor *ABI3* en la plántula es controlada, a través de una LFR, por la luz percibida por la semilla que la origina.

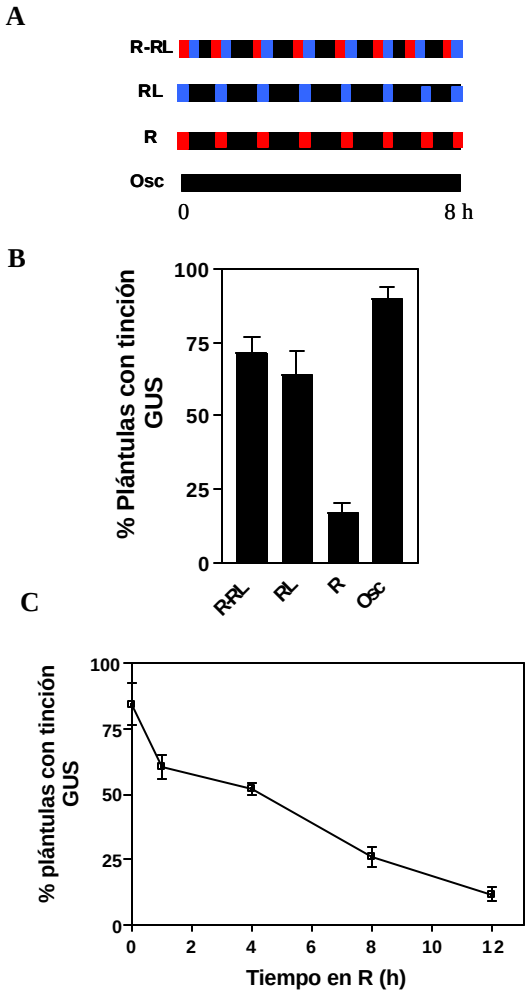


Fig. IV 11. La actividad del promotor *ABI3* en plántulas está modulada por la luz percibida por las semillas a través de una LFR de los fitocromos.

(A) Protocolo experimental. Luego de la incubación en frío, las semillas fueron tratadas por 8 h con: pulsos horarios de 3 min de luz R seguidos por 15 min de luz RL (tratamiento R-RL), pulsos horarios de 18 min de RL (tratamiento RL), pulsos horarios de 3 min de luz R (tratamiento R) o mantenidas en oscuridad (tratamiento Osc). Las semillas se transfirieron a oscuridad, a 25°C **(B)** Porcentaje de plántulas que mostraron tinción GUS dos días después de la inducción de la germinación. **(C)** Porcentaje de plántulas con tinción GUS, en función del tiempo de exposición de las semillas a luz R. Las tinciones se realizaron en plántulas de dos días, y los gráficos muestran la media y D.E.M. de tres experimentos independientes.

La señal proveniente de las semillas que controla la expresión de ABI3 en plántulas no es la forma activa del fitocromo

Como se muestra en las **Fig. IV 9-11**, la luz R percibida por las semillas modifica, mediante una LFR, la expresión del gen *ABI3* en plántulas. Si la señal que se transmite de la semilla a la plántula fuera la forma activa de los fitocromos, un pulso de luz RL luego de la germinación debería anular el efecto inhibitorio de la luz R sobre la expresión de *ABI3* en las plántulas.

Como se observó anteriormente, el tratamiento por 8 h de las semillas con luz R disminuyó dramáticamente la actividad del promotor *ABI3* en plántulas de dos días, en comparación con aquellas provenientes de semillas mantenidas en oscuridad **(Fig. IV 10-11)**. Mientras que la inmediata aplicación de un pulso de luz RL a las semillas tratadas con R revirtió el efecto de las 8 h de luz sobre la expresión de *ABI3*, el RL no tuvo un efecto significativo cuando fue aplicado 16 h después de la luz R **(Fig. IV 12)**. Esta pérdida de reversibilidad por RL fue también observada en la medición de actividad GUS al cuarto día luego de la inducción de la germinación **(Fig. 12 IV C)**. En conjunto, estos resultados indican que el efecto de la luz R se escapa de la reversibilidad por RL durante las primeras 16 h de incubación, y que la señal que se transmite de la semilla a la plántula implicada en la regulación de la expresión de *ABI3* no es la forma activa de los fitocromos.

La respuesta a la luz de las plántulas está inversamente asociada a la intensidad de expresión de ABI3

Teniendo en cuenta que la pérdida de función de *ABI3* promueve la respuesta de las plántulas a RLp **(Fig. IV 6)** se investigó en mayor detalle el efecto de *ABI3* sobre las respuestas VLFR de las plántulas. Para ello, se estudió la inhibición del crecimiento del hipocotilo y la expansión de cotiledones mediada por luz en dos líneas transgénicas sobreexpresantes de *ABI3*, denominadas ABI3-OX4 y ABI3-OX6 (Parcy *et al.*, 1994). Para evaluar la respuesta a la luz de estas líneas, las semillas se expusieron sólo 15 min a luz R con el fin de promover su germinación, sin reprimir dramáticamente la expresión de *ABI3* en las plántulas debido a tratamientos prolongados de las semillas con luz R **(Fig. IV 11C)**. En estas condiciones experimentales, los mutantes *abi3-6* mostraron una mayor respuesta a los pulsos de RL para la inhibición de la elongación del hipocotilo y la apertura de los cotiledones. Asimismo, la

sobreexpresión de *ABI3* en las líneas ABI3-OX4 y ABI3-OX6 estuvo asociada a una menor respuesta a los pulsos de luz RL a comparación de C24 **(Fig. IV 11)**. Por otro lado, la respuesta a los pulsos de luz R o a tratamientos con luz RLc de *abi3-6* y las líneas ABI3-OX fue similar a la de sus genotipos salvajes (datos no mostrados). Debido a que los pulsos de RL median específicamente la activación del fitocromo A en la plántula (Yanovsky *et al.*, 1997), los resultados aquí descriptos sugieren que, en la plántula, el gen *ABI3* interacciona específicamente con la vía de acción del fitocromo A.

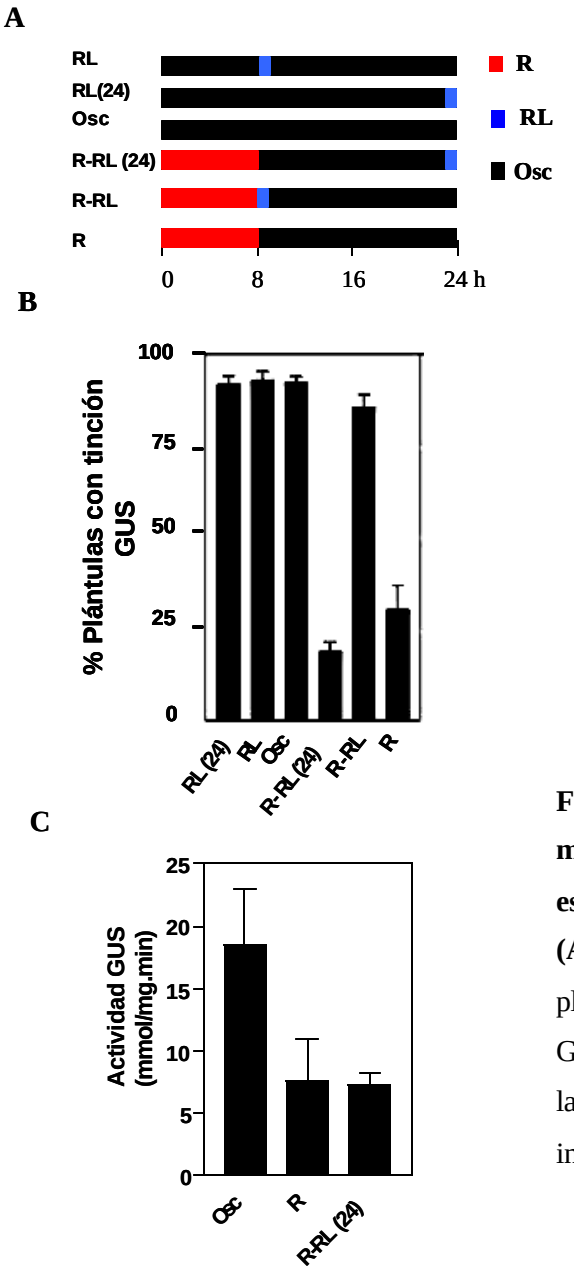


Fig. IV 12. La señal originada en la semilla que modula la expresión de *ABI3* en la plántula no es la forma activa de los fitocromos.
(A) Protocolo experimental. **(B)** Porcentaje de plántulas de 2 d con tinción GUS. **(C)** Actividad GUS en plántulas de 4 días. Los gráficos muestran la media y D.E.M. de al menos tres experimentos independientes.

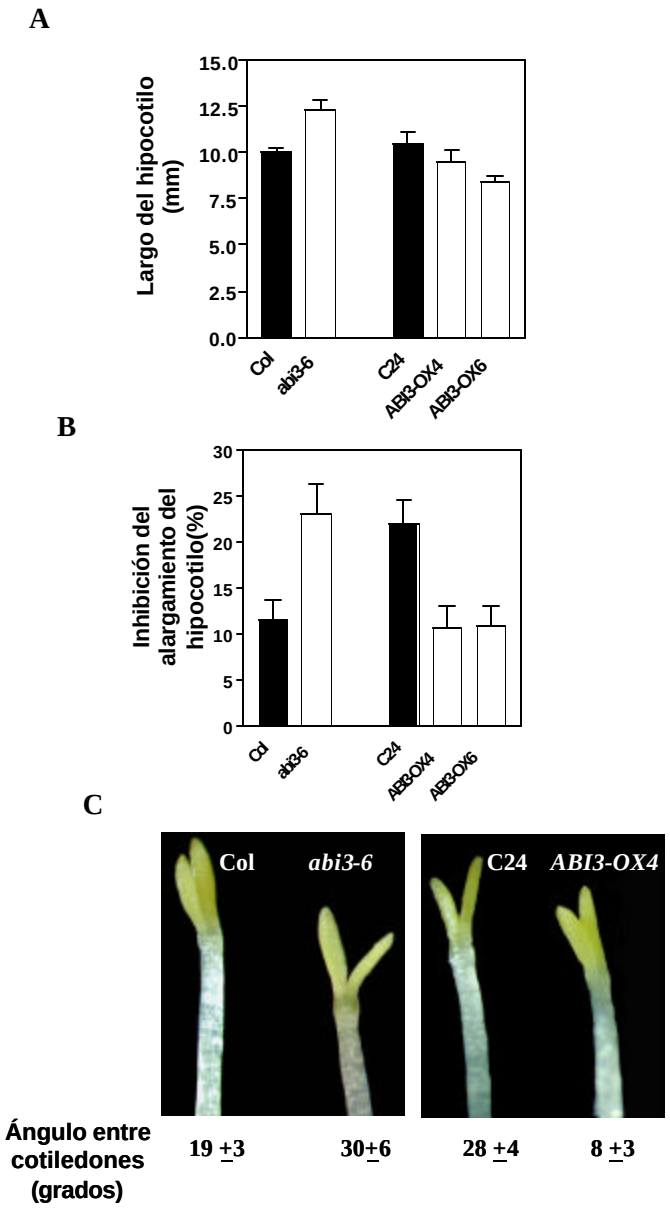


Fig. IV 13. Respuesta a pulsos de luz RL de plántulas con alteraciones en la expresión del gen *ABI3*.

(A) Largo del hipocotilo de plántulas desarrolladas en completa oscuridad. **(B)** Inhibición del alargamiento del hipocotilo y **(C)** ángulo entre cotiledones en la línea mutante *abi3-6* y dos líneas sobreexpresantes: *ABI3-OX4* y *ABI3-OX6*, en respuesta a pulsos horarios de luz RL. El protocolo experimental es similar al de la Fig. IV 6. Los gráficos muestran las medias y D.E.M obtenidos a partir de 10 réplicas (100 plántulas totales) medidas en tres experimentos independientes.

El ambiente lumínico percibido por la semilla modula las respuestas a la luz de las plántulas

La forma activa de los fitocromos de las semillas afecta la expresión de *ABI3* en plántulas **(Fig. IV 9-12)** y *ABI3* modula la respuesta a la luz de las plántulas **(Fig. IV6 y IV 13)**. Estos resultados sugieren que el ambiente lumínico experimentado por las semillas podría afectar, mediante cambios en la expresión de *ABI3*, la respuesta mediada por los fitocromos en plántulas. Con el propósito de investigar esta hipótesis, las semillas Columbia, *abi3-6*, C24 y sobreexpresantes ABI3-OX4 se expusieron a 8 h de luz R o se mantuvieron en oscuridad, y 16 h después se transfirieron a pulsos horarios de luz RL, evaluándose al final del tercer día la inhibición del alargamiento del hipocotilo **(Fig. IV 14A)**. Las plántulas Columbia provenientes de semillas tratadas con luz R mostraron una mayor respuesta a la inhibición del largo del hipocotilo por pulsos de RL que aquellas provenientes de semillas mantenidas en oscuridad **(Fig. IV 14B)**. Por otro lado, las plántulas *abi3-6* mostraron una mayor respuesta a la luz que Columbia cuando ambas líneas germinaron en oscuridad, y esta respuesta no fue estimulada por la exposición de las semillas a 8 h de luz R **(Fig. IV 14B)**. Asimismo, las mutantes dobles *phyA/abi3-6* no mostraron respuesta a los pulsos de RL, indicando una relación epistática entre el PHYA y *ABI3*, donde *ABI3* modula la respuesta a la luz por la misma vía que el fitocromo A, pero aguas debajo de este gen. Por otro lado, las plántulas ABI3-OX derivadas de semillas tratadas con luz R mostraron una mayor respuesta a la luz que aquellas provenientes de semillas mantenidas en total oscuridad **(Fig. IV 14B)**. Esto último sugiere que la luz podría estar actuando en la degradación de *ABI3*, o que pueden existir otros puntos de control en el proceso, mediados otros componentes distintos a *ABI3*.

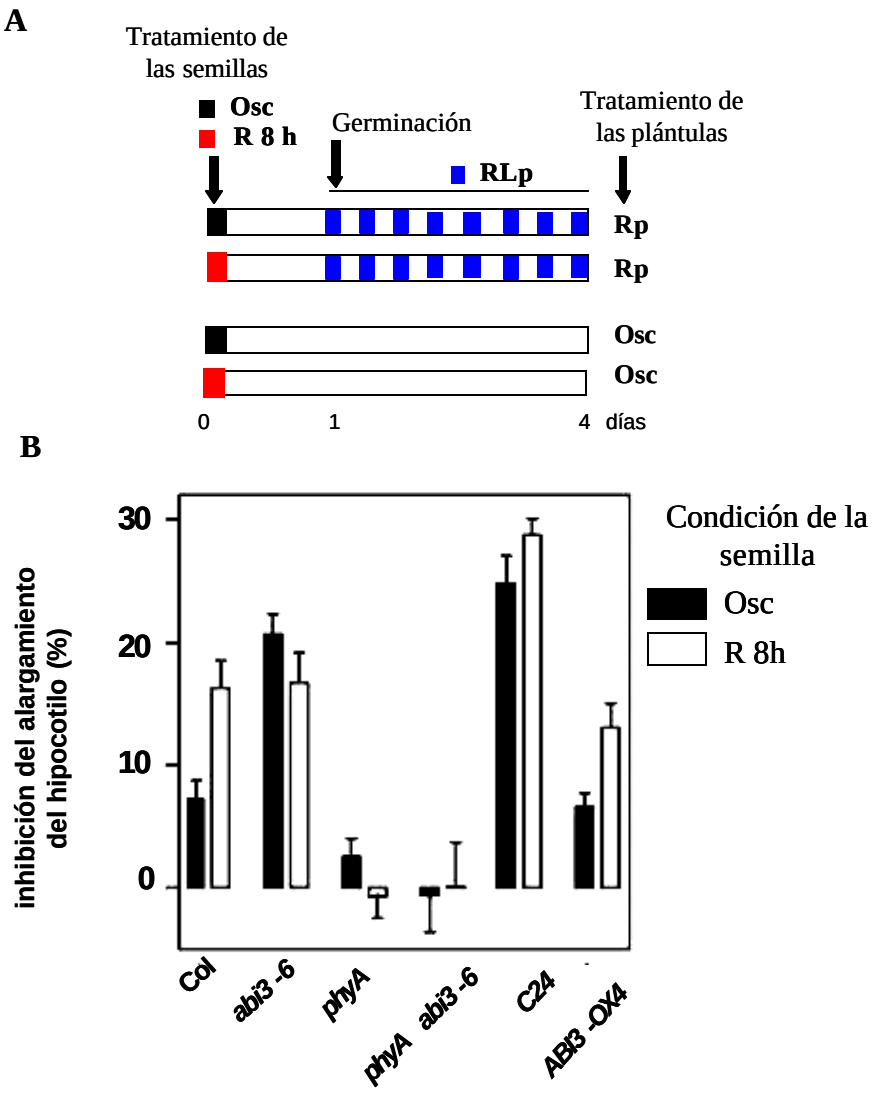


Fig. IV 14. El ambiente lumínico percibido por las semillas afecta las respuestas mediadas por los fitocromos en las plántulas derivadas de estas.

(A) Protocolo experimental. Luego de la incubación en frío, las semillas fueron tratadas por 8 h con luz R o mantenidas en oscuridad. Las semillas fueron mantenidas luego por 16 h en oscuridad a 25 °C. Una vez finalizado este lapso, las semillas se transfirieron a pulsos horarios de luz RL, o se mantuvieron en completa oscuridad (control). **(B)** Inhibición del alargamiento del hipocotilo por pulsos de luz RL. Los gráficos muestran las medias y D.E.M. obtenidos a partir de 10 réplicas (100 plántulas totales) medidas en tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

Relaciones entre el ABA y la promoción de la germinación por los fitocromos

El ABA bloquea la promoción de la germinación por los fitocromos en *D. ferox*, principalmente a través de la inhibición del potencial de crecimiento del embrión (de Miguel *et al.*, 1999). El efecto inhibitorio del ABA en la germinación es revertido significativamente cuando las semillas son incubadas con zeatina **(Fig. IV 1)**. En este caso, la reversión por zeatina fue parcial, y esto puede deberse a que tal vez la zeatina no sea la citocinina endógena involucrada en esta reversión. Por otro lado, la incubación sólo con zeatina no influyó la respuesta a la luz de las semillas cuando el ABA no estuvo presente en el medio **(Fig. III 1)**, indicando que las citocininas, en este caso, ejercen un efecto vinculado con la reversión de la inhibición por ABA de la germinación. El antagonismo ABA-citocininas en la germinación ha sido documentado en distintas especies. Por ejemplo, en semillas de lechuga, cebada, *Xanthium* y *Acer*, la inhibición de la germinación por ABA es revertida por la aplicación de una u otra citocinina; como ser cinetina, benciladenina o zeatina (Khan, 1967; Khan, 1968; Khan y Downing, 1968; Webb y Wareing, 1972). Por otro lado, en semillas fotoblásticas de lechuga, las giberelinas promueven la germinación en oscuridad, y esta promoción es revertida por ABA. El aumento de la concentración de las giberelinas en el medio no contrarresta la acción del ABA, sin embargo, esta puede ser revertida por la incubación con cinetina (Khan, 1968).

En *Datura ferox*, el estímulo del potencial de crecimiento por luz R requiere de la biosíntesis de giberelinas **(Fig. II 4)**, y los fitocromos, a través de una LFR, estimulan la respuesta al GA en el embrión **(Fig. II 5)**. Los resultados expuestos en esta tesis aportan fuertes evidencias que la inhibición del estímulo de la germinación por ABA está asociada con una disminución de la respuesta al GA de las células del embrión **(Fig. IV 1-2)**. Es probable entonces que el ABA inhiba la promoción del potencial de crecimiento en luz R principalmente afectando la sensibilidad a las giberelinas de las células del embrión, sin afectar en gran medida los contenidos de giberelinas, y que la respuesta a las giberelinas de las células del embrión sea el punto donde el antagonismo ABA-citocininas tiene lugar. Esta propuesta tiene un fuerte apoyo experimental, ya que 1) la aplicación de ABA no afecta el nivel de los transcriptos de enzimas de la biosíntesis de giberelinas, indicando que el ABA no afecta la síntesis de giberelinas en el embrión (Burgin, 2001). 2) La aplicación de ABA tampoco inhibe la movilización de mananos

en el endosperma micropilar, un procesos dependiente de las giberelinas (Sánchez y de Miguel, 1997; Sánchez y Mella, 2004), por lo que el ABA tampoco promovería la inactivación de las giberelinas de las semillas. 3) La zeatina, estimula las respuestas al GA de las células del embrión **(Fig. II 5)** y revierte la acción inhibitoria del ABA sobre el estímulo del potencial de crecimiento y la germinación, en luz R **(Fig. IV 3)**. La interacción ABA-giberelinas fue demostrada a nivel molecular en cereales, donde la proteína *PKABA*, una kinasa que es inducida por ABA, estimula la degradación de *GAMYB* en la aleurona, bloqueando la promoción de la actividad a-amilasa por giberelinas (Cadenas *et al.*, 2001).

Estos resultados ponen en evidencia la existencia de relaciones entre las citocininas, GAs, ABA y fitocromos no descriptas hasta el momento, generando nuevas preguntas sobre estos procesos, por ejemplo, ¿la disminución de la respuesta a las giberelinas en el embrión estará mediada por un efecto del ABA en los contenidos de citocininas en estas células? O ¿el estímulo del potencial de crecimiento mediado por una LFR involucrará la degradación del ABA en el embrión?. El abordaje tanto fisiológico como molecular de estas cuestiones aportará importantes avances en la interacción entre el ABA, giberelinas citocininas y luz en la germinación.

En forma general, la acción del ABA en la regulación de la dormición de las semillas puede involucrar cambios en su biosíntesis, catabolismo, transporte o respuesta de los tejidos a esta hormona. Si bien aún falta mucho por conocer sobre los genes que participan en la degradación y transporte del ABA, han ocurrido importantes avances en el aislamiento y caracterización de genes involucrados en su biosíntesis y señalización, los cuales abrieron un nuevo campo de investigación en la fisiología de semillas (Nambara y Marion-Poll, 2003). Por ejemplo, se ha detectado que varios mutantes de *Arabidopsis* con alteraciones en la respuesta al ABA poseen también alteraciones en otros sistemas de señalización, por ejemplo en aquellos involucrados en la percepción de etileno y azúcares (Leung y Giraudat, 1998; Gazzarinin y McCourt, 2001; Finkelstein y Gibson, 2002). Estos hallazgos abren la posibilidad de estudiar las interacciones entre diferentes rutas de señalización involucradas en el desarrollo de las plantas.

La pérdida de función de los genes *ABI3* y *ABI4*, los cuales regulan positivamente la respuesta al ABA, confieren a las semillas *abi3-6* y *abi4-1* la capacidad de germinar a concentraciones de ABA que inhiben la germinación de las semillas salvajes (Finkelstein, 1994; Nambara *et al.*, 1994), mientras que la pérdida de función del alelo *ERA1*, una farnesiltransferasa que regula negativamente la señalización de ABA, otorga a las semillas *era1-2*, una mayor

sensibilidad al ABA en la germinación, a comparación del genotipo salvaje (Culter *et al.*, 1996) . Tanto las mutantes *abi4-1* como *era1-2* requieren luz para germinar, sin embargo, mientras que la sensibilidad a la luz de *abi4-1* es mayor que la de su control Columbia, la respuesta a la luz de *era1-2* es menor **(Fig. IV 4A)**. Estos resultados constituyen la primera evidencia de una interacción entre *ABI4*, *ERA1* y los fitocromos en las semillas. En forma contraria con lo observado para *ABI4* y *ERA1*, la respuesta a la luz para la germinación del mutante *abi3-6* es similar a la de su control **(Fig. IV 4B)**, indicando que *ABI3* no modula, al menos en forma evidente, la acción de los fitocromos en la germinación. Esto está apoyado por el hecho que no se observan cambios en la actividad del promotor *ABI3* en la inducción de la germinación por una VLFR o una LFR. En estos casos, la actividad del promotor fue similar en semillas tratadas con luz R, RL u oscuridad, independientemente que ocurra germinación **(Fig. IV 5)**.

Estudios recientes en tomate y *Arabidopsis* demostraron que la acumulación de transcriptos de *ABI3* en semillas no está relacionada con la promoción de la germinación (Bassel *et al.*, 2006), apoyando los resultados aquí descriptos. La acumulación de mensajeros de *ABI3* en semillas tampoco está asociada al nivel de dormición primaria (Baumbusch *et al.*, 2004). Sin embargo, es posible que la regulación de la germinación esté asociada directamente con cambios en los niveles de proteínas *ABI3*, y no con la acumulación de transcriptos. En este sentido, en *Arabidopsis*, la proteína *ABI3-interacting protein* (*AIP2*) media la poliubiquitinación de *ABI3*, sugiriendo que la abundancia de esta proteína estaría regulada por el proteasoma (Zhang *et al.*, 2005). Los autores aportan fuertes evidencias que *AIP2* regula negativamente la señalización por ABA y dormición de semillas a través de la destrucción post-transduccional de *ABI3*. Los estudios fisiológicos aquí presentados indican que la promoción de la germinación por los fitocromos no involucra mayoritariamente la acción de *ABI3* **(Fig. III IV 4)**, y, en este caso, los valores que reflejan la actividad de su promotor están en concordancia con este resultado.

Es interesante notar que si bien la respuesta a la luz en la germinación de *abi3-6* es similar a la de su control, la germinación en oscuridad de las mutantes es significativamente mayor **(Fig. IV 4B)**. Esto sugiere que este gen estaría vinculado con procesos que tienen lugar en las semillas anteriores la inducción de la germinación por luz. Por ejemplo, estos mutantes no requieren de un período de estratificación para germinar (Nambara *et al.*, 1994) y en este sentido, ¿el gen *ABI3* modulará la expresión de proteínas relacionadas con la disminución de la dormición durante la imbibición o estratificación? ¿O la pérdida de dormición de las mutantes *abi3-6* estará relacionada con procesos que tienen lugar durante el desarrollo de la semilla en la planta madre?

La investigación de estas cuestiones aportará relevante información para el entendimiento de las bases genéticas del establecimiento y modulación de la dormición de semillas.

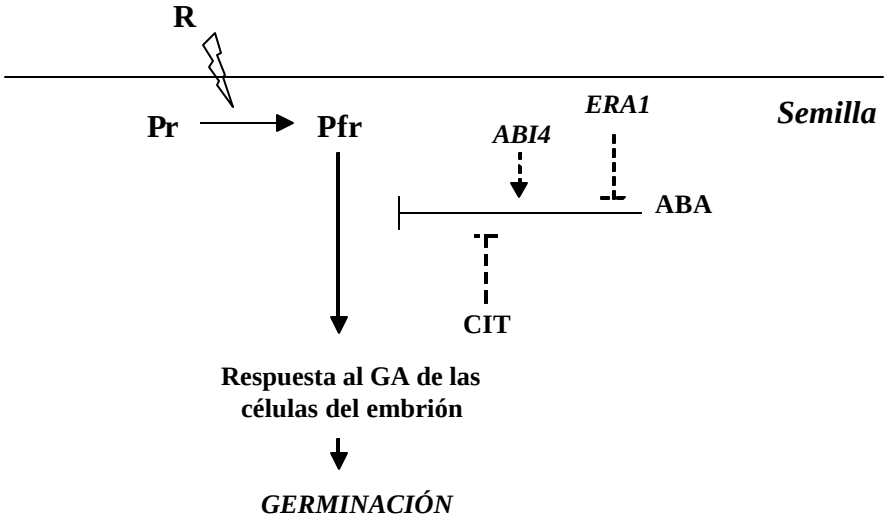


Fig. IV 15. Modelo de trabajo propuesto para la germinación mediada por luz.
Las flechas indican efectos promotores, mientras que las barras indican efectos represivos. Las líneas punteadas indican hipótesis de trabajo que surgen a partir de los datos descriptos. *CIT*: citoquininas.

Relaciones entre componentes de señalización del ABA y las respuestas mediadas por los fitocromos en plántulas

El antagonismo entre componentes de la vía de señalización del ABA y la acción de los fitocromos también fue observada en plántulas **(Fig. IV 6-7)**. Las mutaciones en los genes *ABI3* y *ABI4* afectaron principalmente las respuestas a la luz mediadas por el fitocromo A, a través de una VLFR, mientras que las mutaciones en *ABI5* y *DET3* afectaron las respuestas mediadas por los fotorreceptores involucrados en la LFR **(Fig. IV 6)**, indicando por primera vez la existencia de interacciones específicas entre estos elementos y los fitocromos en plántulas. Por otro lado, la pérdida de función del gen *ERA1* afectó la respuesta a la luz en las plántulas bajo todos los modos de acción de los fitocromos, e inclusive la respuesta a la luz azul, la cual es mediada por los criptocromos **(Fig. IV 7)**. El rol de *ERA1* ha sido demostrado en la señalización del ABA tanto para la activación de canales aniónicos de estomas, como en la germinación (Culter *et al.*, 1996; Pei *et al.*, 1998), indicando que esta proteína es un componente común de la señalización del ABA en distintos tipos celulares. Sin embargo, el estudio detallado de las mutantes *era1-2* revela

numerosas anormalidades en su desarrollo, que pueden ser explicadas sólo parcialmente por su fenotipo hipersensible al ABA. Por ejemplo, se ha demostrado que la acción del gen *ERA1* es indispensable para la correcta función de proteínas que regulan el tamaño y diferenciación de meristemas (Yalovsky *et al.*, 2000). El hecho que la mutación en *ERA1* afecte la respuesta a la luz de las plántulas bajo todos los modos de acción de los fitocromos e inclusive la de los criptocromos **(Fig. IV 7)**, y que este gen esté involucrado en procesos del crecimiento y desarrollo que aparentemente no estarían regulados por el ABA (Yalovsky *et al.*, 2000), genera al menos dos hipótesis distintas para la modulación de la respuesta a la luz por *ERA1*. Por un lado, *ERA1* podría actuar en la señalización del ABA, río arriba de los componentes *ABI3*, *ABI4* y *ABI5*, entre otros, y entonces su mutación afectaría las respuestas a la luz controladas por todos estos componentes de señalización. En este sentido, Finkelstein *et al.*, (2002) propone que *ERA1* actuaría junto con *ABI1* y *ABI2* en las etapas tempranas de la señalización del ABA en semillas, río arriba de la acción de *ABI3*, *ABI4* y *ABI5* **(Fig. I 11)**. Es posible que esta arquitectura de la ruta de señalización del ABA esté conservada en otros estadios de desarrollo, como ser en las plántulas. La segunda posibilidad implica que en el proceso de des-etiolación, la actividad de algún componente común en la vía de señalización de los distintos fotorreceptores esté directamente modulada por *ERA1*, a través de su farnesilación. Sobre esta segunda propuesta, no hay antecedentes bibliográficos. El modelo para la interacción entre componentes de la señalización del ABA y la acción de los fitocromos en plantas se resume en la **Fig. IV 16**.

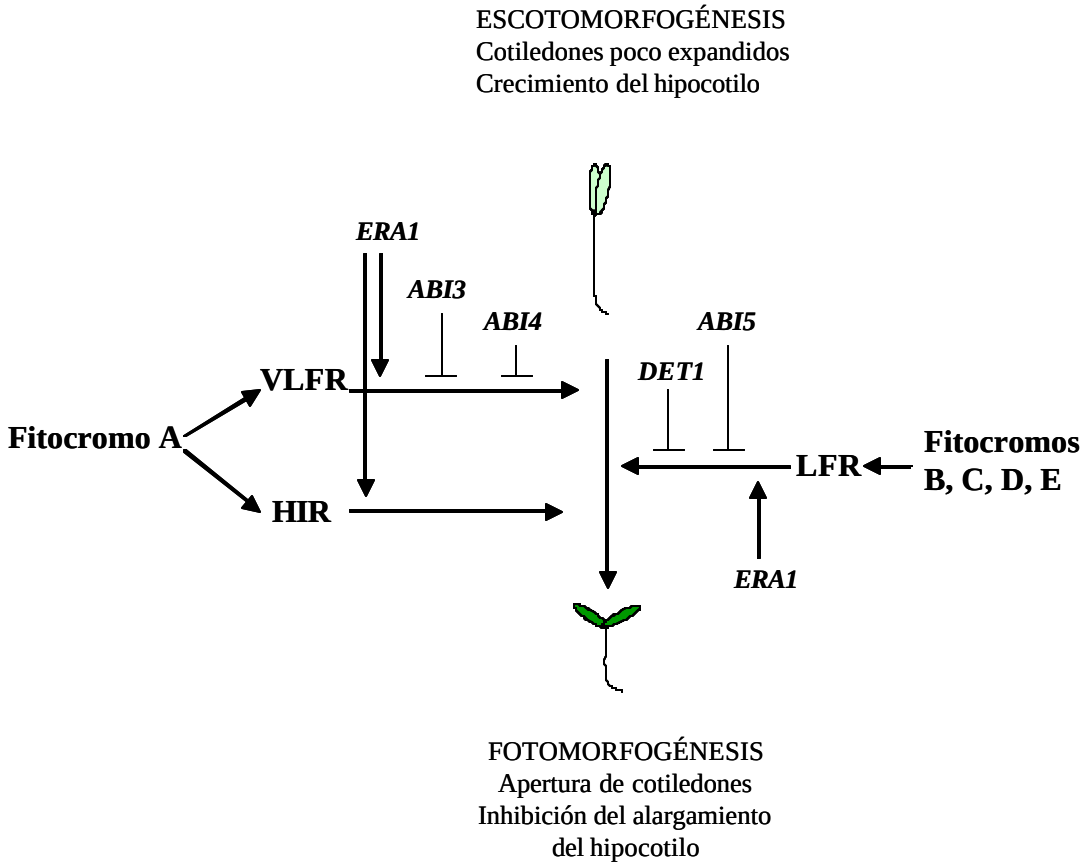


Fig. IV 16. Modelo propuesto para las interacciones entre componentes de la señalización del ABA y la acción de los fitocromos en la des-etiolación.

Las flechas indican efectos promotores, mientras que las barras indican efectos represivos.

El hallazgo que en *Arabidopsis*, la expresión de un número importante de genes potencialmente regulados por *ABI3* está fuertemente promovida en plántulas *phyB* desarrolladas en completa oscuridad (Mazzella *et al.*, 2005) refuerza la observación de la existencia de un antagonismo entre componentes de la señalización del ABA y la acción de los fitocromos recientemente mencionada. Además, da origen a la hipótesis que la expresión de genes relacionados con la acción del ABA en plántulas estaría mediada por la percepción del ambiente lumínico, a través del PHYB, en estadios de desarrollo anteriores, por ejemplo, durante la formación de la semilla en la planta madre o la exposición a la luz de las semillas embebidas.

Una LFR de los fitocromos presentes en las semillas disminuye sustancialmente la expresión de *ABI3* en plántulas mantenidas en oscuridad **(Fig. IV 9-12)**. La LFR percibida por la semilla regula la expresión de *ABI3* en las plántulas derivadas de estas **(Fig. IV 10-12),** y la localización de la expresión de *ABI3* es coincidente con lo observado por Rohde *et al.*, (1999). El tratamiento de las semillas con luz R impide la acumulación de mensajeros de *ABI3* en plántulas salvajes, pero este efecto no es observado en los mutantes *phyB* (Mazzella *et al.*, 2005). Entonces, los cambios en la expresión de *ABI3* en las plántulas estarían mediados por la percepción de luz R en la semilla a través del PHYB. Se ha comprobado que el tratamiento de las semillas con luz R también inhibe la expresión de proteínas *LEAs* y de reserva **(Fig. IV 8)** y promueve la actividad del promotor *Lhcb1*2* en luz RL en las plántulas, tres días después del R (Mazzella *et al.*, 2005). Estos cambios están asociados con la primera etapa de la regulación de la expresión de *ABI3*, lo que indica que *ABI3* está involucrado en la modulación, mediada por la luz percibida en las semillas, de la expresión de estos genes en las plántulas.

La intensidad del efecto del R, medida como la pérdida de actividad del promotor *ABI3* en plántulas de dos días, es dependiente del tiempo de exposición de las semillas a la luz **(Fig. IV 11)**. Esta señal, que tiene su origen antes de la germinación y que es transmitida a la plántula, no es la forma activa de los fitocromos, ya que un pulso de luz RL 16 h después del tratamiento con luz R no es capaz de revertir la disminución de la actividad del promotor *ABI3* **(Fig. IV 12)**. Una posibilidad que la señal lumínica percibida por el PHYB pueda inducir cambios en la estructura de la cromatina de las células de la semilla, y que estos se conserven a lo largo de sucesivas divisiones celulares, transmitiendose a la siguiente fase de desarrollo y en consecuencia, modificando la expresión de los genes en la plántula.

ABI3 modula las respuestas al RL mediada por el PHYA **(Fig. IV 6 y 13)**. Además, el ambiente lumínico percibido por la semilla afecta la respuesta a los pulsos de luz RL en la des-etiolación **(Fig. IV 14)**. En conjunto, estos resultados demuestran que la luz percibida por la semilla modula, por lo menos en parte a través de cambios en la expresión de *ABI3*, la respuesta a la luz de las plántulas derivadas de estas **(Fig. IV 17)**. Es probable que si una semilla germina en oscuridad, en la profundidad del suelo, la acumulación de proteínas de reserva y la detención de programas de desarrollo relacionados con un estado autótrofo tenga como consecuencia un aprovechamiento más eficiente de energía, hasta que la plántula alcance la superficie del suelo. En cambio, si la semilla ha sido expuesta la luz, y se han establecido altos niveles de fitocromo activo, la plántula se encontraría, con alta probabilidad, cerca de la superficie, y estaría

capacitada a responder de manera eficiente a los rápidos cambios en el entorno lumínico. Entonces, el ambiente lumínico percibido por la semilla genera una señal que es transmitida al siguiente estadio de desarrollo, anticipando a la plántula a las condiciones del entorno más probables para su crecimiento.

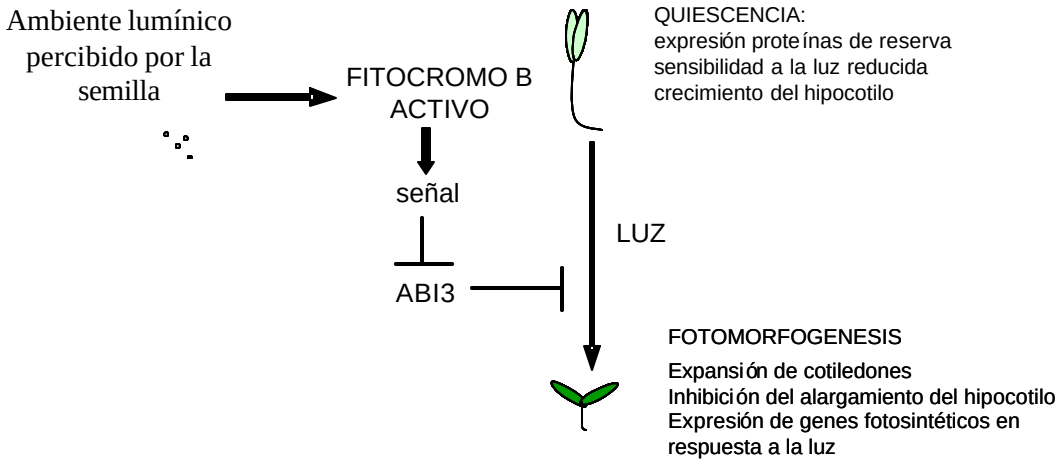


Fig. IV 17. Modelo propuesto para la relación entre el ambiente lumínico percibido por la semilla y la expresión de genes y respuesta a la luz de las plántulas.

CONCLUSIONES

El ABA regula numerosos aspectos del desarrollo de las plantas, como ser la síntesis de proteínas de reserva, la adquisición de tolerancia a la desecación, dormición e inhibición de la germinación de las semillas y la transición del crecimiento vegetativo al reproductivo de las plantas.

En el caso de semillas con dormición impuesta por las cubiertas, la inhibición de la germinación por ABA puede estar relacionada tanto con el bloqueo del crecimiento del embrión como del ablandamiento del endosperma. Se sabía que en *D. ferox* el ABA inhibe la germinación por una LFR y que este efecto está asociado con el bloqueo por el ABA del potencial de crecimiento del embrión. En tabaco, *Pinus*, y lechuga la promoción de la germinación por los fitocromos involucra la disminución de los contenidos de ABA en semillas. Por otro lado, la interacción entre el ABA y los fitocromos también había sido observada durante el desarrollo de las plantas; por ejemplo, en *Lemna gibba* los fitocromos inhiben la expresión de genes a través de la disminución de los contenidos de ABA, y la expresión de genes fotosintéticos en respuesta a luz es inhibida por esta hormona en tomate, soja y *Lemna*. Hasta el momento, se desconocían las relaciones entre la acción de los fitocromos y la de los genes *ABI1*, *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *ERA1* y *DET3* en el fotocontrol de la germinación, así como en el desarrollo de las plántulas.

Los resultados descriptos en este capítulo demuestran por primera vez que (a) en *D. ferox*, el antagonismo ABA-citocininas en la promoción de la germinación por luz está asociado a cambios en la respuesta al GA de las células del embrión; el ABA disminuye la respuesta al GA para el estímulo del potencial de crecimiento por R, mientras que las zeatina suprime el efecto del ABA (b) En *Arabidopsis*, la acción de los fitocromos en la germinación está modulada por *ABI4* y *ERA1*, componentes de la señalización del ABA (c) El antagonismo entre componentes de señalización del ABA y los fitocromos es observado además en plántulas, y mientras *ABI5* y *DET3* interaccionan con la vía de transducción dependiente de los fitocromos estables, *ABI3* y *ABI4* interaccionan con la vía de transducción iniciada por el PHYA. (d) La pérdida de función de *ERA1* afectó en forma general las respuestas a la luz de las plántulas, indicando que este gen interaccionaría con componentes comunes a varios fotorreceptores en la desetiolación (e) Además de controlar la germinación, la luz percibida por las semillas a través de los fitocromos genera una señal que se transmite a otras fases del desarrollo del individuo, modulando, a través de cambios en la expresión de *ABI3*, la respuesta a la luz de las plántulas.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Una planta típica puede considerarse como una red de millones de células organizadas en tejidos y numerosos meristemas con la capacidad de influenciarse unos a otros. En este sentido, no existe un tejido que ejerza un control centralizado obvio sobre el organismo, y las respuestas de las plantas emergen entonces como una propiedad de un sistema de células y tejidos integrados como un todo. Estas influencias requieren de una comunicación, y las señales involucradas comprenden un rango amplio de naturaleza, desde la física por ejemplo, señales gaseosas, mecánicas eléctricas y osmóticas, a la química las cuales involucran, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, oligo-nucleótidos, oligo-sacarinas así como hormonas, azúcares, aminoácidos y minerales (Trewavas, 2005).

Por su naturaleza sésil, las plantas poseen respuestas extraordinariamente plásticas a su ambiente. Esta plasticidad fenotípica es una característica que permite a la planta ajustar su desarrollo en función de las características de su ambiente, maximizando sus probabilidades de sobrevivir y la producción de semillas, dentro de las restricciones impuestas por su entorno y sus características genéticas. Se cree que los cambios fenotípicos de las plantas promovidos por señales ambientales están dirigidos hacia el desafío futuro de mejorar su *fitness* (Trewavas, 2005). Por ejemplo, como se mencionó en la introducción, en canopeos en crecimiento, numerosos cambios morfológicos se anticipan a la competencia por la radiación, debido a la percepción de la disminución de la relación R/RL en la radiación lateral por la vegetación vecina, aún antes que exista sombrado mutuo entre las plantas (Ballaré *et al.*, 1987; Ballaré *et al.*, 1991). Asimismo, los patrones espaciales y temporales de la salida de la dormición son cruciales para el éxito futuro de las nuevas plántulas en su hábitat (Benech-Arnold *et al.*, 2000).

Las semillas de numerosas especies son dispersadas desde la planta madre con diferentes grados de dormición. La presencia de dormición contribuye a la distribución de la germinación de los individuos en el *tiempo*, a través de la dependencia de la ruptura de la misma por factores ambientales. Por ejemplo, la dormición de muchas especies es terminada cuando las semillas son expuestas por semanas o meses a temperaturas de 1-5 °C. Como estas temperaturas suelen estar presentes sólo en el invierno, una gran proporción de las plántulas originadas a partir de estas semillas emergerán entonces en primavera, y se establecerán durante los meses más favorables. La dormición puede también llevar a la distribución de la germinación en el *espacio*, otro aspecto de su importancia biológica. Por ejemplo, en las especies en que la dormición es terminada por la luz, la germinación y emergencia de plántulas ocurrirá con mayor probabilidad en situaciones

donde la competencia no será tan acentuada, por ejemplo, luego de la apertura de un claro en el canopeo (Bewley y Black, 1994). En algunas especies el comportamiento de las semillas está determinado por una combinación de estos factores: por ejemplo, en *Polygonum aviculare*, la exposición de las semillas a las bajas temperaturas durante meses disminuye su grado de dormición, lo que está asociado a un incremento en la sensibilidad a la luz como factor terminante de la dormición (Batlla y Benech-Arnold, 2005). Entonces, una gran proporción de las plántulas emergerán en primavera, probablemente en claros del canopeo. Estas observaciones ponen en evidencia la relevancia del comportamiento de la semilla en el éxito del establecimiento de la plántula en su ambiente. Los patrones de comportamiento descriptos involucran una red de señalización celular compleja (Koornneef y Karssen, 1994), de la cual recién estamos empezando a descubrir algunos de sus componentes y sus funciones en sus diversos contextos fisiológicos. Además, involucran comunicaciones entre distintos tipos celulares del organismo, así como entre distintos estadios de su desarrollo. Se ha observado frecuentemente que las hormonas participan en esta clase de comunicación. Entonces, es lógico pensar que la regulación coordinada del desarrollo de órganos y tejidos, así como la inducción de procesos fisiológicos en respuesta a factores ambientales, requiere un diálogo entre hormonas y las vías de transducción de señales generadas por los factores externos. Por ejemplo, los contenidos de giberelinas en las semillas están modulados al menos por la acción de dos fitocromos estables (Yamaguchi *et al.*, 1998), y probablemente por el PHYA (Burgin *et al*., 2001).

En los **Capítulos II y III** se ha demostrado por primera vez que la regulación de la respuesta de la germinación a las giberelinas en la germinación es un proceso estrictamente regulado, el cual involucra una compleja interacción entre fotorreceptores, y comprende procesos que involucran la expresión diferencial de genes en distintos tipos celulares de las semillas. En particular, se ha observado una jerarquía entre los fotorreceptores que regulan la respuesta a las giberelinas para la germinación, siendo el PHYB el principal promotor de la respuesta, mientras que el PHYE y aparentemente el PHYC contribuyen en esta acción, y el PHYD ejerce una acción antagónica. Estas observaciones ilustran tres propiedades del sistema involucrado en la percepción de la señal lumínica que modula la respuesta a las giberelinas en las semillas; 1) un cierto nivel de redundancia en la acción de distintos componentes 2) una fuerte jerarquía entre los mismos y 3) relaciones antagónicas en su función. Se cree que la redundancia de genes en un proceso de desarrollo es una fuente de estabilidad, en este sentido, puede visualizarse que diversas proteínas estén presentes en cierta abundancia ejerciendo funciones que se solapan, y si

una falla, otra puede complementar su acción, aportando soluciones "a prueba de fallas" en el sistema (Trewavas, 2002). La jerarquía entre fotorreceptores podría abrir la posibilidad que la respuesta a las giberelinas esté modulada por diversos fotorreceptores de acuerdo al estado fisiológico de la semilla. Por ejemplo, poco después que las semillas son liberadas de la planta madre, la sensibilidad a las giberelinas está controlada principalmente por el PHYB, y a medida que el nivel de dormición disminuye, otros fotorreceptores, por ejemplo el PHYE y PHYC, podrían cobrar una mayor importancia en relación con PHYB. En consecuencia, la modulación de la sensibilidad a las giberelinas por la luz a lo largo de la historia de la semilla estaría mediada a través de distintas combinaciones o interacciones entre fotorreceptores, variando su intensidad de respuesta a distintas cantidades de flujo, calidad o duración de la luz. En este sentido, los resultados de Yang et al., (1995) son muy interesantes, ya que describen la regulación de la respuesta a las giberelinas por otros fotorreceptores distintos al PHYB en semillas que poseen aparentemente un bajo nivel de dormición. Las interacciones negativas entre fotorreceptores también proveerían una regulación más fina de la respuesta y por lo tanto, mayor homeostasis al sistema (Trewavas, 2002).

Una vez percibido el estímulo lumínico, la modulación de la sensibilidad a las giberelinas de las semillas de *Datura ferox* está asociada con la producción de un factor embrionario, probablemente una citocinina, que estimula la respuesta a las giberelinas de las células del embrión y endosperma micropilar **(Capítulo II)**. La luz R estimula la respuesta a las giberelinas en estos dos sitios de la semilla, y las vías de señalización que intervienen en cada caso aparentemente no son idénticas. La acción de los fitocromos involucra cambios en los niveles de transcriptos de *DfMYB* y *DfPHOR* en el endosperma micropilar, y estos cambios no fueron detectados en el embrión **(Fig. II 12-13)**. Estos resultados indican un patrón complejo en la interacción entre la luz y la señalización de las giberelinas, el cual involucraría distintos componentes de esta vía de señalización, dependiendo del tipo celular donde esta se lleva a cabo. Este patrón cobra mayor complejidad al tener en cuenta que, si bien la señal ambiental que regula la acumulación de mensajeros de *DfMYB* y *DfPHOR* es la misma, -la luz R-, las señales endógenas que median este control son diferentes en cada caso. La acumulación de mensajeros de *DfMYB* es regulada por un factor embrionario, con características similares a aquel que estimula la respuesta a las giberelinas en la geminación. Por otro lado, *DfPHOR* aparentemente es regulado por las giberelinas sintetizadas en el embrión, en respuesta a la luz R **(Fig. II 14)**. Teniendo en cuenta que existe una redundancia de fotorreceptores en el control de la respuesta a

las giberelinas en la germinación **(Capítulo III)**, es interesante investigar si la regulación de *DfMYB* y *DfPHOR* podrían estar mediadas por la acción de distintos fitocromos en las semillas. Asimismo, el aislamiento de genes involucrados en la modulación de la respuesta a las giberelinas en el embrión y su estudio en relación con la acción de la luz son interesantes perspectivas en este campo.

Es importante remarcar la relevancia de encarar este tipo de estudios en distintos grupos celulares de las semillas. En el caso de analizar la expresión de estos genes en semillas enteras, puede haber pérdida de información sobre la localización de estos cambios, o aún peor, debido a que los transcriptos provenientes del endosperma micropilar constituyen una pequeña fracción de los transcriptos totales de la semilla, los cambios en la acumulación de mensajeros observados en el endosperma pudieron haber sido indetectables si se analizaba en las semillas como un todo. En este sentido, *D. ferox* constituyó un modelo experimental excelente para estudiar estos procesos separadamente en cada sitio de la semilla.

En *Datura ferox*, la regulación de la germinación por los fitocromos involucra aparentemente múltiples puntos de acción hormonal. Las giberelinas promueven el aumento del potencial de crecimiento del embrión **(Fig. II 4)**, mientras que el ABA inhibe este proceso **(Fig. IV 2)**. Las citocininas promueven la acción de las giberelinas y suprimen el efecto del ABA sobre las células del embrión **(Fig. II 5 y IV 3)**. Es posible que, en presencia de luz R, el incremento en los contenidos de giberelinas y la liberación de citocininas en las semillas, supriman el efecto del ABA sobre el potencial de crecimiento, y esto contribuya, entre otros procesos, al aumento de la capacidad de expansión del embrión. Por otro lado, el ablandamiento del endosperma, otro paso indispensable para que ocurra germinación, sería promovido por una LFR al menos en parte a través del incremento de los contenidos de giberelinas y citocininas en el endosperma micropilar.

Aún se desconoce si el efecto de las citocininas en la inhibición de la acción del ABA está vinculada a una interacción directa entre la vía de transducción de estas hormonas, si se debe a un efecto indirecto a través de la promoción de las respuestas a las giberelinas, o a una combinación de estas dos posibilidades. En *Arabidopsis* se han demostrado algunas bases moleculares que median la interacción entre ABA y giberelinas en semillas. Por ejemplo, las giberelinas regulan negativamente un número importante de genes durante la germinación, y muchos de estos genes contienen motivos *ABRE* en sus secuencias promotoras (Ogawa *et al.*, 2003), los cuales son un

sitio de unión a factores de transcripción que regulan positivamente la acción del ABA. La incubación de semillas deficientes en giberelinas *ga1-3* con GA_4 regula negativamente la acumulación de transcriptos de *ABI3* y *ABI5* (Ogawa *et al.*, 2003). Esto demuestra que las giberelinas antagonizan la acción del ABA al menos en parte regulando negativamente la expresión de *ABI3* y *ABI5*. En la capa de aleurona de cereales, la proteína PKABA la cual es inducida por el ABA, regula negativamente la expresión de GAMYB, un modulador positivo de la respuesta a las giberelinas en ese tejido (Cadenas *et al*., 2001).

En esta tesis, se ha demostrado que en *Arabidopsis*, *ABI4* y *ERA1*, los cuales son componentes de la señalización del ABA, modulan la acción de los fitocromos en la germinación **(Fig. IV 4)**. Aún no existe información sobre la posible interacción entre *ABI4*, *ERA1* y las giberelinas en las semillas, pero presumiblemente estos podrían afectar la respuesta a la luz participando en la vía que promueve la disminución de la respuesta a las giberelinas por el ABA. Los genes *CKH1-1* y *CKH2-1*, involucrados en la respuesta a las citocininas en cultivo *in vitro*, regulan la respuesta a las giberelinas en semillas **(Fig. II 16 y 17)**. El estudio de posibles influencias entre estos genes en las semillas, así como la influencia de la luz y las hormonas en su expresión, es una interesante estrategia para avanzar en el conocimiento en las relaciones entre el ABA, citocininas, giberelinas y luz en la germinación.

El incremento en la sensibilidad a las giberelinas de *ckh1-1* y *ckh2-1* estuvo asociado a una mayor sensibilidad a la luz para la germinación, en comparación con Ler **(Fig. II 17-18)**. Recientemente, se ha demostrado que la mutación en el gen *LEP* (del inglés *LEAFY PETIOLE*), reduce la respuesta a las giberelinas en la germinación, indicando que este gen es un regulador positivo de la señalización de las giberelinas en las semillas (Ward *et al.*, 2006). Por otro lado, la pérdida de función del gen *PIL5* promueve la sensibilidad a la luz en la germinación (Oh *et al.*, 2004), y luego de la incubación en frío, las mutantes *pil5* no requieren luz para germinar (Penfield *et al.*, 2005). Es un desafío interesante estudiar la interacción entre *CKH1-1*, *CKH2-1*, *LEP* y *PIL5* en la promoción de la germinación por luz.

Una vez ocurrida la germinación, la plántula emerge del suelo, ocurriendo uno de los procesos más críticos para su establecimiento; la des-etiolación. A diferencia de lo que ocurre en las semillas, en este nuevo estadio de desarrollo las giberelinas actúan en forma antagónica con la vía de señalización de la luz, reprimiendo la fotomorfogénesis en oscuridad (Alabadí *et al.*, 2004). En contraste, la interacción entre la acción de los componentes de señalización del ABA y

la de los fitocromos en las plántulas conserva un patrón similar al observado en las semillas, en el cual los componentes que regulan positivamente la acción del ABA regulan negativamente la sensibilidad a la luz de las plántulas. En esta interacción, algunos componentes analizados como ser *ABI3*, *ABI4*, *ABI5* y *DET3* interactúan con vías de transducción generada por fitocromos específicos; por ejemplo, la pérdida de función de *ABI3* o *ABI4* afecta solamente la VLFR, mientras que la pérdida de función de *ABI5* o *DET3* afecta la LFR de los fitocromos **(Fig. IV 6)**. Además, *ABI3* interaccionaría con la señalización de los fitocromos en las plántulas pero no en semillas **(Fig. IV 4-6 y 13)**. En cambio, la pérdida de función de *ERA1* modificó la respuesta a la luz tanto de las semillas como de las plántulas. En las plántulas, la mutación *era1-2* afectó a todos los modos de acción de los fitocromos **(Fig. IV 4 y 7)**.

Esto ilustra una extraordinaria diversidad de interacciones entre señales ambientales, hormonas y componentes de su vía de transducción, las cuales dependen, en muchos casos, del tipo celular o estadio de desarrollo donde estas ocurren.

Estas interacciones pueden comenzar en un determinado estadio (por ejemplo, la semilla) y culminar desencadenando un proceso determinado en ese mismo estadio (por ejemplo, la promoción o inhibición de la germinación), o podrían, hipotéticamente, extenderse a lo largo de diversas fases del desarrollo del individuo. En esta tesis se aporta la primera prueba que, el ambiente lumínico percibido por la semilla no sólo modula su germinación, sino que también influye en la respuesta a la luz de las plántulas derivadas. La anticipación al ambiente lumínico de la plántula a través de la percepción de la luz en la semilla involucra la acción de *ABI3* **(Capítulo IV)**. Además, es interesante notar que en este efecto, la acción de un determinado fotorreceptor, en este caso el PHYB de la semilla, influencia la acción de otro fotorreceptor, el PHYA en las plántulas. Este hallazgo da origen a la idea que una determinada respuesta fisiológica de un individuo, más que ser un hecho que emerge aislado en el tiempo, es el resumen de una serie de procesos que tienen lugar a lo largo de la historia de su desarrollo, los cuales estarían interconectados y registrados en una *memoria celular*. En este contexto, se ha demostrado que la imbibición de la semilla aporta una señal capaz de sincronizar el patrón circadiano de acumulación de mensajeros del gen de una catalasa *CAT2* en plántulas de *Arabidopsis* (Zhong *et al.*, 1998). Asimismo, se ha observado una respuesta circadiana a la luz R para la promoción de la germinación en semillas de apio, la cual aparentemente es establecida durante el desarrollo de la semilla y reiniciada durante su imbibición (Thomas, 2002).

Las plantas dominan prácticamente todos los paisajes, representando el 99% de la biomasa de la Tierra. Algunas décadas atrás comenzamos a entender la dinámica excitante del comportamiento de estos organismos en relación con su ambiente, y una parte de los procesos fisiológicos involucrados. Recién ahora estamos visualizando algunas de las bases bioquímicas y moleculares de los mismos. Aún queda mucho por conocer. Los avances en genética y biología molecular han aportado en los últimos 5 años una amplia información sobre la composición del genoma de las plantas, abriendo la posibilidad de nuevos abordajes en la fisiología vegetal. Es un desafío actual utilizar esta información con el fin de avanzar en el conocimiento sobre el funcionamiento del organismo como un todo, así como sus respuestas en relación con los cambios en su ambiente natural.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alabadí D, Gil J, Blázquez M, García-Martínez J. (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* **134**: 1050-1057.

Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner M, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **219**: 479-488.

Allen G, Chu S, Schumacher K, Shimazaki C, Vafeados D, Kemper A, Hawke S, Tallman G, Tsien R, Harper J, Chory J, Schroeder J. (2000). Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science* **289**: 2338-2342.

Amador V, Monte E, García-Martínez J, Prat S. (2001). Gibberellin signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila* armadillo. *Cell* **106**: 343-354.

Ballaré C, Sánchez R, Scopel A, Casal J, Ghersa C. (1987). Early detection of neighbour plants by phytochrome perception of spectral changes in reflected sunlnght. *Plant Cell Environ* **10**: 551-557.

Ballaré C, Scopel A, Sánchez R. (1991). Far-red radiation reflected from adjacent leaves: an early signal of competition in plant canopies. *Science* **247**: 329-332.

Barnes S, Quaggio R, Whitelam G, Chua N. (1996). *fhy* defines a branchpoint in phytochrome A signal transduction pathways for gene expression. *Plant J* **10**: 1155-1161.

Bartholomew D, Bartley M, Scolnik P. (1991). Abscisic Acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol* **96**: 291-296.

Baskin J, Baskin C. (2003). *En* The Biology of seeds: recent research advances. Nicolás G,Bradford K,Côme D,Pritchard H. Wallingford, UK, CABI Publishing.

Bassel G, Mullen R, Bewley D. (2006). *ABI3* expression ceases following, but not during, germination of tomato and *Arabiodopsis* seeds. *J Exp Bot* **57**: 1291-1297.

Bassel G, Zielinska E, Mullen R, Bewley D. (2004). Down-regulation of *DELLA* genes is not essential for germination of tomato, soybean, and *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol* **136**: 2782-2789.

Batlla D, Benech-Arnold R. (2005). Changes in the light sensitivity of buried *Polygonum aviculare* seeds in relation with cold-induced dormancy loss: development of a predictive model. *New Phytol* **165**: 445-452.

Baumbusch L, Hughes D, Galau G, Jakobsen K. (2004). *LEC1, FUS3, ABI3* and *Em* expression reveals no correlation with dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **55**: 77-87.

Benech-Arnold R, Sánchez R, Forcella F, Kruk B, Ghersa C. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Res* **65**: 105-122.

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

Bewley D, Black M. (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination. New York, Plenum Press.

Bewley D, Burton R, Fincher G. (1997). Molecular cloning of a cDNA encoding a (1-4)-?-endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicum esculetum*). *Planta* **203**: 454-459.

Boccard-Gifford I, Lynch T, Garcia M, Malhotra B, Finkelstein R. (2004). The *Arabidopsis thaliana* abscisic acid-insensitive8 locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth. *Plant Cell* **16**: 406-421.

Borthwick H, Hendricks S, Parker M, Toole E, Toole V. (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**: 662-666.

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

Botto J, Sánchez R, Whitelam G, Casal J. (1996). Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **110**: 439-444.

Brady S, Sarkar S, Bonetta D, McCourt P. (2003). The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis. Plant J* **34**: 67-65.

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

Brummell D, Harpster M, Dunsmuir P. (1999). Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Mol Biol* **39**: 161-169.

Burgin M. (2001). Estudio del fotocontrol de la germinación de semillas de *Datura ferox*: aspectos fisiológicos y moleculares. Buenos Aires,

Burgin M, Arana M, de Miguel L, Staneloni R, Sánchez R. (2002). Responses of *Datura ferox* seeds to a far-red light pulse are inhibited by continuous far-red light irradiation. The International Society for Seed Science (ISSS). Salamanca. 12-6 May. 113

Butler W, Norris K, Siegelman H, Hendricks S. (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Biochemistry* **45**: 1703-1708.

Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons N, Ho T. (2001). Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**: 667-679.

Cao D, Hussain A, Cheng H, Peng J. (2005). Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 561-570.

Carpita N, Nabors M, Ross C, Petretic N. (1979). The growth physics and water relations of red-light-induced germination in lettuce seeds. *Planta* **144**: 225-233.

Carpita N, Ross C, Nabors M. (1979). 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.

Carr-Smith H, Johnson C, Thomas B. (1989). Action spectrum for the effect of day-extensions on flowering and apex elongation in green, light-grown wheat (*Triticum aestivum L.*). *Planta* **179**: 428-432.

Casal J. (1995). Coupling of phytochrome B to the control of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Planta* **196**: 23-29.

Casal J. (2002). Environmental cues affecting development. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 37-42.

Casal J. (2002). *En* Fundamentos de la fisiología vegetal. Azcón-Bieto J,Talón M. Madrid, McGraw-Hill/Interamericana, Edición Universitat de Barcelona **:** 377-388.

Casal J, Luccioni L, Oliverio K, Boccalandro H. (2003). Light, phytocrhome signaling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochem. and Photobiol.* **2**: 625-636.

Casal J, Sánchez R. (1998). Phytochomes and seed germination. *Seed Sci Res* **8**: 317-329.

Casal J, Sánchez R, Botto J. (1998). Modes of action of phytochromes. *J Exp Bot* **49**: 127-138.

Casal J, Sánchez R, Vierstra R. (1994). Avena phytochrome A overexpressed in transgenic tobacco seedlings differentially affects red/far red reversible and very-low-fluence responses (cotyledon unfolding) during de-etiolation. *Planta* **192**: 306-309.

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

Chang Y, Walling L. (1991). Abscisic acid negatively regulates expression of chlorophyll *a/b* binding protein genes during soybean embryogeny. *Plant Physiol* **97**: 1260-1264.

Chen F, Bradfrod K. (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol* **124**: 1265-1274.

Chen F, Dahal P, Bradford K. (2001). Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiol* **127**: 928-936.

Chory J. (1992). A genetic model for light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Development* **115**: 337-354.

Chory J, Peto C, Ashbaugh M, Saganich R, Pratt L, Ausubel F. (1989). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell* **1**: 867-880.

Cone J, Jaspers P, Kendrick R. (1985). Biphasic fluence-response curves for light induced germination of Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell Environ* **8**: 605-612.

Craker L, Zhao S, Decoteau, DR. (1987). Abscission: response to red and far-red light. *J Exp Bot* **38**: 883-888.

Culter S, Ghassemian M, Bonetta D, Cooney S, McCourt P. (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* **273**: 1239-1240.

Cumming B. (1963). The dependence of germination on photopheriod, light quality, and temperature, in *Chenopodium* sp. *Can J of Bot* **41**: 1211-1233.

Dahal P, Nevins D, Bradford K. (1997). Relationship of endo-?-mannananse activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. *Plant Physiol* **113**: 1243-1252.

de Miguel L. (1980). Changes in levels of endogenous inhibitors during dormancy breakage in *Datura ferox* L seeds. *Z. Pflanzenphysiol* **96**: 415-421.

de Miguel L, Burgin M, Casal J, Sánchez R. (2000). Antagonistic action of low-fluence and high-irradiance modes of response of phytochrome on germination and B-mannanase activity in *Datura ferox* seeds. *J Exp Bot* **347**: 1127-1133.

de Miguel L, Iglesias L, Sánchez R. (1999). ABA inhibition of Phytochrome-induced germination in *Datura ferox* seeds. IV International Workshop on Seed Biology. Merida, Mexico. Enero 24-28. 73

de Miguel L, Sánchez R. (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. *J Exp Bot* **43**: 969-974.

Debeaujon I, Koornneef M. (2000). Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol* **122**: 415-424.

Debeaujon I, León-Kloosterziel K, Koornneef M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**: 403-413.

Derkx M, Karssen C. (1993). Changing sensitivity to light and nitrate but not to gibberellins regulates seasonal dormacy patterns in *Sisymbrum officinale* seeds. *Plant Cell Environ* **16**: 469-479.

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

Devlin P, Kay S. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**: 2499-2510.

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

Devlin P, Rood S, Somers D, Quail P, Whitelam G. (1992). Photophysiology of the elongated internode (ein) mutant of Brassica rapa: ein mutant lacks a detectable phytochrome B-like phenotype. *Plant Physiol* **100**: 1442-1447.

Dill A, Sun T. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 777-785.

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

Drumm H, Mohr H. (1974). The dose response curve in the phytochrome-mediated anthocyanin synthesis in the mustard seedling. *Photochem. and Photobiol.* **20**: 151-157.

Fankhauser C, Chory J. (1997). Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 203-229.

Fenner M. (1991). The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Sci Res* **1**: 15-84.

Finkelstein R. (1994). Mutation at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* **5**: 765-771.

Finkelstein R, Gampala S, Rock C. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*: S15-S45.

Finkelstein R, Gibson S. (2002). Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 26-32.

Finkelstein R, Lynch T. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.

Finkelstein R, Wang M, Lynch T, Rao S, Goodman H. (1998). The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10**: 1043-1054.

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

Friederchsen D, Chory J. (2001). Steroid signaling in plants: from the cell surface to the nucleous. *BioEssays* **23**: 1028-1036.

Fu X, Richards D, Fleck B, Xie D, Burton N, Harberd N. (2004). The *Arabidopsis* mutant sleepy1 $^{gar2\text{-}1}$ protein promotes plant growth by increasing the afinity of the SCF ^{SLY1} E3ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**: 1406-1418.

Gazzarinin S, McCourt P. (2001). Genetic interactions between ABA, ethylene and sugar signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 387-391.

Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Hofte H. (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **144**: 295-305.

Giraudat J, Hauge B, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman H. (1992). Isolation of the *Arabidopsis ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell* **4**: 1251-1261.

Gocal G, Poole A, Gubler F, Watts R, Blundell C, King R. (1999). Long-day up regulation of a *GAMYB* gene during *Lolium temulentum* inflorescence formation. *Plant Physiol* **119**: 1271-1278.

Gocal G, Sheldon C, Gubler F, Moritz T, Bagnall D, MacMillan C, Li SF, Parish R, Dennis E, Weiger D, King R. (2001). *GAMYB*-like genes, flowering, and gibberellin signalling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 1682-1693.

Gómez-Cadenas A, Verhey S, Holappa L, Shen Q, Ho T, Walker-Simmons N. (1999). An abscisic acid-induced protein kinase PKABA1, mediates abscisic acid-suppresed gene expression in barley aleurone layers. *Plant Cell* **4**: 1251-1261.

Goto N, Kumagai T, Koornneef M. (1991). Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiol Plantarum* **83**: 209-215.

Grappin P, Bouinot D, Sotta B, Miginiac E, Jullien M. (2000). Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* **210**: 279 - 285.

Greenboim-Wainberg Y, Maymon I, Borochov R, Alvarez J, Olszewski N, Ori N, Eshed Y, Weiss D. (2005). Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPYNDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *Plant Cell* **17**: 92-102.

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

Groot S, Karssen C. (1992). Dormancy and germination of abscisic acid-deficient tomato seeds. *Plant Physiol* **99**: 952-958.

Gubler F, Chandler P, White R, Llewellyn D, Jacobsen J. (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of *SLN1* and *GAMYB* expression. *Plant Physiol* **129**: 191-200.

Gubler F, Kalla R, Roberts J, Jacobsen J. (1995). Gibberellin-regulated expression of a *MYB* gene in barley aleurone cells: evidence for MYB transactivation of a high-pI α-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**: 1879-1891.

Hendricks S, Toole V, Borthwick H. (1968). Opposing actions of light in seed germination of *Poa pratensis* and *Amaranthus arenicola*. *Plant Physiol* **43**: 2023-2028.

Henning L, Poppe C, Sweere U, Martin A, Schäfer E. (2001). Negative interference of endogenous phytochrome B with phytochrome A function in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **125**: 1036-1044.

Henning L, Poppe C, Unger S, Schäfer E. (1999). Control of phypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana by photoreceptor interaction. *Planta* **208**: 257-263.

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

Holmes M, Klein W. (1985). Evidence for phytocrhome involvement in light-mediated stomatal movement in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **166**: 348-353.

Insausti P, Soriano A, Sánchez R. (1995). Effects of flood-related factors on seed germination of *Ambrosia tenuifolia*. *Oecologia* **103**: 127-132.

Jacobsen S, Binkowski K, Olszewski N. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9292-9296.

Johnson E, Bradley J, Harberd N, Whitelam G. (1994). Photoresponses of light-grown *phyA* mutants of *Arabidopsis*: phytochrome A is required for the perception of daylength extensions. *Plant Physiol* **105**: 141-149.

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

Karssen C, Brinkhorst-Van der Swan D, Breekland A, Koornneef M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* **157**: 158-165.

Kendrick R, Spruit C. (1977). Phototransformations of phytochrome. *Photochem. and Photobiol.* **26**: 201-214.

Kendrick R, Spruit C, Frankland B. (1969). Phytochrome in seeds of *Amaranthus caudatus*. *Planta* **88**: 293-302.

Khan A. (1967). Antagonism between cytokinins and germination inhibitors. *Nature* **216**: 166-167.

Khan A. (1968). Inhibition of gibberellic acid-induced germination by abscisic acid and reversal by cytokinins. *Plant Physiol* **43**: 1463-1465.

Khan A. (1971). Cytokinins: permissive role in seed germination. *Science* **171**: 853-859.

Khan A, Downing R. (1968). Cytokinin reversal of abscisic acid inhibition of growth and ? ? amilase synthesis in barley seeds. *Physiol Plantarum* **21**: 1301-1307.

Khan A, Goss J, Smith D. (1957). Effect of gibberellin on germination of lettuce seeds. *Science* **125**: 645-646.

Khan A, Tolbert N. (1965). Reversal of inhibitors of seed germination by red ligth plus kinetin. *Physiol Plantarum* **18**: 41-43.

Kim J-I, Kozhukh G, Song P-S. (2002). Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **298**: 457-463.

Koornneef M, Jorna M, Brinkhorst-Van der Swan D, Karssen C. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin-sensitive lines of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **61**: 385-393.

Koornneef M, Karssen C. (1994). *En Arabidopsis*. Meyerowitz E,Somerville C. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press**:** 313-334.

Koornneef M, Reuling G, Karssen C. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plantarum* **61**: 337-383.

Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M. (1994). Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant J* **6**: 665-672.

Kranz H, Denekamp M, Greco R, Hailing J, Leyva A, Meissner R, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 263-276.

Kubo M, Kakimoto T. (2000). The *CYTOKININ-HYPERSENSITIVE* genes of *Arabidopsis* negatively regulate the cytokinin-signaling pathway for cell division and chloroplast development. *Plant J* **23**: 385-394.

Kutschera U, Schopfer P. (1986). Effect of auxin and abscisic acid on cell wall extensibility in maize coleoptiles. *Planta* **167**: 527-535.

Lagarias J, Lagarias D. (1989). Self-assembly of synthethic phytochrome holoprotein *in vivo.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5778-5780.

Lee S, Cheng H, King K, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd N, Peng J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Gene Dev* **16**: 646-658.

Leung J, Bouvier-Durand M, Morris P, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J. (1994). Arabidopsis ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* **264**: 1448-1452.

Leung J, Giraudat J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 199-222.

Leung J, Merlot S, Giraudat J. (1997). The *Arabidopsis ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2* (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**: 759-771.

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

Lopez-Molina L, Mongrand S, Kinoshita N, Chua N. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the *ABI5* transcription factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4782-4787.

Mancinelli A. (1994). *En* Photomorphogenesis in Plants. Kendrick R,Kronenberg G. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2nd**:** 211-269.

Mandoli D, Briggs W. (1981). Phytochrome control of two low-irradiance responses in etiolated oat seedlings. *Plant Physiol* **67**: 733-739.

Mathews S, Sharrock R. (1997). Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ* **20**: 666-671.

Mazzella M, Arana M, Staneloni R, Perelman S, Rodriguez Batiller M, Muschietti J, Cerdán P, Chen K, Sánchez R, Zhu T, Chory J, Casal J. (2005). Phytochrome control of the Arabidopsis transcriptome anticipates seedling exposure to light. *Plant Cell* **17**: 1-10.

McGinnis K, Thomas S, Soule J, Strader L, JM Z, Sun T, CM S. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130.

Mella R, Burgin M, Sánchez R. (2004). Expansin gene expression in *Datura ferox* L. seeds is regulated by the low-fluence response, but not by the high irradiance response, of phytochromes. *Seed Sci Res* **14**: 61-71.

Mella R, Maldonado S, Sánchez R. (1994). Phytochrome-induced structural changes and protein degradation prior to radicle protrusion in *Datura ferox* seeds. *Can J of Bot* **73**: 1371-1378.

Meyer K, Leube M, Grill E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **264**: 1452-1455.

Miller C. (1956). Similarity of some kinetin and red light effects. *Plant Physiol* **31**: 318-319.

Mo B, Bewley D. (2003). The relationship between ?-mannosidase and endo-?-mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. *J Exp Bot* **54**: 2503-2510.

Monte E, Alonso J, Ecker J, Zhang Y, Li X, Young J, Austin-Phillips S, Quail P. (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* **15**.

Murray F, Kalla R, Jacobsen J, Gulber F. (2003). A role for HvGAMYB in anther development. *Plant J* **33**: 481-491.

Nagatani A, Reed J, Chory J. (1993). Isolation and initial characterisation of *Arabiodpsis* mutants that are deficient in phytochrome A. *Plant Physiol* **102**: 269-277.

Nagy F, Kircher S, Shäfer E. (2001). Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J Cell Sci* **114**: 475-480.

Nambara E, Keith K, McCourt P, Naito S. (1994). Isolation of an internal deletion mutant of the *Arabidopsis thaliana* ABI3 gene. *Plant Cell Physiol* **35**: 509-513.

Nambara E, Marion-Poll A. (2003). ABA action and interaction in seeds. *Trends in Plant Science* **8**: 213-217.

Neff M, Fankhauser C, Chory J. (2000). Light: an indicator of time and place. *Gene Dev* **14**: 257-271.

Negbi M, Koller D. (1964). Dual action of white light in the photocontrol of germination of *Oryzopsis miliacea*. *Plant Physiol* **39**: 247-253.

Nemhauser J, Chory J. (2002). Photomorphogenesis. Somerville C,Meyerowitz E. Rockville, MD, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Ni B, Bradford K. (1993). Germination and dormancy of abscisic acid- and gibberellin-deficient mutant tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds (sensitivity of germination to abscisic acid, gibberellin, and water potential). *Plant Physiol* **101**: 607-617.

Nomaguchi M, Nonogaki H, Morohashi Y. (1995). Development of galactomannan-hydrolyzing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Physiol Plantarum* **94**: 105-109.

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

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

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

Olszewski N, Sun T, Gulber F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **Supplement 2002**: S61-S80.

Parcy F, Valon C, Raynal M, Gaubier-Comella P, Delseny M, Giraudat J. (1994). Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**: 1567-1582.

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

Pei Z-M, Ghassemian M, Kwak C, McCourt P, Shroeder J. (1998). Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* **282**: 287-290.

Penfield S, Josse E-M, Kannangara R, Gilday A, Halliday K, Graham I. (2005). Cold and light control of seed germination through the bHLH trascription factor SPATULA. *Current Biology* **15**: 1998-2006.

Peng J, Richards D, Moritz T, Caño-Delgado A, Harberd N. (1999). Extragenic suppressors of the *Arabidopsis gai* mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* **119**: 1199-1207.

Poppe C, Shäfer E. (1997). Seed germination of Arabidopsis thaliana phyA/phyB double mutants is under phytochrome control. *Plant Physiol* **114**: 1487-1492.

Psaras G, Georghiou K, Mitrakos K. (1981). Red-light induced endosperm preparation for radicle protrusion of lettuce embryos. *Bot Gaz* **142**: 13-18.

Qamaruddin M, Tillberg E. (1989). Rapid effects of red light on the isopentenyladenosine content in *Scots Pine* seeds. *Plant Physiol* **91**: 5-8.

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

Qin X, Zeevaart A. (2002). Overexpression of a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotiana plumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* **128**: 544-551.

Reed J, Nagpal P, Poole A, Furuya M, Chory J. (1993). Mutations in the gene for red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughtout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**: 147-157.

Reifler M, Novak O, Strnar M, Schmülling T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**: 40-54.

Richards D, King K, Ait-Ait T, Harberd N. (2001). How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 67-88.

Ritchie S, McCubbin A, Ambrose G, Kao T, Gilroy S. (1999). The sensitivity of barley aleurone tissue to gibbeellin is heterogeneous and may be spatially determined. *Plant Physiol* **120**: 361-370.

Robson P, Smith H. (1997). Fundamental and biotechnological applications of phytochrome transgenes. *Plant Cell Environ* **20**: 830-838.

Rohde A, Van Montagu M, Boerjan W. (1999). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3* (*ABI3*) gene is expressed during vegetative quiescence process in *Arabidopsis. Plant Cell Environ* **22**: 261-270.

Rose J, Lee H, Bennet A. (1997). Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5955-5960.

Sánchez R, de Miguel L. (1985). The effect of red light, ABA, and K^+ on the growth of *Datura ferox* embryos and their relations with photocontrol of germination. *Botanical Gazzete* **146**: 472-476.

Sánchez R, de Miguel L. (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 Sci Res* **7**: 27-33.

Sánchez R, de Miguel L, Mercuri O. (1986). Phytochrome control of cellualse activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. *J Exp Bot* **37**: 1574-1580.

Sánchez R, Mella R. (2004). *En* Handbook of seed physiology. Application to agriculture. Benech-Arnold R,Sánchez R. New York, Food Product Press and The Haworth Press, Inc.**:** 221-243.

Sánchez R, Sunell L, Labavitch J, Bonner B. (1990). Changes in endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. *Plant Physiol* **93**: 89-97.

Schumacher K, Vafeados D, McCarthy M, Wilkins T, Chory J. (1999). The Arabidopsis det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H(+)ATPase in plant growth and development. *Gene Dev* **13**: 3259-3270.

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

Sharrock R, Clack T. (2002). Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol* **130**: 442-456.

Sharrock R, Quail P. (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: Structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Gene Dev* **3**: 1745-1757.

Sheen J. (1996). Ca2+ -dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* **274**: 1900-1902.

Sheen J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**.

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

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

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

Silverstone A, Ciampaglio C, Sun T. (1998). The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* **10**: 155-169.

Silverstone A, Jung H, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T. (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1555-1565.

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

Soriano A, Sánchez R, Eilberg B. (1964). Factors and processes in the germination of *Datura ferox* L. *Canadian Journal of Botany* **42**: 1189-1203.

Taiz L, Zeiger E. (1998). *En* Plant Physiol. Taiz L,Zeiger E. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.**:** 671-690.

Taiz L, Zeiger E. (1998). *En* Plant Physiol. Taiz L,Zeiger E. Massacusetts, Sinauer Associates, Inc.**:** 691-724.

Taiz L, Zeiger E. (1998). *En* Plant Physiol. Taiz L,Zeiger E. Massachusetts, Sinauer Associates, Inc.**:** 483-516.

Tepperman J, Zhu T, Chang H, Wang X, Quail P. (2001). Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **31**: 9437-9442.

Thomas B. (1991). Phytochrome and photoperiodic induction. *Physiol Plantarum* **81**: 571-577.

Thomas S, Sun T. (2004). Uptdate on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiol* **135**: 668-676.

Thomas T. (2002). Is there a circadian germination response to red light in celery (*Apium graveolens* L.) seeds? *Plant Growth Regulation* **37**: 31-35.

Thomas T, Palevich D, Biddington N, Austin R. (1975). Growth regulators and the phytochrome-mediated dormancy of celery seeds. *Physiol Plantarum* **35**: 101-106.

Thompsom A, Jackson A, Symonds R, Mulholland B, Dadswell R, Blake P, Burbidge A, Taylor I. (2000). Ectopic expression of a tomato 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. *Plant J* **23**: 363-374.

Tillberg E. (1992). Effect of light on abscisic acid content in photosensitive Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seed. *Plant Growth Regulation* **11**: 147-152.

Tillberg E, Björkman P. (1993). Effect of red and far-red irradiation on ABA and IAA content in *Pinus sylvestris* L. seed during the escape time period from photocontrol. *Plant Growth Regulation* **13**: 1-6.

Toorop P, Bewley D, Hilhorst H. (1996). Endo ?-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.

Toorop P, van Aelst A, Hilhorst H. (2000). The second step of the biphasic endosperm cap weakening that mediates tomato (Lycopersicon esculentum) seed germination is under control of ABA. *J Exp Bot*.

Toyomasu T, Kawaide H, Mitsuhayi W, Inoue Y, Kamiya Y. (1998). Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol* **118**: 1517-1523.

Toyomasu T, Tsuji H, Yamane H, Nakayama M, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N, Inoue Y. (1993). Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. *J Plant Growth Regul* **12**: 85-90.

Toyomasu T, Yamane H, Murofushi N, Inoue Y. (1994). Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. *Plant Cell Physiology* **35**: 127-129.

Trewavas A. (2002). Mindless mastery. *Nature* **415**: 841.

Trewavas A. (2002). Plant cell signal transduction: the emerging phenotype. *Plant Cell*: S3-S4.

Trewavas A. (2005). Green plants as intelligent organisms. *Trends in Plant Science* **10**: 413-419.

VanDerWoude W. (1985). A dimeric mechanism for the action of phytochrome: evidence from photothermal interactions in lettuce seed germination. *Photochem. and Photobiol.* **42**: 655-661.

VanDerWoude W, Toole V. (1980). Studies of the mechanism of enhancement of phytochrome-dependent lettuce seed germination by prechilling. *Plant Physiol* **66**: 220-224.

Vázquez-Yañez C, Smith H. (1982). Phytochrome control of seed germination in the tropical rain forest pioneer trees *Cecropia obtusfolia* and *Piper auritum* and its ecological significance. *New Phytol* **92**.

Viestra R. (1994). *En* Photomorphogenesis in plants. Kendrick R,Kronenberg G. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Acedemic Publishers.

Wagner M, Koloszvari M, Quail P. (1996). Two small spatially distinct regions of phytochrome B are required for efficient signaling rates. *Plant Cell* **8**: 859-871.

Ward J, Smith A, Shah P, Galanti S, Yi H, Demianski A, van der Graaff E, Keller B, Neff M. (2006). A new role for the *Arabidopsis* AP2 transcription factor, LEAFY PETIOLE, in gibberellin-induced germination is revealed by the misexpression of a homologous gene, *SOB2/DRN-LIKE*. *Plant Cell* **18**: 29-39.

Watkins J, Cantliffe D, Huber D, Nell T. (1985). Gibberellic acid stimulated degradation of endosperm in pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 61-65.

Weatherwax S, Ong M, Degenhardt J, Bray E, Tobin E. (1996). The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiol* **111**: 363-370.

Weatherwax S, Williams S, Tingay S, Tobin E. (1998). The phytochrome response of the Lemna NPR1 gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels. *Plant Physiol* **116**: 1299-1305.

Webb D, Wareing P. (1972). Seed dormancy in *Acer*: endogenous germination inhibitors and dormancy in *Acer Pseudoplatanus* L. *Planta* **104**: 115-125.

Wen C, Chang C. (2002). *Arabidopsis RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**: 87-100.

Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Onckelen H, Schmülling T. (2003). Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**: 2532-2550.

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

Williams S, Weatherwax S, Bray E, Tobin E. (1994). NPR genes, which are negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* L. G-3 can also be positively regulated by abscisic acid. *Plant Physiol* **105**: 949-954.

Wulff R. (1995). *En* Seed development and germination. Kigel J,Galili G. New York, Marcel Dekker**:** 491-505.

Yalovsky S, Kulukian A, Rodríguez-Concepción M, Young C, Gruissem W. (2000). Functional requirement of plant farnesyltransferase during development in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 1267-1278.

Yamaguchi S, Kamiya Y. (2000). Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiology* **41**: 251-257.

Yamaguchi S, Kamiya Y. (2002). Gibberellins and light-stimulated seed germination. *J Plant Growth Regul* **20**: 369-376.

Yamaguchi S, Smith M, Brown R, Kamiya Y, Sun T. (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3? -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* **10**: 2115-2126.

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

Yang Y, Nagatani A, Zhao Y, Kang B, Kendrick R, Kamiya Y. (1995). Effects of gibberellins on seed germination of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **36**: 1205-1211.

Yanovsky M, Casal J, Luppi J. (1997). The *VLF* loci, polymorphic between ecotypes Landsberg *erecta* and Columbia, dissect two branches of phytochrome A signal transduction that corresponds to very-low-fluence and high-irradiance responses. *Plant J*: 659-667.

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

Yoshioka T, Endo T, Satoh S. (1998). Restoration of seed germination at supraoptimal temperatures by fluoridone, an inhibitor of abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **210**: 307-312.

Zhang X, Garreton V, Chua N. (2005). The *AIP2 E3* ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting *ABI3* degradation. *Gene Dev* **19**: 1532-1543.

Zhong H, Painter J, Salomé P, Straume M, McClung R. (1998). Imbibition, but not release from stratification, sets the circadian clock in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* **10**: 2006-2017.