



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Análisis de la función de DOG1 en el control de
la germinación por luz en la semillas de arabi-
dopsis thaliana.

N° 511

Rocío Tognacca

Tutor: Dr. Javier Francisco Botto

Departamento de Investigaciones
2012

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

AGRADECIMIENTOS.

Qué difícil se hace la parte de los agradecimientos.... Por quién empezar, no?

En primer lugar quiero darle las gracias a Javier, mi director, por haber contestado a ese primer mail que me abrió las puertas para estar hoy, más de dos años después, trabajando en el labo del IFEVA. Gracias por la enorme paciencia que me tuviste en estas últimas semanas.

Y ya que mencioné al IFEVA, no quiero perder la oportunidad de agradecer a TODOS los que estuvieron conmigo SIEMPRE. Son excelentes personas con las que siempre pude contar, en cosas muy simples y cotidianas hasta en otras no tanto. Ellos son: María (hoy en día no está en el lab.), Pipa (por sus cánticos en voz alta), Santi (por sus "chistes" en los almuerzos y por haber estado cuando lo necesité), Gaby (por su buena onda), Ely (por estar cuando necesité despejar dudas técnicas), Andre (que tampoco sigue en el lab.), Carlos (por siempre preguntarme por mi tesis), Lu (por enseñarme las primeras PCRs), Martín (por los viajes en el auto compartidos), Pau (porque siempre tuvo la mejor conmigo y estuvo cuando la necesité), Yami (por la buena onda) y Marcos y Ornela (si bien no hemos compartido muchos momentos juntos, me nació del corazón nombrarlos). Quisiera agradecerles uno a uno por todo lo compartido (aunque sé que no soy de mucho hablar...igual hay cosas para recordar y agradecer), pero no me alcanzarían las hojas. Perdón si me olvido de alguien...

Un agradecimiento especial se merecen Romi y Sil. Romi porque estuvo en esos momentos críticos de las presentaciones a beca que hice (que siempre faltaban 5 para el peso) y al que no me pude presentar, porque fueron siempre los viernes a última hora y ella estaba ahí! Ahh...me olvidaba, gracias por ayudarme con la parte eléctrica de mis ensayos, el sistema de luces.... GRACIAS ROMI. Y Silvia, qué puedo decir, se merece el mayor de los agradecimientos. Desde el día cero estuvo siempre para ayudarme, para despejar mis dudas, a veces muy tontas, fue quien me enseñó lo <poco o mucho> que sé hasta hoy. Gracias por confiar en mí para trabajar con vos, por la enorme paciencia que me tenés y por haberme dado la oportunidad de presentarme a un congreso. GRACIAS SIL.

A Viky, por los momentos compartidos en el IFEVA y en la UB. A mis amigas de la facultad Cin y Lu, por habernos hecho el aguante en esta nueva etapa que empezamos hace más de dos años, por haber estado siempre, por los momentos compartidos dentro y fuera de la facultad. GRACIAS CHICAS...

Finalmente, pero no menos importante, quiero agradecer a toda mi familia por haberme apoyado cuando decidí estudiar esta carrera que tanto me apasiona, sabiendo lo complicada que puede llegar a ser. Gracias Ma, gracias Pa y gracias a mis hermanos Sil, Cris y Mau por aguantarme todos los días!. No me quiero olvidar de mis primos Flor y Eze, por preguntarme siempre por mi plantitas! A mis abuelos, porque siempre me preguntaban cómo iban mis cosas y a mis tíos. Y a mi Tía Marga!

*But seeds are invisible.
They sleep deep in the heart of the earth's darkness,
until someone among them is seized with the desire to awaken.
Then this little seed will stretch itself and begin - timidly at first -
to push a charming little sprig inoffensively upward toward the sun.*

Antoine de St. Exupéry, Le petit prince (1943).

1. RESUMEN.

La dormición es un rasgo complejo regulado finamente por las hormonas y los factores ambientales. Los fitocromos, receptores para la percepción del rojo: rojo lejano (R:RL), son los únicos fotorreceptores involucrados en la terminación de la dormición y la inducción de la germinación por la luz.

Con la idea de entender mejor el rol de DOG1 en las vías de señalización del phyA y phyB, se utilizaron líneas mutantes dobles de DOG1 con phyA y phyB, siendo *phyAdog1* y *phyBdog1*. Nuestro diseño experimental consistió en trabajar con semillas cosechadas de plantas madres expuestas a distintas condiciones de luz (alta relación R:RL y baja relación R:RL) y temperatura (15°C, 20°C y 25°C). Nos propusimos caracterizar los nuevos y aún no publicados materiales genéticos, tanto en las respuestas de salida de la dormición y promoción de la germinación de las semillas, como también caracterizar el fenotipo en planta de estos materiales. Nuestros resultados en los distintos ambientes de temperatura indican que los parámetros de crecimiento vegetativo y floración fueron controlados principalmente por los phyA y phyB, mientras que los efectos de DOG1 fueron limitados. Sin embargo, DOG1 podría contribuir aditiva y parcialmente a la acción promotora del crecimiento phyA a 15°C y de phyB a 25°C. Los resultados de la caracterización fenotípica en distintos ambientes de luz indican que DOG1 tuvo una función promotora sobre el crecimiento vegetativo en un ambiente lumínico de alta relación R:RL. Este función promotora en canopeos abiertos (sin competencia por luz de plantas vecinas) no había sido descrita antes. Los resultados de germinación indican que las bajas temperaturas durante la maduración de las semillas (15°C) aumentan los niveles de dormición con respecto a aquellas cosechadas de plantas cultivadas a 25°C. DOG1 fue un represor de la germinación a tiempos de post-maduración de 60 y 120 días, pero no a 300 días, sugiriendo que sus efectos represores se diluyen con el tiempo de post-maduración. Una baja relación de luz R:RL durante el desarrollo de las semillas en la planta madre aumentó la dormición de las mismas, mientras que un relación de luz R:RL=1,02 disminuyó el nivel de dormición. Nuestro diseño experimental no permitió distinguir efectos significativos de DOG1, phyA y phyB en las condiciones experimentales evaluadas.

Esta tesis puso a prueba la idea de que DOG1 y los phyA y phyB pueden afectar el crecimiento de las plantas y el tiempo de inducción floral como así también la salida de la dormición de las semillas.

2. ABREVIATURAS.

- ✦ ABA: ácido absícico.
- ✦ ABI: insensible al ABA.
- ✦ DOG1: delay of germination 1.
- ✦ *dog1*: mutante de DOG1.
- ✦ GA: giberelina.
- ✦ GAI: insensible a la giberelina.
- ✦ HIR: respuesta de alta irradiancia.
- ✦ KNO₃: nitrato de potasio.
- ✦ LFR: respuesta de bajo flujo.
- ✦ NO: óxido nítrico.
- ✦ Pfr: forma del fitocromo que absorbe en en RL.
- ✦ *phyA*: mutante de fitocromo A.
- ✦ *phyAdog1*: mutante de *phyA* y DOG1.
- ✦ *phyB*: mutante de fitocromo B.
- ✦ *phyBdog1*: mutante de *phyB* y DOG1.
- ✦ PIL5: factor que interactúa con los fitocromos.
- ✦ Pr: forma del fitocromo que absorbe R.
- ✦ QTL: loci de carácter cuantitativo.
- ✦ R: luz roja.
- ✦ R:RL: relación rojo:rojo lejano.
- ✦ RIL: línea endocriada recombinante.
- ✦ RL: luz roja lejano.
- ✦ SPT: factor de transcripción SPATULA.
- ✦ VLFR: respuesta de muy bajo flujo.
- ✦ WT: genotipo salvaje.

3. ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS.

1. RESUMEN.....	5
2. ABREVIATURAS.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1. EL ESTADO DE DORMICIÓN EN LAS SEMILLAS.....	9
3.1.1. Significado ecológico de la dormición de semillas.....	11
3.2. FACTORES ENDÓGENOS Y AMBIENTALES QUE CONTROLAN LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS.....	12
3.2.1 Las bajas temperaturas y la salida de la dormición.....	12
3.2.2. La luz y la salida de la dormición.....	13
3.2.2.a. <i>Características genéticas y moleculares de los fitocromos.....</i>	13
3.2.2.b. <i>Modo de acción de los fitocromos.....</i>	14
3.2.2.c. <i>Importancia ecológica del modo de acción de los fitocromos.</i>	15
3.2.3 La post-maduración en seco de las semillas y la salida de la dormición.....	17
3.2.4. Rol del ABA y las GAs en la salida de la dormición.....	18
3.3. INFLUENCIA DEL AMBIENTE MATERNO SOBRE LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS	19
3.4. VARIACIÓN GENÉTICA NATURAL Y LA DORMICIÓN DE LAS SEMILLAS.....	19
3.5. EL MODELO MOLECULAR DE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS.....	21
3.6. <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> COMO PLANTA MODELO.....	22
3.7. JUSTIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1. Genotipos utilizados y construcción de las mutantes.....	25
5.2. Efecto materno según la temperatura de cultivo de la planta madre.....	25
5.2.1. <i>Condiciones de germinación y crecimiento de plantas generales.....</i>	25
5.2.2. <i>Mediciones de parámetros fisiológicos.....</i>	26
5.2.3. <i>Ensayos de germinación con las semillas obtenidas.....</i>	26
5.3. Efecto materno según la calidad de luz que recibe la planta madre.....	27
5.3.1. <i>Condiciones de germinación y crecimiento de plantas generales.....</i>	27
5.3.2. <i>Mediciones de parámetros fisiológicos.....</i>	28

5.3.3. Ensayos de germinación con las semillas obtenidas.....	28
5.4. Análisis estadísticos realizados.....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1. Rol de <i>DOG1</i> en el fenotipo de las plantas cultivadas en distintos ambientes de temperatura y luz.....	30
6.1.1. Efectos de la temperatura en el ambiente de cultivo sobre el crecimiento vegetativo y la floración.....	30
6.1.2. Efectos de la calidad de luz en el ambiente de cultivo sobre el crecimiento vegetativo y la floración.....	34
6.2. Efectos maternos sobre la germinación de las semillas.....	38
6.2.1. Efectos maternos asociados con la temperatura sobre la germinación de las semillas.....	38
6.2.2. Efectos maternos asociados con la calidad de luz sobre la germinación de las semillas.....	42
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	44
8. BIBLIOGRAFÍA.....	49

3. INTRODUCCIÓN.

Durante su ontogenia en la planta madre las semillas de la mayoría de las especies adquieren un elevado nivel de dormición que impide la germinación aún en condiciones que en otras circunstancias fisiológicas serían favorables (Bewley, 1997). Durante la post-maduración, factores ambientales y endógenos contribuyen a la disminución del nivel de dormición permitiendo, en combinación con señales ambientales específicas (cambios en el ambiente lumínico, térmico y/o niveles de nitratos, entre otros), la terminación de la dormición y la ocurrencia de patrones temporales y espaciales de germinación que se ajustan a las condiciones más favorables para el éxito de las futuras plantas en su hábitat (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La dormición es un efectivo punto de control del desarrollo porque tiene una influencia decisiva en determinar en qué circunstancias de tiempo y espacio ocurre el desarrollo de la plántula.

El estudio de la variación genética natural en semillas de *Arabidopsis thaliana* ha comenzado a aportar en la última década información de algunos de los mecanismos moleculares que permite la salida de la dormición durante la post-maduración de las semillas. El análisis de la germinación de poblaciones de semillas con niveles contrastantes de dormición y posteriores mapeos genéticos permitió identificar a *DOG1* como un QTL que impone dormición en las semillas (Alonso-Blanco *et al.*, 2003). *DOG1* codifica para un factor inhibitorio de naturaleza molecular aún desconocida, que se expresa tempranamente durante el desarrollo de la semilla y cuyos efectos van disminuyendo con la post-maduración (Bentsink *et al.*, 2006). Evidencias independientes trabajando con semillas *dog1* (mutantes nulas de *DOG1*) confirmaron que la ausencia de *DOG1* disminuye la dormición y la sensibilidad al ABA, sugiriendo que es una proteína involucrada en la vía de señalización del ABA (Bentsink *et al.*, 2006). Por otra parte, nuestro laboratorio demostró que *dog1* es más sensible que el WT cuando la germinación es inducida con muy bajos niveles de Pfr, sugiriendo que *DOG1* puede afectar negativamente la vía de acción del phyA (Laserna *et al.*, 2008). Estas evidencias experimentales sugieren que *DOG1* podría ser un actor importante en el control de la germinación por luz y que hay una ausencia de conocimiento importante acerca de cuál es el mecanismo molecular que vincula a *DOG1* con las vías de señalización de los fitocromos.

3.1. El estado de dormición en las semillas.

Una de las propiedades adaptativas más importantes de las plantas es la capacidad que presentan las semillas de retener su viabilidad durante largos períodos de tiempo, lo que les permite sobrevivir en condiciones adversas en un estado quiescente (Baskin y Baskin, 1998). Cuando las condiciones del medio son las adecuadas para el desarrollo de la nueva

plántula, se produce la germinación de la semilla; en cambio, si las condiciones no son favorables para que la germinación se complete con éxito, las semillas no germinan y se mantienen en estado quiescente. Sin embargo, algunas semillas no germinan aunque las condiciones sean favorables debido a características intrínsecas de la propia semilla (Bewley, 1997; Baskin y Baskin, 1998), porque presentan lo que se denomina dormición, que se define como la incapacidad para germinar de una semilla viable e intacta bajo condiciones que normalmente favorecen el proceso (Hilhorst, 1995). En estas semillas, para que la germinación tenga lugar deben producirse una serie de cambios metabólicos y/o ser sometidas a unos factores ambientales determinados.

La dormición no es un proceso de todo o nada, sino que existe en una amplia gama de intensidades que van desde la dormición absoluta, en la cual la germinación no se produce en ninguna condición ambiental, hasta la ausencia de dormición, que se caracteriza porque las semillas pueden germinar en un rango amplio de condiciones ambientales. En consecuencia, la dormición es un efectivo punto de control del desarrollo ya que tiene una influencia decisiva en determinar en qué circunstancias de tiempo y espacio ocurre el desarrollo de la plántula. Por ejemplo si la semilla germinara en un ambiente densamente cubierto por la vegetación o a una profundidad inadecuada en el suelo, la plántula encontraría enormes dificultades para capturar los recursos necesarios para crecer y sus posibilidades de éxito serán limitadas. También sería incierto el futuro de una planta sensible a las temperaturas bajas si la germinación se produjera antes de que termine la estación fría. En la medida que la dormición va disminuyendo, aumenta la sensibilidad de las semillas a factores del ambiente, entre ellos, la luz y las temperaturas alternadas.

La dormición puede ser primaria o secundaria. La dormición primaria se adquiere durante el desarrollo y maduración de la semilla en la planta madre. Se presenta en el momento que el embrión deja de crecer y está controlada genéticamente, aunque también influyen aspectos metabólicos (estado hormonal de la semilla, flujo de hormonas desde la planta madre) y factores ambientales (factores edáficos, temperatura y luz) (Bewley y Black, 1994). La dormición secundaria se define como la pérdida de la capacidad para germinar de una semilla viable cuya dormición primaria ha sido eliminada previamente. Se desarrolla en semillas maduras una vez dispersadas por una pérdida de la sensibilidad a los factores que rompen la dormición o que inducen la germinación. Se caracteriza por una incapacidad de germinar debido a un entorno adverso, como puede suceder en ambientes deficientes en oxígeno (Côme y Thevenot, 1982), con temperaturas elevadas (Cone y Spruit, 1983; Hilhorst, 1990a y b; Derkx y Karssen, 1993), o bien como respuesta a diferentes situaciones de estrés (Bewley, 1997).

La dormición de las semillas es una característica indeseable en los cultivos agrícolas, en donde se requieren una rápida germinación y crecimiento de los mismos. Sin embargo, un cierto nivel de dormición es una ventaja, por lo menos durante el desarrollo de la semilla, en los cultivos de cereales, ya que previene la germinación de los granos cuando todavía se

encuentran en la planta (brotado pre-cosecha), un problema que causa graves perjuicios económicos en determinados cultivos (Del Fueyo *et al.*, 2003). La ausencia de dormición provoca viviparismo en algunas especies agrícolas provocando grandes pérdidas económicas, como sucede en el trigo, al producir una baja calidad del grano. Pero una dormición muy profunda también tiene consecuencias económicas negativas, como sucede en la germinación desigual de campos de cebada que impide la correcta formación de malta, o como ocurre en muchas especies forestales utilizadas en repoblaciones forestales y en la industria maderera. Por ello existe un gran interés científico y económico en conocer los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en este proceso.

3.1.1. Significado ecológico de la dormición.

a) Dispersión temporal de la especie.

En general, los diferentes mecanismos de dormición tienen como principal finalidad retrasar la germinación y prevenir así que ésta tenga lugar en condiciones ambientales desfavorables para el establecimiento de las plántulas. Que los diferentes mecanismos de dormición de semillas hayan sido mantenidos a través de la evolución hasta nuestros días es, sin duda, una prueba del gran valor adaptativo que éstos suponen para las especies que los presentan. Las semillas de numerosas especies presentan un cierto nivel de dormición inmediatamente después de haber sido dispersadas por la planta. De esta manera, las especies vegetales evitan el posible peligro de que las semillas germinen sobre la propia planta que las ha producido, asegurando, además, la dispersión en el tiempo. La dispersión temporal de la especie se logra con el mantenimiento de la dormición de las semillas, que puede durar desde pocos días hasta varias décadas, dependiendo de las características genéticas de la especie y de los factores ambientales. En cualquier caso, tras la dispersión, los diferentes factores naturales que inciden sobre la semilla tenderán a eliminar, gradualmente, la mayor o menor dormición que ésta presenta. Tanto el tipo de dormición que presenta una semilla como los factores naturales que eliminan progresivamente esta dormición, están estrechamente ligados con el hábitat en el que se desarrolla la especie.

b) Banco de semillas del suelo.

Para numerosas especies de plantas, existe un importante *stock* de semillas que permanecen enterradas en el suelo, a diferentes profundidades, constituyendo el denominado banco de semillas del suelo. Con este banco las distintas especies aseguran la existencia de una cierta cantidad de semillas viables enterradas en el suelo y que éstas vayan germinando de forma gradual. De esta manera, aumenta considerablemente la probabilidad de supervivencia de las poblaciones vegetales. Las semillas de especies colonizadoras suelen presentar diversos mecanismos de dormición que hacen posible la dispersión en el tiempo. Las semillas de estas especies constituyen un porcentaje muy importante de la composición del banco de semillas

del suelo. En general, pueden permanecer viables, enterradas en el suelo, durante largos periodos. Como es lógico, la composición del banco de semillas del suelo está estrechamente relacionada con los ciclos biológicos de las especies que se desarrollan en los diferentes hábitats.

3.2. Factores endógenos y ambientales que controlan la dormición de las semillas.

La salida de la dormición depende de la interacción de factores endógenos (morfológicos, hormonales o metabólicos) y factores exógenos o ambientales (humedad, luz, temperatura, entre otros). La dormición puede ser culminada por factores promotores de la germinación como son la post-maduración, la luz y los tratamientos de frío (estratificación). Determinados químicos como las GAs, el KNO₃ (Derkx y Karssen, 1993a; Alboresi *et al.*, 2005; Ali-Rachedi *et al.*, 2004) y el NO (Bethke *et al.*, 2007b) también tienen efectos promotores de la germinación (**figura 1**). El grado de dormición no sólo está determinado genéticamente sino también por el ambiente materno durante la formación de la semilla (Donohue, 2005). A continuación solo se describen en detalle algunos de los factores que rompen la dormición de las semillas.

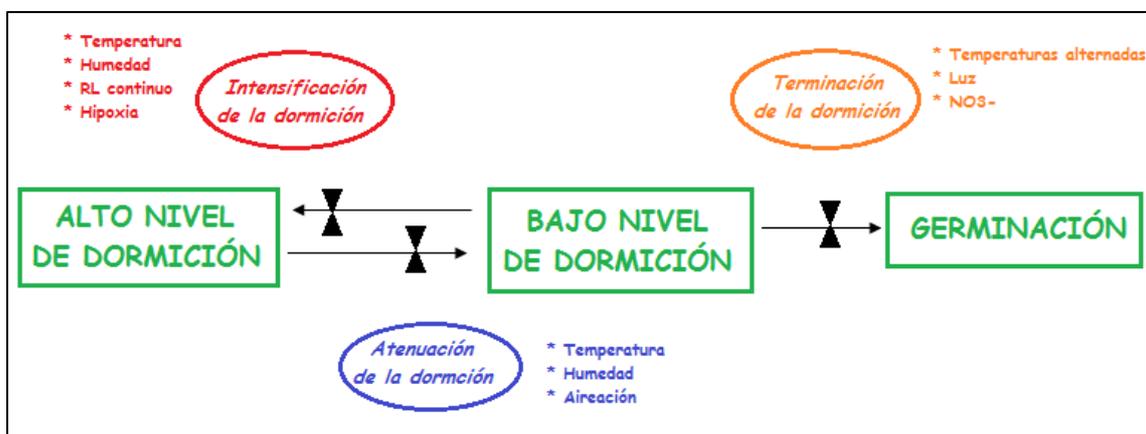


Figura 1: Diagrama de flujo que representa los cambios en el nivel de dormición y la terminación de la dormición en semillas y los factores que más probablemente afectan a cada proceso. Tomado y modificado de Benech-Arnold *et al.*, 2000.

3.2.1. Las bajas temperaturas y la salida de la dormición.

Entre los factores ambientales que controlan la salida de la dormición, la temperatura tiene un rol muy importante (Probert, 1992).

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 GA₄, así como con la acumulación de transcritos de *GA3ox1*, una GA3β-hidroxilasa que participa en el paso final de la síntesis de GA₄ (Yamauchi *et al.*, 2004).

El modelo de Penfield *et al.* (2005) explica el control del frío y la luz a través de la interacción de los factores de transcripción Spatula (SPT) y Phytochrome-Interacting-Factor-Like5 (PIL5). En la oscuridad, SPT y PIL5 son ambos represores activos de la germinación, mientras que en presencia de luz y frío, disminuyen sus actividades represoras.

3.2.2. La luz y la salida de la dormición.

La salida de la dormición en semillas de muchas especies puede ser causada por la luz (Bewley & Black, 1982). Dependiendo del nivel de dormición de las semillas, del tratamiento lumínico y de otras condiciones ambientales, la germinación puede ser promovida, inhibida o independiente de la luz (Bewley & Black, 1982; Frankland & Taylorson, 1983; Casal & Sánchez, 1998). La terminación de la dormición por luz es mediada por los fitocromos, que son receptores muy efectivos para la percepción de luz roja y rojo lejano. Los fitocromos son proteínas fotoreversibles que tienen la capacidad de interconvertirse en dos isómeros estables: la forma que absorbe eficientemente luz R ($Pr = \lambda_{\text{máx}} 660 \text{ nm}$) y la que absorbe eficientemente luz RL ($Pfr = \lambda_{\text{máx}} 730 \text{ nm}$) (Quail *et al.*, 1995; Fankhauser & Chory, 1997) (**figura 2B**). Los fitocromos son sintetizados en el citoplasma en la forma Pr, biológicamente inactiva, y al absorber R pasan a su conformación activa, Pfr, y migran al núcleo (Nagy *et al.*, 2001)

3.2.2.a. Características genéticas y moleculares de los fitocromos.

En *Arabidopsis* se conocen 5 genes distintos que codifican para los fitocromos, los cuales fueron llamados fitocromos A, B, C, D y E (*PHYA-E*) (Casal, 2002). Son proteínas solubles de aproximadamente 125 KDa. Su estructura es homodimérica en la que cada subunidad está unida covalentemente a un cromóforo constituido por un tetrapirrol lineal abierto denominado fitocromobilina (**figura 2A**). La excitación del cromóforo modifica la configuración de la proteína, alterando su capacidad de acción biológica.

La molécula del fitocromo puede ser dividida en dos regiones funcionales principales: 1) la región amino-terminal, que es el sensor de la señal y posee un cromóforo unido covalentemente; y 2) la región carboxi-terminal o de transducción de la señal, que contiene dos dominios relacionados a los Per/Arnt/Sim (PAS) y un dominio relacionado a los de histidina quinasa de bacterias. El dominio N-terminal es responsable de la unión al cromóforo, de la absorción de la luz y de la fotorreversibilidad (~70 kDa). El dominio C-terminal (~55 kDa) contiene varios subdominios/motivos conservados, incluyendo la secuencia reguladora core

(Quail box), dos motivos de dimerización y el dominio HKRD (*Histidine Kinase-Related Domain*). Un par de motivos PAS (*Per-Arnt-Sim*) se superponen con el Quail box (**figura 2A**).

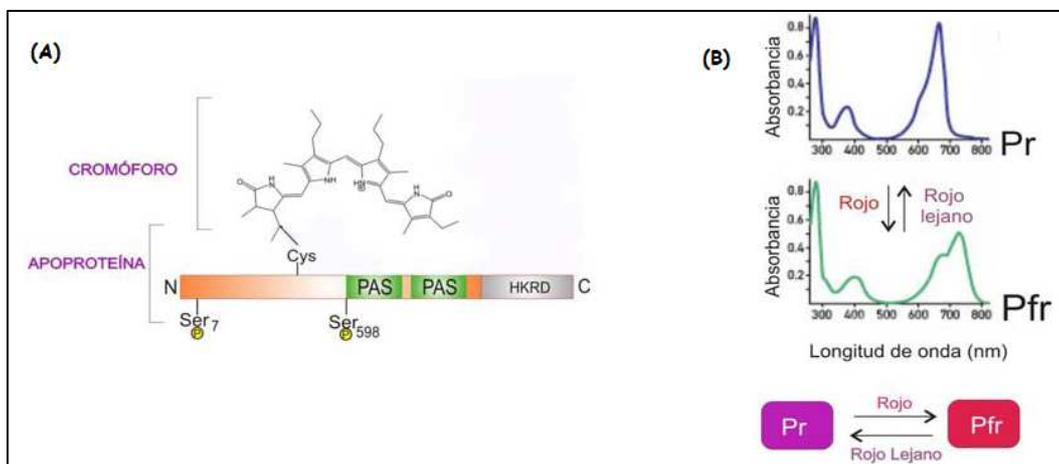


Figura 2: características de los fitocromos. (A) Esquema de la estructura del fitocromo. Los fitocromos absorben la luz con el cromóforo (un tetrapirrol lineal abierto) que está unido covalentemente en la cisteína 320 (PHYA) o 322 (PHYB) del dominio amino-terminal de la apoproteína. En las posiciones 7 y 538 se muestran las serinas que intervienen en los cambios conformacionales y en la señalización por fosforilación. El dominio carboxilo-terminal de la apoproteína contiene dos repeticiones PAS, que inician la cascada de señalización a través de la interacción con el factor PIF3 y presenta un dominio histidina-kinasa (HKRD) involucrado en la fosforilación de la proteína sustrato-kinasa del fitocromo 1 (SK1). SK1 regula negativamente la señalización del fitocromo. Tomado y modificado de Yanovsky *et al.*, 2002. (B) Espectro de absorción de los fitocromos y cambio de conformación que sufren de acuerdo a la calidad de la luz que reciben. Tomado y modificado de Shäfer y Bowler, 2002.

3.2.2.b. Modo 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 flujo de luz, el cual es definido como el número de fotones incidentes por unidad de superficie, usualmente cuantificado como micromoles de fotones por metro cuadrado ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$). Se han descrito tres modos de acción de los fitocromos; 1) la respuesta a muy bajos flujos de luz, llamada VLFR (del inglés *Very Low Fluence Response*), 2) la respuesta a bajos flujos, o LFR (del inglés *Low Fluence Response*) y 3) la respuesta a altos flujos de luz o HIR (del inglés *High Irradiance Response*) (Casal *et al.*, 1998). Cuando las semillas poseen una alta sensibilidad a la luz, la germinación puede ser inducida con un pulso saturante de RL, a través de una VLFR mediada exclusivamente por el phyA (Botto *et al.*, 1996). Como un pulso de luz RL convierte aproximadamente el 97% del Pfr a Pr, sólo el 3% Pfr remanente satura este tipo de respuesta que no puede ser revertida por el RL (Taiz y Zeiger, 1998) (**figura 3**). Por otra parte, si se establecen niveles más altos de Pfr en las semillas, por ejemplo con un pulso de luz R, la germinación es promovida por una LFR a través de la acción del phyB y otros fitocromos

estables (Botto *et al.*, 1995; Hennig *et al.*, 2002). Las proporciones de Pfr que inducen una LFR son establecidas por pulsos moderados de luz R, siendo esta respuesta revertida con un pulso de 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) (**figura 3**).

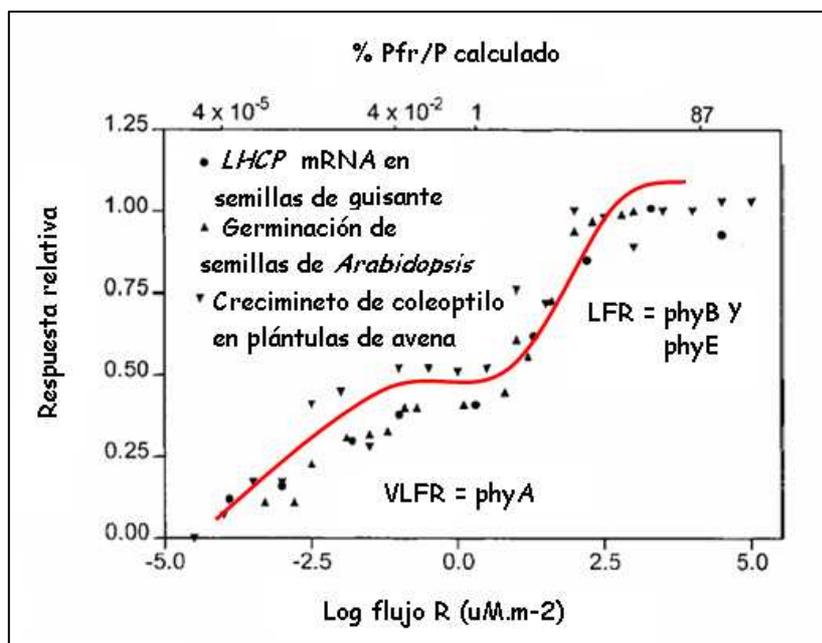


Figura 3: modos de acción de los fitocromos. Representación esquemática de los modos de acción de los fitocromos en función del fotoequilibrio calculado (Pfr/P). Tomado de Casal *et al.*, 1998.

En ciertas especies, la luz RL continua puede inhibir la germinación de las semillas a través una fotorepuesta del tipo HIR (Shichijo *et al.*, 2001; Auge *et al.*, 2009). Las respuestas de tipo HIR requieren de exposiciones prolongadas a la luz RL (Taiz y Zeiger, 1998). Estas respuestas no cumplen la ley de reciprocidad entre tiempo y cantidad de fotones y consecuentemente exposiciones continuas a la luz RL son más eficientes para inducir la respuesta HIR en comparación con los pulsos de luz RL, que suministran igual flujo total. El fotorreceptor que media las respuestas HIR es el PHYA (Shichijo *et al.*, 2001; Casal *et al.*, 2003).

3.2.2.c. Importancia ecológica del modo de acción de los fitocromos.

Durante la permanencia en el suelo, las semillas sufren alteraciones en su estado de dormición asociadas a cambios en la sensibilidad a determinados factores ambientales. Algunos de esos factores han sido propuestos como señales que perciben las semillas para inducir la germinación. Las evidencias experimentales de campo indican que las semillas de

ciertas especies son capaces de responder a cambios en el ambiente luminosos percibidos por los fitocromos, a través de la acción de diferentes modos de respuesta (VLFR, LFR y HIR).

Por ejemplo, las semillas de las malezas manifiestan cambios de sensibilidad a la luz durante la permanencia en el suelo (Botto *et al.*, 1998; Bouwmeester & Karssen, 1989; Froud-Williams *et al.*, 1984; Taylorson, 1972). Scopel y colaboradores (1991) demostraron que la sensibilidad de las semillas de *Datura ferox* a la luz se incrementa cuatro órdenes de magnitud cuando permanecen enterradas en el suelo durante dos meses, comparadas a aquellas almacenadas en seco. La exposición de las semillas a la luz durante las labores es suficiente para promover la germinación, siendo este mecanismo de percepción del disturbio esencial para promover la germinación de las semillas que necesitan luz. La inducción de la germinación en respuesta a exposiciones cortas de luz (VLFR) durante las labranzas favorecen la aparición de plántulas cuando el suelo ha sido removido y los potenciales competidores han sido eliminados (Scopel *et al.*, 1991) (**figura 4**).

Las semillas de malezas que permanecen en la superficie del suelo cuando caen de la planta madre, muchas veces no pueden germinar si están cubiertas por un canopeo, a pesar que las temperaturas sean favorables. Esto sucede porque la luz natural es filtrada por la clorofila de las hojas, que absorbe diferencialmente en el R, modificando la intensidad y la composición espectral de la luz que llega al suelo. Dependiendo de la densidad del canopeo y las características ópticas de los tegumentos, distintos fotoequilibrios pueden establecerse en las semillas. En ciertas especies, la inhibición de la germinación por relaciones R:RL bajas permite asegurar el establecimiento de nuevas plantas, sólo en ausencia de competencia con otros individuos. La respuesta de la germinación es R:RL reversible, indicando la acción de una LFR (Insausti *et al.*, 1995). En las pasturas, las semillas de *Lolium multiflorum* germinan en los espacios raleados por el pastoreo del ganado vacuno, en respuesta a cambios en la composición espectral de la luz (**figura 4**).

Deregibus y colaboradores (1994) demostraron que la germinación de las semillas de esa especie también está mediada por una LFR. Por otra parte, Vázquez-Yañes y Orozco-Segovia (1990) encontraron que las semillas de algunas especies caracterizadas de los ambientes boscosos tropicales, como *Cecropia obtusifolia* y *Piper umbellatum*, germinan cuando se incrementa la relación R:RL como consecuencia de la destrucción del canopeo.

En los ambientes agrícolas, las semillas pueden encontrarse expuestas a la luz cuando permanecen sobre suelos desnudos o cubiertas por el rastrojo. En esas condiciones, la inhibición de la germinación puede resultar favorable para la supervivencia de la especie, debido a los efectos negativos de la desecación o a la desequilibrada competencia con los individuos más grandes. Se ha sugerido que las HIRs operan inhibiendo la germinación de las semillas en alguna de esas circunstancias (Gorski *et al.*, 1978) (**figura 4**).

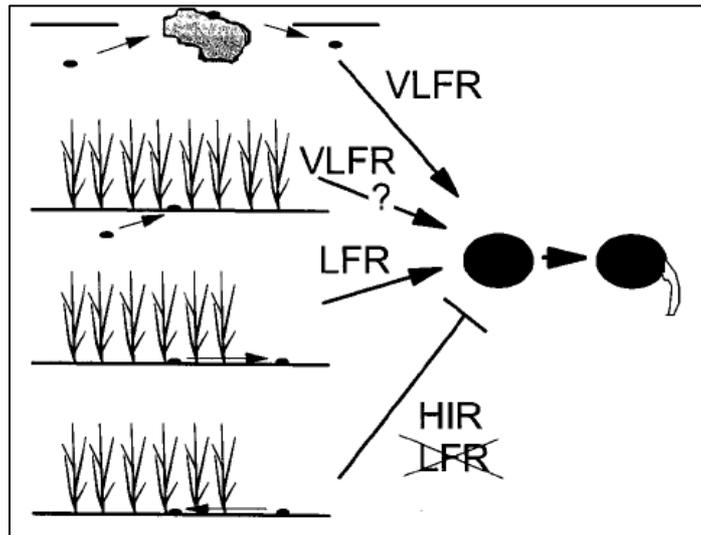


Figura 4: modos de acción de los fitocromos en el control de la germinación de semillas en diferentes condiciones de radiación natural. Tomado de Casal & Sánchez, 1998.

3.2.3. La post-maduración en seco de las semillas y la salida de la dormición.

El nivel de dormición de las semillas aumenta durante la maduración de las mismas y alcanza un máximo en las semillas maduras cosechadas (Karssen *et al.*, 1983; Ooms *et al.*, 1993). Durante el posterior almacenamiento en seco (post-maduración), el nivel de dormición se reduce hasta que las semillas son capaces de completar la germinación, cuando son embebidas en condiciones favorables (Bewley, 1997; Kucera *et al.*, 2006; Probert, 2000). El nivel de dormición y el tiempo de post-maduración requerido para germinar, varía dependiendo de las condiciones ambientales durante la maduración, el almacenamiento y las condiciones de germinación (Donohue *et al.*, 2005).

Estudios recientes demuestran que el almacenamiento en seco provoca la acumulación de nuevas proteínas (Chibani *et al.*, 2006). Esta acumulación de nuevas proteínas y la persistencia de otras existentes resultaron inhibidas tras la aplicación de ABA exógeno (Chibani *et al.*, 2006). Más aún, muchos genes que se expresan durante el almacenamiento en seco son regulados por el ABA (Nakabayashi *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que la pérdida de dormición durante el almacenamiento en seco es mediado al menos parcialmente por el ABA, y que las proteínas y mRNAs almacenados pueden participar en el proceso de pérdida de dormición.

3.2.4. Rol del ABA y las GAs en la salida de la dormición.

La dormición y la germinación de semillas son procesos regulados finamente por el balance hormonal de las giberelinas y el ácido absísico, dos hormonas cuya acción depende de la concentración y la sensibilidad en los tejidos. La dormición depende del equilibrio intrínseco de la biosíntesis y catabolismo de GA y de ABA, que determinará el predominio de cualquiera de las hormonas (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Cadman *et al.*, 2006). El aumento de la dormición se caracteriza por el aumento de la biosíntesis de ABA y la degradación de GA; en oposición a lo que ocurre con la disminución del nivel de dormición en la cual aumenta la biosíntesis de GA activas y la degradación de ABA en las semillas.

La síntesis y acumulación de ABA son necesarias tanto para la inducción como para el mantenimiento de la dormición (Wang *et al.*, 1995; Debeaujon *et al.*, 2000; Grappin *et al.*, 2000; Holdsworth, *et al.*, 2008). En la actualidad son muchos los datos experimentales que ponen de manifiesto el importante rol del ABA en el desarrollo de la dormición primaria (Koornneef *et al.*, 2002; Gubler *et al.*, 2005), ya que la deficiencia de ABA durante el desarrollo de la semilla está asociado con la ausencia de dormición primaria en semillas maduras, mientras que la sobreexpresión de genes de la biosíntesis de ABA incrementa la dormición de las semillas o retrasa su germinación (Finkelstein *et al.*, 2002; Nambara y Marion-Poll, 2003; Kushiro *et al.*, 2004). En este sentido, se ha demostrado una correlación entre el contenido de ABA y el grado de dormición en semillas de cebada (Jacobsen *et al.*, 2002) y en el ecotipo Cvi de *Arabidopsis* (Ali-Rachedi *et al.*, 2004) durante su imbibición, donde la disminución en los niveles de ABA precede a la germinación de las semillas. Mediante diversos análisis genéticos y de expresión de genes específicos que codifican enzimas claves en el metabolismo del ABA, se han identificado, en *A. thaliana*, algunos miembros de la familia *NECD* (9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa, *NECD6* y *NECD9*) esenciales para la síntesis de ABA tanto en el embrión como en el endosperma durante la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006). Además de estos genes relacionados con el mantenimiento de la dormición, también se han identificado genes relacionados con la salida de la misma a través de la vía del catabolismo del ABA, como *CYP707A2* (Millar *et al.*, 2006; Cadman *et al.*, 2006).

Las giberelinas actúan en la salida de la dormición de las semillas y estimulan la germinación mediante la inducción de enzimas hidrolíticas que actúan en la región micropilar y atenúan las barreras que impiden el crecimiento del embrión (Bewley y Black, 1994). Durante la post-maduración y la estratificación se incrementa la sensibilidad a las GAs (Derkx *et al.*, 1993; Yamauchi *et al.*, 2004). Desde un punto de vista molecular, hay evidencias que estos tratamientos que provocan la salida de la dormición van a producir un incremento en los niveles de expresión de genes relacionados con la síntesis de GAs activas, como GA3 oxidasa o GA20 oxidasa, mientras que van a disminuir los transcritos relacionados con su catabolismo, como la GA2 oxidasa (Yamauchi *et al.*, 2004; Finch-Savage *et al.*, 2007).

3.3. Influencia del ambiente materno sobre la dormición de las semillas.

Desde 1909, diversos estudios reconocen que existen efectos maternos que contribuyen sustancialmente al fenotipo de la descendencia (Roach & Wulff, 1987). La planta madre puede afectar a su descendencia por más de un mecanismo: genético, herencia no mendeliana (Ej. extracromosomal o citoplasmática), o por medio de información que se pasa a la descendencia a través de químicos producidos por la planta madre (Roach & Wulff, 1987; Baskin & Baskin, 1998).

Hay numerosos trabajos que demuestran efectos del ambiente materno sobre las semillas. Entre otros, Boyd y colaboradores (2007) encontraron que la posición de la semilla en la planta materna también tiene consecuencias sobre la respuesta de la germinación. Por otra parte Alboresi y colaboradores (2005) demostraron que plantas que fueron regadas con niveles altos de nitrato presentaron niveles reducidos de dormición con respecto a las semillas cosechadas de plantas con bajos niveles de nitrato, sugiriendo que el nivel nutricional de la planta madre afecta la germinación de las semillas.

En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado que el tiempo de germinación está bajo una intensa selección natural que depende de la ubicación geográfica de origen de los individuos (Donohue *et al.*, 2005b; Huang *et al.*, 2010) que determina diferencias en el tiempo de floración que afecta el ambiente en el que se desarrollan y maduran las semillas (Donohue, 2009). Las señales ambientales durante la etapa de maduración de las semillas, como el fotoperíodo y la temperatura, pueden influenciar los niveles de dormición de las semillas en su dispersión (Donohue *et al.*, 2005c, 2007, 2008). Schmuths y colaboradores (2006) demostraron que las semillas de *Arabidopsis* maduras a una temperatura de 22°C presentaron mayores niveles de germinación que aquellas maduras a una temperatura de 14°C. Los efectos maternos térmicos son más importantes que los efectos fotoperiódicos como fuera demostrado por Donohue y colaboradores (2007)

3.4. Variación genética natural y la dormición de las semillas.

Arabidopsis thaliana presenta una distribución natural en todo el hemisferio norte (Hoffman, 2002) desde el norte de Escandinavia hasta África, incluyendo Islas de Cabo Verde, situadas en el océano Atlántico (**figura 5**). La distribución cosmopolita de esta especie y su rango de adaptación a distintos ambientes permite que las semillas de diferentes accesiones de *Arabidopsis* presenten una importante variación genética en los niveles de dormición de las semillas encontrándose genotipos con baja dormición (por ejemplo, Ler) y otros con alto nivel de dormición (por ejemplo CVi).

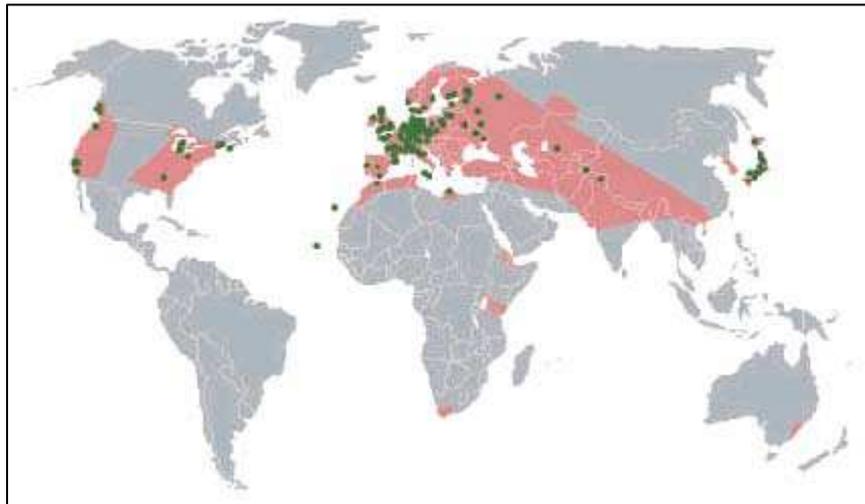


Figura 5: distribución geográfica de *Arabidopsis thaliana* en el mundo. Las regiones coloreadas corresponden a zonas en las que se han aislado individuos (Rédei, 1970). Los puntos representan los lugares en los que se han aislado las distintas accesiones o ecotipos de esta crucífera. Tomado y modificado de Alonso-Blanco y Koornneef, 2000.

Utilizando la variación genética natural entre dos accesiones contrastantes en su nivel de dormición (Ler y Cvi) y mediante aproximaciones de genética cuantitativa de mapeos genéticos en una población de líneas recombinantes y endocriadas, se identificaron siete QTLs (Quantitative Trait Loci) denominados *Delay Of Germination (DOG)*, que controlan la salida de la dormición por post-maduración (*DOG1* a *DOG7* QTL). Una vez identificado y confirmado *DOG1* QTL, el gen responsable fue aislado por medio de técnicas de clonación posicional y análisis de mutantes (Bentsink *et al.*, 2006). Chiang y colaboradores (2011) demostraron que la plasticidad de expresión del gen *DOG1* depende de efectos maternos asociados con la localización geográfica de maduración de las semillas, siendo las accesiones provenientes del sur las que expresan niveles más altos de *DOG1* y consecuentemente las semillas presentan un mayor nivel de dormición.

La ausencia de *DOG1* disminuye el nivel de dormición y la sensibilidad al ABA, sugiriendo que es una proteína involucrada en la vía de señalización del ABA (Bentsink *et al.*, 2006). Por otra parte, nuestro laboratorio demostró que *dog1* tiene una mayor respuesta cuando la germinación es inducida con muy bajos niveles de Pfr, sugiriendo que *DOG1* puede afectar diferencialmente la vía de acción del phyA (Laserna *et al.*, 2008). Estas evidencias experimentales sugieren además que *DOG1* es un actor importante en el control de la germinación por luz. Si bien se sabe que *DOG1* es necesario para imponer dormición primaria, nuestro grupo de trabajo demostró que puede también condicionar la entrada en dormición secundaria (Tognacca *et al.*, 2011).

DOG1 está codificado por el gen At5g45830 y es miembro de una familia génica con funciones moleculares aún desconocidas. *DOG1* tiene *splicing*, se expresa tempranamente

durante el desarrollo de la semilla y sus efectos van disminuyendo con la post-maduración (Bentsink *et al.*, 2006). La estructura de *DOG1* consiste en 3 exones y 2 intrones. Existe un set de cuatro transcritos diferentes (α , β , γ , δ), que codifican 3 isoformas de la proteína, ya que β y γ presentan un codón *stop* en la misma posición. La mutante *dog1-1* presenta una delección de 1 bp en el segundo exón que causa un corrimiento del marco de lectura y un codón *stop* prematuro (Bentsink *et al.*, 2006) (**figura 6**).

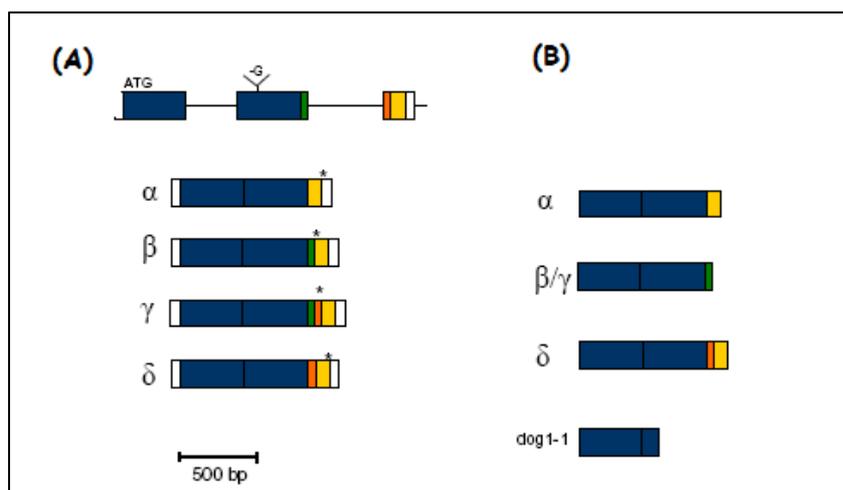


Figura 6: representación esquemática de la estructura génica de *DOG1*, transcritos surgidos del *splicing* alternativo y sus correspondientes variantes proteicas. (A) Estructura del gen *DOG1* y posición de la mutación del *dog1-1* (arriba) y las cuatro variantes del *splicing* (α a δ). La posición de la mutación en el mutante *dog1-1* (-G) se indica en la parte superior de la estructura genómica, la posición del codón de stop se indica con un *. Los rectángulos blancos indican los 5' y 3' UTR. (B) Estructura de las tres isoformas proteicas que resultan del *splicing* alternativo y la potencial proteína truncada del mutante *dog1-1*. Tomado y modificado de Bentsink *et al.*, 2006.

3.5. El modelo molecular de la germinación de las semillas.

En años recientes hemos avanzado mucho en la comprensión de los mecanismos moleculares que controlan la germinación de las semillas (Oh *et al.*, 2007). En semillas de *Arabidopsis* embebidas oscuridad, PIL5 activa la expresión de las proteínas DELLA, entre ellas a GAI, RGA y otros factores desconocidos (Xs), uniéndose directamente a sus promotores por medio de los elementos G-box. Los factores Xs reprimen los genes de biosíntesis de GA y catabolismo de ABA y activan los genes catabólicos de GA y de biosíntesis de ABA, lo que resulta en bajos niveles de GA y altos niveles de ABA. Esta disminución en los niveles de GA activas ayuda a estabilizar a las proteínas GAI y RGA. Por otra parte, el aumento en los niveles

de ABA aumenta los niveles de ABI3 y ABI5, activando en consecuencia las respuestas mediadas por el ABA (figura 7).

A la luz, las formas Pfr de PHYA y de PHYB entran en el núcleo, se unen a PIL5 y activan su degradación por el proteasoma 26S (Huq *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2004, 2006). Los bajos niveles de PIL5 reducen los niveles de GAI, RGA y Xs, y aumentan los niveles de GA y disminuye los de ABA. Así, las GAs bioactivas promueven la germinación activando la degradación de GAI, RGA.

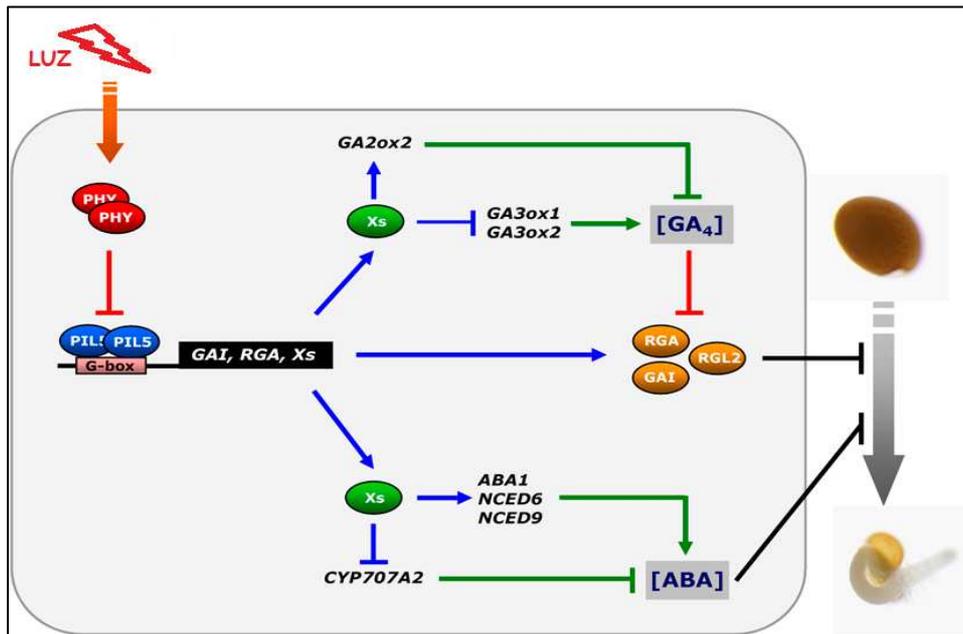


Figura 7: modelo molecular de los eventos que conducen a la germinación en *A. thaliana*. En oscuridad, PIL5 activa la expresión de varios genes, entre ellos GAI, RGA y Xs, uniéndose directamente a sus promotores por medio de los G-box. Esto resulta en niveles elevados de sus proteínas. La acción de los Xs resulta en niveles bajos de GA y altos de ABA. La disminución de los niveles de GA estabiliza a las DELLAs, lo que suprime las respuestas de las GAs. A la luz, los fitocromos inducen la degradación de PIL5, resultando en niveles proteicos reducidos de GAI, RGA y ABA. Como resultado se inician varios procesos fisiológicos, entre ellos, la movilización de moléculas de almacenamiento y la hidrólisis de la pared celular, por lo que las semillas eventualmente germinarán. Líneas rojas: eventos a nivel proteico, líneas azules: eventos a nivel transcripcional, líneas verdes: eventos vía actividad enzimática. Tomado y modificado de Oh *et al.*, 2007.

3.6. Arabidopsis thaliana como planta modelo de estudio.

Arabidopsis thaliana, una pequeña dicotiledónea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, se ha convertido en el sistema modelo predominante en la biología de las plantas debido a la oportunidad de realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y genéticos (Meinke *et al.*, 1998;

Meyerowitz, 2002; Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meyerowitz, 1987; Meyerowitz, 1989; Bowman, 1994; Meyerowitz, 2001).

Arabidopsis reúne una serie de características que la han convertido en el objeto de estudio por excelencia de la mayoría de los laboratorios. Una de ellas es su pequeño tamaño, unos 30 cm de altura, que permite siembras de hasta 10.000 plantas/m² (Meyerowitz, 1987). Además, presenta un corto ciclo de vida de alrededor de 6 semanas, permitiendo la obtención de hasta 8 generaciones al año en determinadas condiciones de cultivo (ej.: 25°C e iluminación continua). Se trata de una especie autógena y muy prolífica, pudiendo conseguir hasta 10.000 semillas por planta. Las semillas pueden almacenarse varios años a temperatura ambiente, con escasa pérdida de su viabilidad (Bowman, 1994). Puede ser fácilmente cultivada tanto en invernáculos como en cámaras climáticas. Posee uno de los genomas más pequeños entre las plantas superiores de aproximadamente 130 Mb (megabases) divididas en 5 cromosomas. Su genoma se encuentra secuenciado por completo (AGI, Arabidopsis Genome Initiative, 2000) y consta de 26.000 genes aproximadamente.

3.7. Justificación de la metodología del trabajo.

Este trabajo surge a partir de mi incorporación a una línea de investigación que se está llevando a cabo en el laboratorio del Dr. Botto. Los resultados previos de la caracterización fenotípica de *dog1* (mutante de *DOG1*) demostraron que *DOG1* inhibe la germinación de semillas mediada por el *phyA* (Laserna *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2010). Con la idea de entender mejor cuál es la función de *DOG1* en las vías de señalización del *phyA* y *phyB*, se construyeron mutantes dobles de *DOG1* con *phyA* y *phyB* (*phyAdog1* y *phyBdog1*). La idea de esta tesis es estudiar y caracterizar estos nuevos y no publicados materiales genéticos, tanto en las respuestas de salida de la dormición y promoción de la germinación de las semillas, como también caracterizar fenotípicamente a estos materiales en el estadio vegetativo y floral cuando las plantas son cultivadas en distintos ambientes de temperatura y luz.

4. OBJETIVOS.

- 1) Caracterizar el fenotipo de plantas mutantes de DOG1 (*dog1*, *phyAdog1* y *phyBdog1*) cultivadas en distintos ambientes de luz y temperatura.

- 2) Estudiar la función de DOG1 en la germinación por luz de semillas de *A. thaliana* cosechadas de plantas cultivadas en distintos ambientes de luz y temperatura.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Genotipos utilizados y construcción de las mutantes.

El material genético que se utilizó para este trabajo, se generó previamente en el laboratorio, por la Lic. Ibarra. Para ello se utilizaron semillas de los siguientes genotipos: Col-0 (WT), mutante de DOG1 (*dog1*), mutante de PHYA (*phyA*), mutante de PHYB (*phyB*), doble mutante de PHYA y DOG1 (*phyAdog1*) y doble mutante de PHYB y DOG1 (*phyBdog1*).

La construcción de las dobles mutantes entre DOG1, PHYA Y PHYB se ha generado a partir de la cruce de las mutantes simples de fitocromos *phyA* (salk_014575.56), *phyB* (salk_022035) y *dog1* (salk_000867) provenientes del banco de semillas ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center). El hecho de utilizar mutantes nulas de inserción de T-DNA permitió identificar las dobles mutantes homocigotas para cada gen (PHYA, PHYB y DOG1) mediante la técnica de PCR. Los materiales obtenidos a partir de esta metodología fueron: *phyAdog1* y *phyBdog1*.

5.2. Efecto materno según la temperatura de cultivo de la planta madre.

5.2.1. Condiciones de germinación y crecimiento de plantas generales.

Las semillas de todos los genotipos de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas directamente sobre recipientes plásticos de 110 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (2:2:1). Para su crecimiento se utilizó solución nutritiva de Hakaphos® violeta (13-40-13+MgO+M.E). Las plantas fueron cultivadas inicialmente a 20°C y 24 horas luz (65 μmol/m²/s de irradiancia, tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54), hasta el establecimiento de 2 pares de hojas (entre 10 y 15 días aproximadamente), momento en el que se pasaron a las distintas incubadoras seteadas a las correspondientes temperaturas (15°C y 25°C), excepto aquellas cuya temperatura de crecimiento fuera 20°C, que se mantuvieron en dicha cámara.

Para las plantas que fueron cultivadas a 15°C y 25°C, se utilizaron incubadoras Nuaire bajo condiciones de temperatura controlada, sin variación alguna, en luz blanca continua (24 horas luz, 65 μmol/m²/s de irradiancia, tubos fluorescentes Philips TLD 15W/54).

Los genotipos requeridos para cada experimento fueron cultivados en simultáneo y sus semillas cosechadas una a una en el momento en que las silicuas estuvieran completamente secas. Las semillas fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a 20°C y oscuridad.

5.2.2. Mediciones de los parámetros fisiológicos.

- ✓ Medición del tiempo de floración en días: se contaron los días transcurridos desde la fecha de siembra hasta el momento en que el escapo floral midiera 1 centímetro aproximadamente.
- ✓ Medición del diámetro de roseta: a cada planta se le midió la roseta con una regla, tomando para la medición las 2 hojas más largas de la misma.
- ✓ Medición del tiempo a floración en número de hojas: a cada planta se le contó el número total de hojas principales en la roseta como indicador de la duración de la fase vegetativa (Poethig, 1990), sin incluir los cotiledones.
- ✓ Medición del largo de pecíolo: a cada planta se le midió el largo de pecíolo de una hoja del 2º par de hojas.

5.2.3. Ensayos de germinación con las semillas obtenidas.

- ✓ Experimentos de post-maduración:

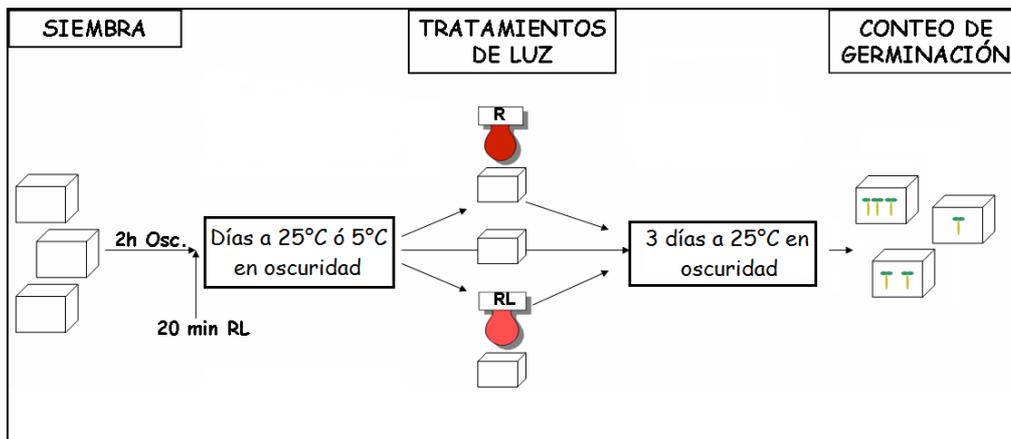
Los experimentos de post-maduración se realizaron a los 60, 120 y 300 días posteriores a la cosecha. Para ello muestras de 20 semillas se sembraron en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas imbibidas por 2 horas se irradiaron con un pulso saturante de rojo lejano (RL, 20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 25°C por 3 días. Luego se irradiaron por 20 minutos con un pulso saturante de rojo (R) estableciendo una relación Pfr/P de 0,87 ($35 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o fueron mantenidas en oscuridad. Luego de los tratamientos de luz, las cajas de plástico se envolvieron nuevamente con las bolsas y se incubaron a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la aparición de la radícula.

- ✓ Experimentos de estratificación:

Muestras de 20 semillas se sembraron en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas imbibidas por 2 horas se irradiaron con un pulso saturante de rojo lejano (RL, 20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 5°C por 24 horas. Luego se irradiaron por 20 minutos con un pulso saturante de rojo (R) estableciendo una relación Pfr/P de 0,87 ($35 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o fueron mantenidas en oscuridad. Luego de los tratamientos de luz, las

cajas de plástico se envolvieron nuevamente con las bolsas y se incubaron a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la aparición de la radícula.

A continuación se esquematiza el método de trabajo empleado para los ensayos arriba mencionados de germinación.



Esquema general de trabajo en los ensayos de germinación.

5.3. Efecto materno según la calidad de luz que recibe la planta madre.

5.3.1. Condiciones de germinación y crecimiento de plantas generales.

Las semillas de todos los genotipos de *Arabidopsis thaliana* fueron sembradas directamente sobre recipientes plásticos de 110 cm³ con una mezcla de vermiculita, perlita y turba (2:2:1). Para su crecimiento se utilizó solución nutritiva de Hakaphos® violeta (13-40-13+MgO+M.E). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de invernáculo hasta el establecimiento de 2 pares de hojas (entre 10 y 15 días aproximadamente), momento en el que se pasaron debajo de los filtros verdes (Lee Filtres N° 089, estableciendo una relación R:RL=0.17±0,05) y difusores (Lee Filtres N°216, estableciendo una relación R:RL=1.02±0,02).

Los genotipos requeridos para cada experimento fueron cultivados en simultáneo y sus semillas cosechadas en el momento en que las silicuas estuvieran completamente secas. Las semillas fueron almacenadas en tubos abiertos dentro de un recipiente hermético provisto con sílica gel a 20°C y oscuridad.

A continuación se muestra una fotografía (**foto 1**) donde se observa el sistema de filtros empleado:



Foto 1: sistema de filtros empleado. Se muestra la disposición de los cajones con sus respectivos filtros verdes (reducen la relación R:RL, sombreado) y filtros neutros (control). Se aclara que el cajón de la izquierda de la fotografía fue elevado para que las bandejas se encuentren a la misma distancia de los filtros en todos los cajones. En la parte superior de los cajones se encuentran los filtros, y los laterales y fondo de los mismos se encuentran forrados con papel aluminio para evitar, en el caso de los filtros verdes, que las plantas perciban luz blanca.

5.3.2. Mediciones de los parámetros fisiológicos.

Se procedió a la medición de los siguientes parámetros, como fuera explicado en el punto 5.2.2. (apartado Materiales y Métodos): tiempo a floración en días, diámetro de roseta, tiempo a floración en número de hojas y largo de pecíolo.

5.3.3. Ensayos de germinación con las semillas obtenidas.

Muestras de 20 semillas se sembraron en cajas de plástico (40 x 33 x 15 mm) cada una conteniendo 5mL de 0,8 % (p/V) de agar en agua destilada. Para evitar efectos indeseados de proporciones relativamente altas de Pfr presentes en las semillas secas, las semillas imbibidas por 2 horas se irradiaron con un pulso saturante de rojo lejano (RL, 20 minutos) para establecer un mínimo fotoequilibrio en orden de reducir la germinación en la oscuridad lo más posible. Las cajas se envolvieron con bolsas plásticas negras y se incubaron a 5°C por 0, 3 y 7 días. Luego se irradiaron por 20 minutos con un pulso saturante de rojo (R) estableciendo una relación Pfr/P de 0,87 ($35 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) o fueron mantenidas en oscuridad. Luego de los tratamientos de luz, las cajas de plástico se envolvieron nuevamente con las bolsas y se incubaron a 25°C por 72 horas antes de determinar la germinación. El criterio de germinación fue la aparición de la radícula.

5.4. Análisis estadísticos realizados.

- ✓ Los resultados de los parámetros fisiológicos fueron analizados por la prueba de t, comparando los diferentes genotipos contra el control. Se utilizó además el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los efectos lumínicos o térmicos sobre los parámetros.

- ✓ Los resultados de los ensayos de germinación fueron analizados por ANOVA de dos o tres factores seguido de un test de Bonferroni (comparando contra el WT) utilizando el software InfoStat. Previo al análisis estadístico, se realizó la transformación de Bliss sobre los porcentajes de germinación.

6. RESULTADOS.

6.1. Rol de DOG1 en el fenotipo de las plantas cultivadas en distintos ambientes de temperatura y luz.

6.1.1. Efectos de la temperatura en el ambiente de cultivo sobre el crecimiento vegetativo y la floración.

Se evaluó la función de DOG1 y sus posibles interacciones con el phyA y el phyB sobre el crecimiento vegetativo de las plantas cultivadas a distintas temperaturas en cámaras de luz blanca continua. Se evaluó el diámetro de roseta y largo de pecíolo. La **figura 1** muestra que todos los genotipos cultivados a 25°C presentaron un fenotipo de roseta mucho más pequeña respecto a las plantas cultivadas a 15°C y 20°C ($P < 0,0001$). El mutante de phyA presentó una roseta significativamente más pequeña que el WT en plantas cultivadas a 15°C (**figura 1b**), mientras el mutante de phyB presentó una roseta significativamente mayor que el WT a 15°C y 20°C (**figura 1d**). A mayores temperaturas (i.e., 25°C), el diámetro de roseta del doble mutante *phyBdog1* fue significativamente menor respecto al WT (**figura 1e**). En estas condiciones experimentales, la mutación simple de DOG1 no tuvo efectos significativos sobre el diámetro de roseta (**figura 1a**).

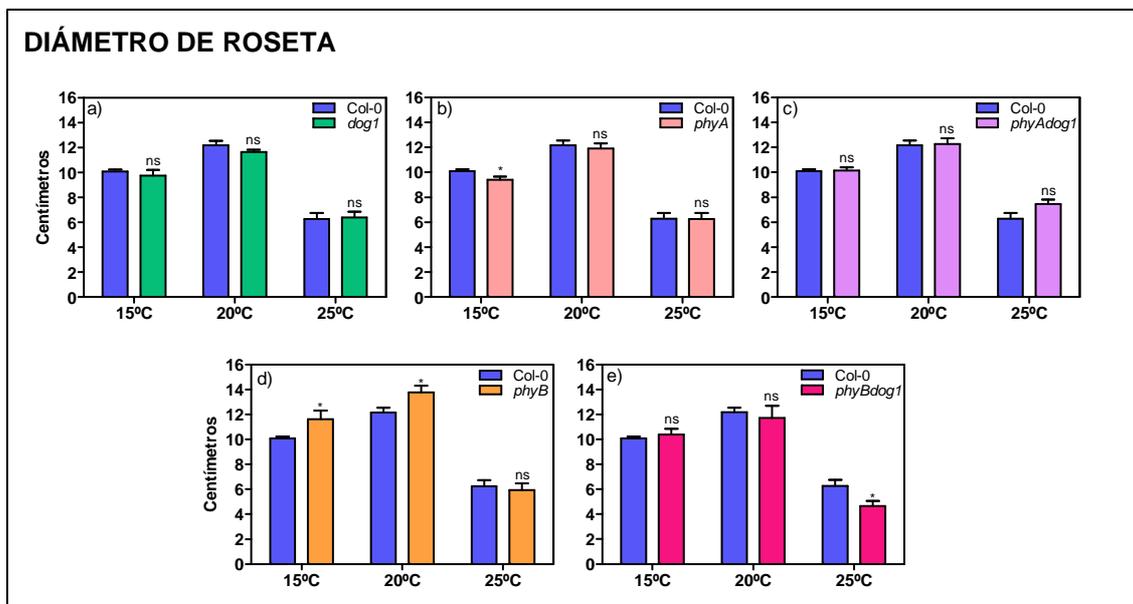


Figura 1: efectos de la temperatura sobre el diámetro de roseta. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de luz blanca continua a 15°C, 20°C y 25°C. La medición se realizó luego de que abriera la primera flor. Las barras representan la media ± ES (n ≥ 5). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). *P < 0.05 y ns = no significativo.

Otro parámetro vegetativo que se evaluó fue el largo de pecíolo. *DOG1* no afectó este parámetro en ninguna de las temperaturas evaluadas (**figura 2a**). Se observa que la falta conjunta de *phyA* y de *DOG1* disminuyó el largo del pecíolo sólo a 15°C respecto al WT (**figura 2c**). Además, *phyB* presentó pecíolos significativamente más largos que el WT en todo el rango térmico (**figura 2d**). Lo mismo sucede con la doble mutante *phyBdog1* (**figura 2e**).

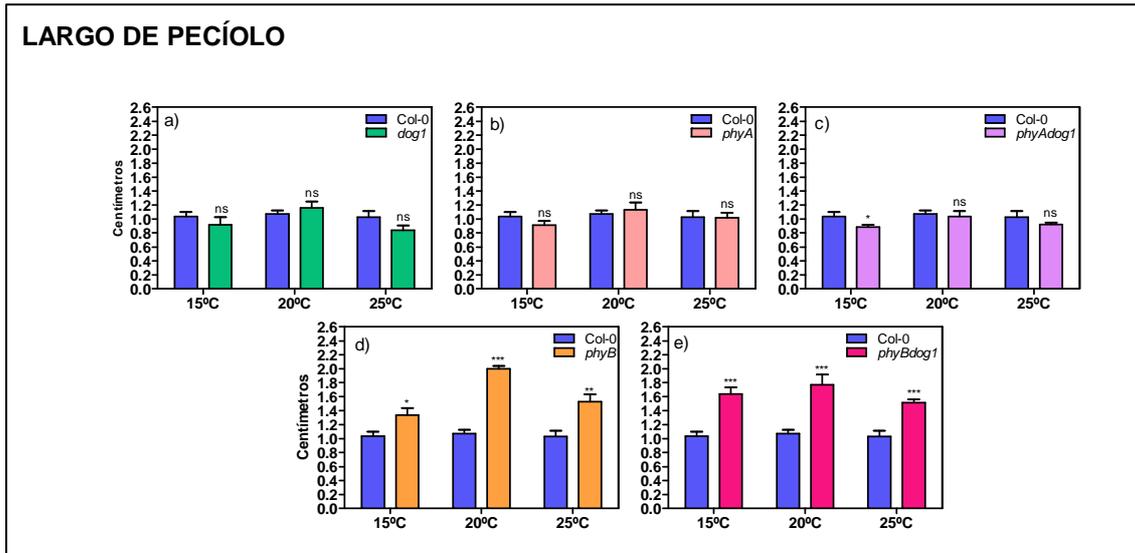


Figura 2: efectos de la temperatura sobre el largo de pecíolo. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de luz blanca continua a 15°C, 20°C y 25°C. La medición se realizó sobre una hoja del 2° par. Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 5$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y ns=no significativo.

Entre los parámetros florales, se evaluó el tiempo a floración (en días y hojas). El tiempo a floración de las plantas salvajes (Col-0) cultivadas en condiciones de luz blanca continua y a temperaturas de 20°C y 25°C se aceleró entre 10 y 8 días con respecto a las plantas cultivadas a 15°C ($P < 0,0001$) (**figura 3**). En estas condiciones, el mutante *dog1* presentó un mayor tiempo a floración que el WT a 20°C, mientras que el *phyB* y el *phyBdog1* presentaron un menor tiempo a 25°C que el WT (**figura 3d** y **figura 3e**).

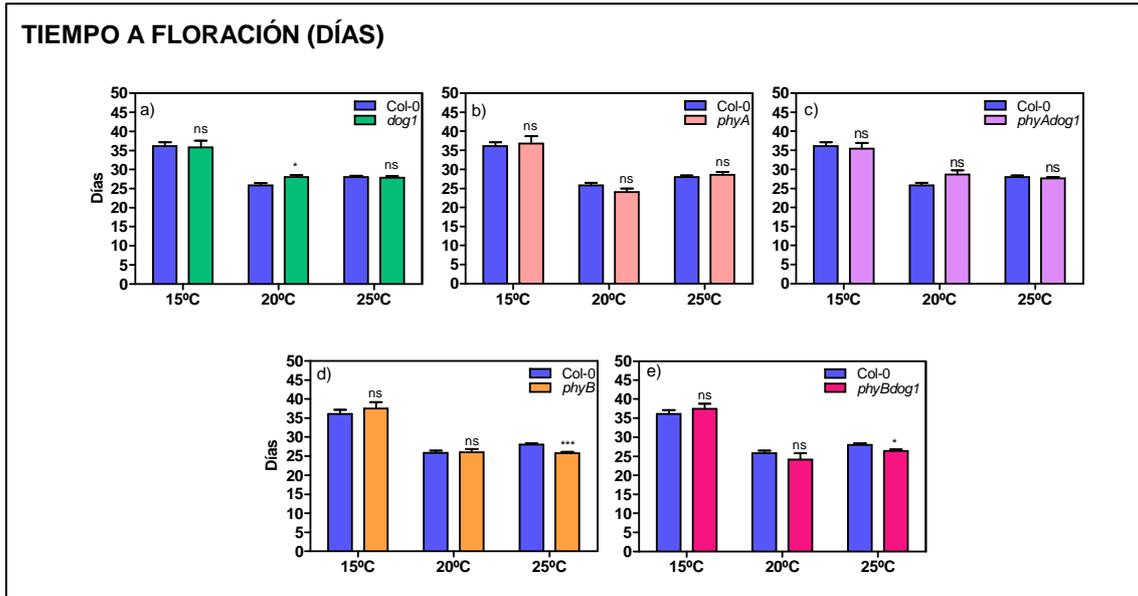


Figura 3: efectos de la temperatura sobre el tiempo a floración (días). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de luz blanca continua a 15°C, 20°C y 25°C. El tiempo a floración en días se tomó desde la siembra hasta la aparición del escapo floral (1 cm de longitud). Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 5$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ y ns=no significativo.

Estos resultados son confirmados cuando se evalúa el número de hojas vegetativas a floración (**figura 4**). Se observa una tendencia a un mayor número de hojas en plantas *dog1* con respecto a Col a 20°C, aunque las diferencias no fueron significativas (**figura 4a**). El mutante de *phyB* presentó un menor número de hojas en plantas cultivadas a 25°C que el WT (**figura 4d**) y la falta combinada de *phyB* y *DOG1* en las plantas hizo que las mismas presentaran un menor número de hojas a 20°C y a 25°C que el WT (**figura 4e**).

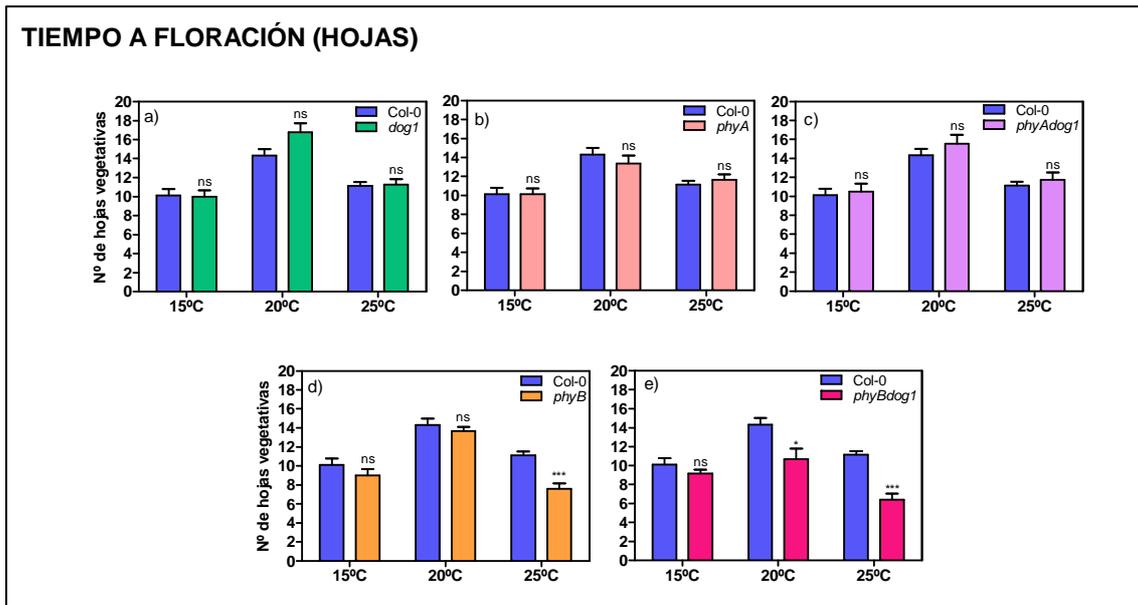


Figura 4: efectos de la temperatura sobre el tiempo a floración (número de hojas vegetativas). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de luz blanca continua a 15°C, 20°C y 25°C. El tiempo a floración en hojas se tomó sobre las hojas de la roseta, sin los cotiledones. Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 5$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ y ns=no significativo.

6.1.2. Efectos de la calidad de luz en el ambiente de cultivo sobre el crecimiento vegetativo y la floración.

En otro ensayo conducido en condiciones de invernáculo, se evaluó la función de DOG1 y sus posibles interacciones con el phyA y el phyB sobre el crecimiento vegetativo de las plantas cultivadas a alta o baja relación de luz Rojo:Rojo-Lejano (R:RL=1.02±0,02 y 0.17±0,05, respectivamente). Se evaluó el diámetro de roseta y el largo de pecíolo. La **figura 5** muestra que todas las plantas cultivadas bajo el filtro verde, que establece una baja relación de luz R:RL, presentaron una disminución en el diámetro de roseta ($P < 0,0001$). Cuando se compara el fenotipo de las plantas mutantes con respecto a Col, *dog1* presentó una roseta significativamente menor que el WT en alta relación R:RL (**figura 5a**); mientras que el mutante de phyA y el doble mutante *phyAdog1* presentaron una roseta significativamente mayor que el WT cuando fueron cultivadas en condiciones de baja relación R:RL (**figura 5b** y **figura 5c**).

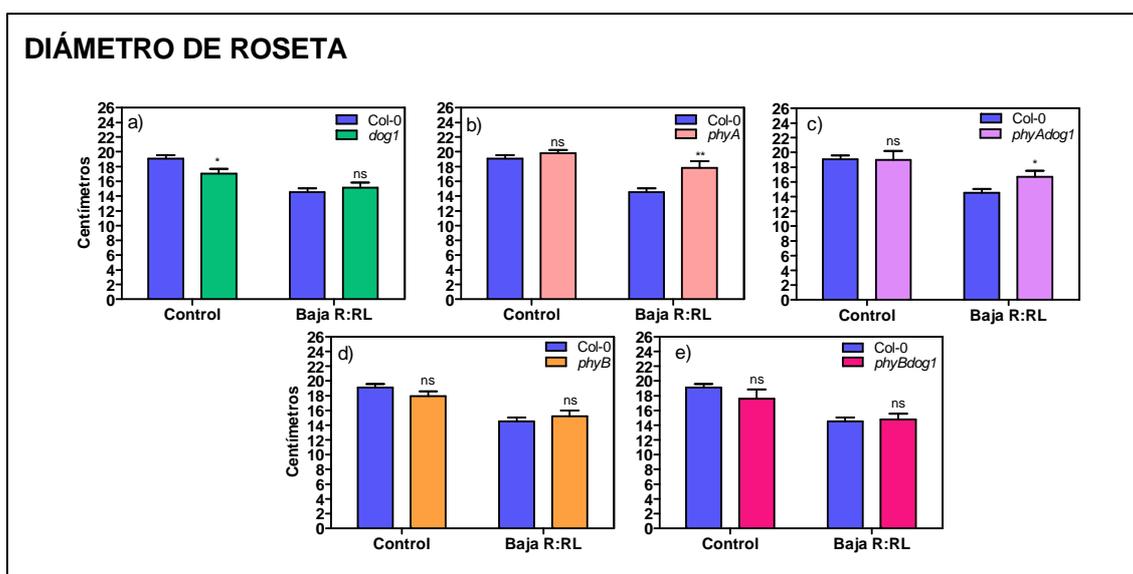


Figura 5: efectos de la calidad de luz sobre el diámetro de roseta. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de alta y baja relación R:RL. La medición se realizó luego de que abriera la primera flor. Las barras representan la media ± ES (n≥7). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). *P<0.05, **P<0.01 y ns=no significativo.

Otro parámetro vegetativo que se evaluó fue el largo de pecíolo. Se observa que las plantas cultivadas con baja relación R:RL mostraron pecíolos más largos que las plantas cultivadas bajo filtro neutro ($P=0.0001$, **figura 6**). La mutante *dog1* no presentó diferencias respecto al WT por cambios en la relación R:RL en el ambiente de cultivo (**figura 6a**). Las plantas deficientes en *phyA* y en *phyB* presentaron pecíolos mayores que el WT cuando las plantas fueron cultivadas en condiciones de baja relación R:RL (**figura 6b** y **figura 6d**) al igual que el doble mutante *phyBdog1* (**figura 6e**).

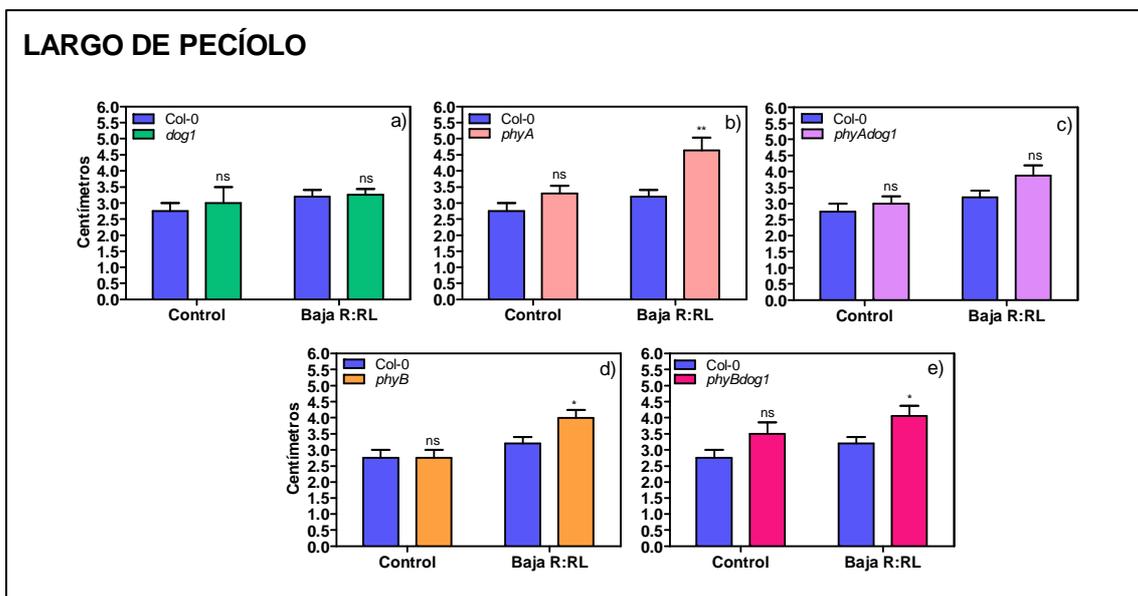


Figura 6: efectos de la calidad de luz sobre el largo de pecíolo. Las plantas fueron cultivadas en condiciones de alto y bajo R:RL. Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 7$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y ns=no significativo.

Entre los parámetros florales, se evaluó el tiempo a floración (en días y hojas). Sólo presentaron diferencias significativas respecto al WT las simples mutantes *dog1* y *phyA*, que mostraron un tiempo mayor a floración en días cuando las plantas fueron cultivadas a alta relación R:RL (figura 7a y figura 7b).

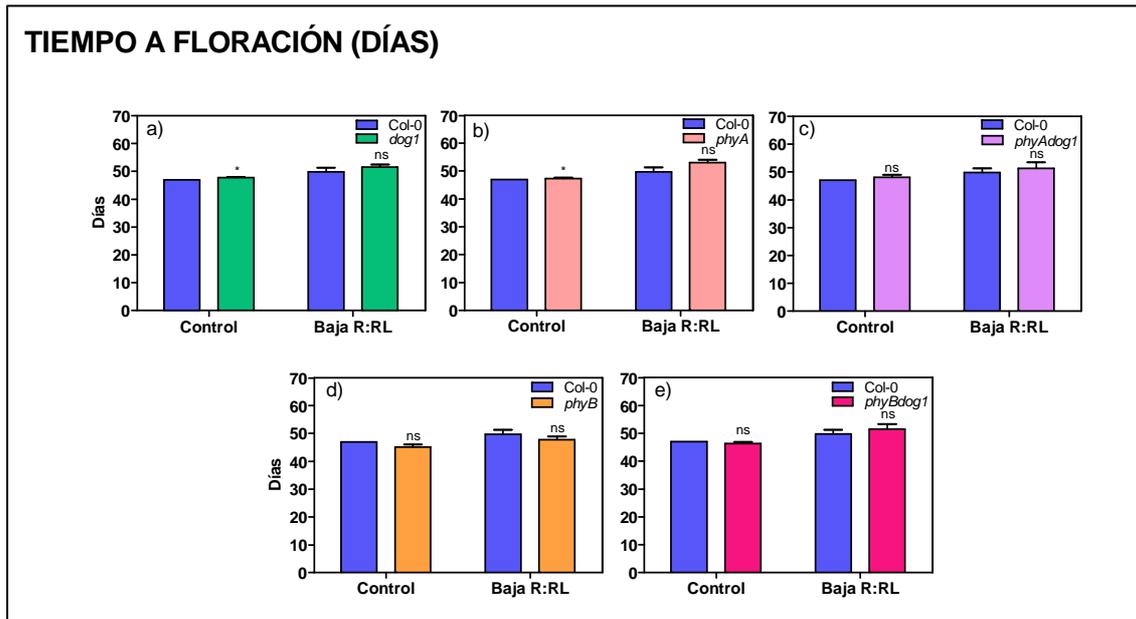


Figura 7: efectos de la calidad de luz sobre el tiempo a floración (días). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de alta y baja relación R:RL. El tiempo a floración en días se tomó desde la siembra hasta la aparición del escape floral (1 cm de longitud). Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 7$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). * $P < 0.05$ y ns=no significativo.

La **figura 8** muestra el número de hojas de la roseta al momento de la floración. La baja relación R:RL redujo el número de hojas vegetativas con respecto a las plantas cultivadas en el tratamiento control ($P=0,0013$). Las plantas *dog1* presentaron un menor número de hojas a floración que Col-0 en el tratamiento control.

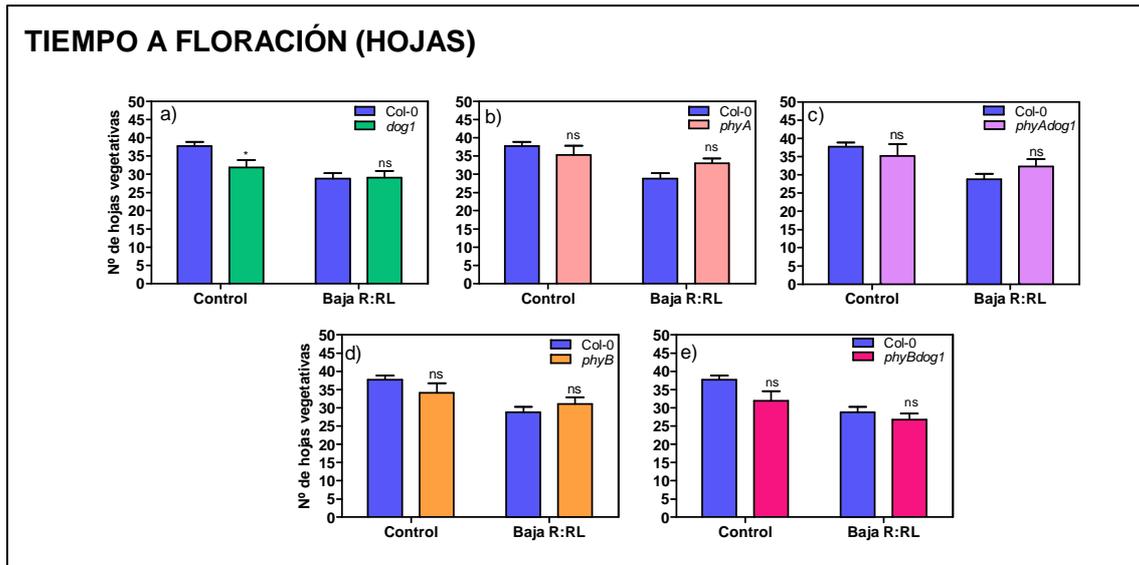


Figura 8: efectos de la calidad de luz sobre el tiempo a floración (número de hojas vegetativas). Las plantas fueron cultivadas en condiciones de alta y baja relación R:RL. El tiempo a floración en hojas se tomó sobre las hojas de la roseta sin los cotiledones. Las barras representan la media \pm ES ($n \geq 7$). Se realizó una prueba de t comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). $p < 0.05$ y ns=no significativo.

6.2. Efectos maternos sobre la germinación de las semillas.

6.2.1. Efectos maternos asociados con la temperatura sobre la germinación de las semillas.

Semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C y 25°C en luz continua fueron almacenadas en seco y oscuridad a una temperatura constante de 20°C. A distintos tiempos de post-maduración de las semillas (60, 120 y 300 días) se realizaron los ensayos de germinación. Para ello las semillas fueron embebidas en agua y mantenidas en oscuridad por 3 días a 25°C. Luego, las semillas recibieron un pulso de luz R o se mantuvieron en oscuridad hasta su conteo a las 72 horas.

Las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C mostraron bajos valores de germinación durante todo el experimento (**figura 9**). La germinación no superó el 30% en los distintos tiempos de post-maduración, y no hubo efectos diferenciales por el factor luz ($P=0,1760$) ni tampoco por el factor post-maduración ($P=0,1252$). Las comparaciones de medias entre los materiales mutantes y el WT no mostraron diferencias significativas asociadas con el ambiente de temperatura materno ($P>0,05$).

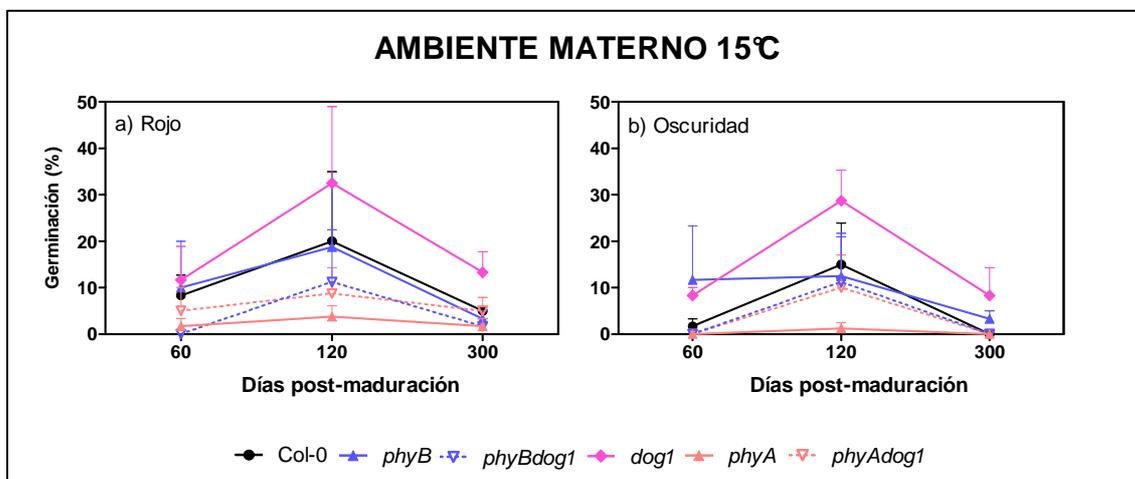


Figura 9: germinación de las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C. Germinación de las semillas irradiadas con un pulso de luz roja (a) o mantenidas en oscuridad (b). Se representa la media \pm ES (n=3). Se realizó una prueba de ANOVA seguido de un test de Bonferroni comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). En todos los casos las diferencias fueron no significativas.

Las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 25°C mostraron un patrón de germinación distinto que las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C. Para facilitar la interpretación de los resultados de germinación de semillas de plantas cultivadas a 25°C, los datos son presentados por fecha de post-maduración.

A los 60 días de post-maduración, las semillas WT germinaron menos del 30% y se observaron efectos significativos debidos al factor luz ($P=0,0002$). Tanto en oscuridad como en R, la germinación de las semillas mutantes *dog1* y *phyBdog1* fue entre un 36% y 51% mayor que Col-0, respectivamente. Sin embargo, el mutante del *phyA* germinó al menos un 15% por debajo del WT (**figura 10a**).

A los 120 días posteriores a la cosecha, la germinación de las semillas fue menor que a los 60 días. El ANOVA indica que hay efectos significativos del factor luz ($P<0.0001$). Las semillas WT germinaron menos del 10% en oscuridad y R. Sólo *dog1* germinó significativamente por encima del WT (**figura 10b**).

Finalmente, a los 300 días de post-maduración, las semillas mostraron un patrón de germinación bien diferenciado con respecto a los 60 y 120 días. El ANOVA indica que hay efecto del factor luz ($P=0.0017$). Las semillas WT germinaron un 60% independientemente del pulso de luz de R (**figura 10c**). En oscuridad, la germinación de las semillas *phyA*, *phyAdog1*, *phyB* y *phyBdog1* fue significativamente menor que Col-0. En R, la germinación de las semillas de todos los mutantes evaluados fue significativamente menor que el WT.

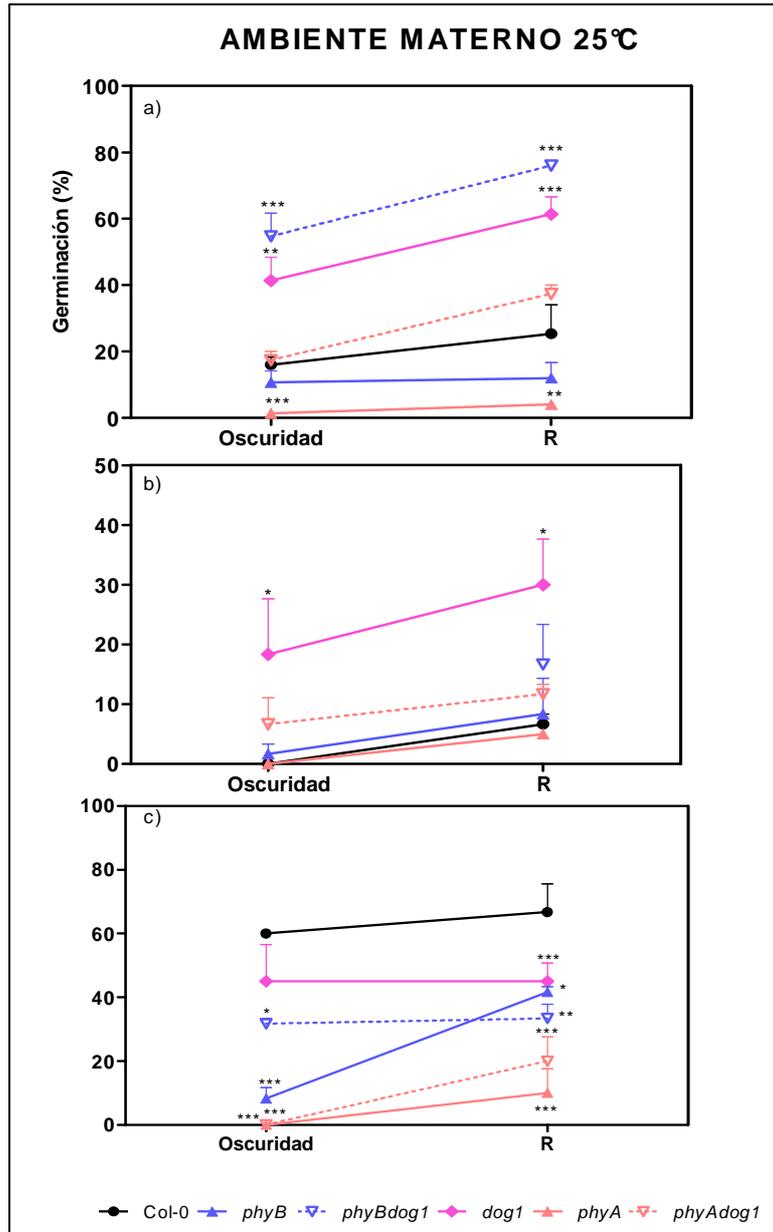


Figura 10: germinación de las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 25°C. Se utilizaron semillas de 60 (a), 120 (b) ó 300 (c) días de post-maduración. Se representa la media \pm ES (n=3). Se realizó una prueba de ANOVA seguido de un test de Bonferroni comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). Solo se muestran diferencias significativas. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Dado que las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C y 25°C presentaron un alto nivel de dormición a los 120 días de post-maduración, decidimos evaluar la germinación con un tratamiento de frío (estratificación) antes del estímulo de luz, para disminuir la dormición. Las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C y 25°C en luz continua y post-maduradas 120 días fueron incubadas a 5°C por 24 horas y luego irradiadas con un pulso de R o mantenidas en oscuridad.

Las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C se mantuvieron dormidas durante el experimento (**figura 11a**). La germinación no superó el 35% en oscuridad ni en R. No se observaron diferencias significativas asociadas con el factor luz ($P=0,1428$). Las semillas *dog1* germinaron significativamente más que el WT en oscuridad.

Las semillas de plantas cultivadas a 25°C presentar on un comportamiento distinto que las de 15°C (**figura 11b**). El ANOVA indica que hay efectos significativos de luz ($p<0.0001$). En oscuridad, la germinación del WT y de los otros genotipos mutantes fue casi nula con excepción de *dog1* que germinó significativamente más que WT. La imbibición de las semillas en frío por 24 horas y el pulso de luz de R fue suficiente para que las semillas WT germinen un 80% (**figura 11b**). Las semillas *dog1*, *phyA* y *phyAdog1* mostraron un patrón de germinación similar en R con respecto al WT. Sólo las semillas *phyB* y *phyBdog1* mostraron niveles significativamente menores que el WT en R.

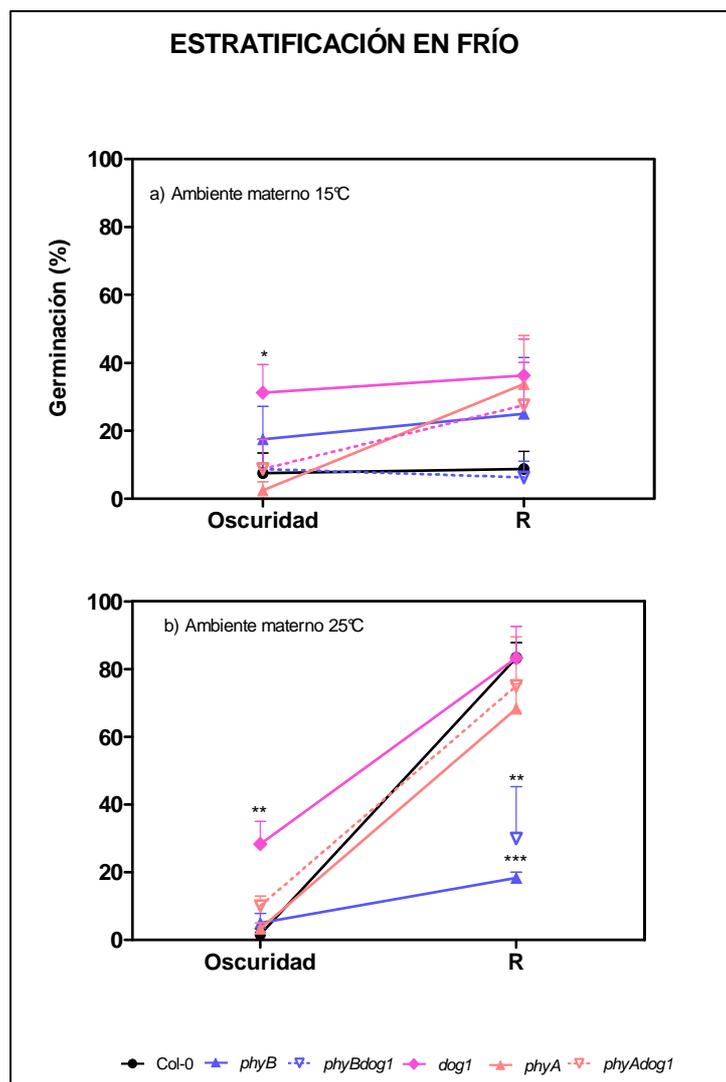


Figura 11: germinación de semillas incubadas a 5°C por 24 horas antes de ser irradiadas con un pulso de luz R o mantenidas en oscuridad. Datos correspondientes a semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C (a) ó 25°C (b) y post-maduras por 120 días. Se representa la media \pm ES (n=3). Se realizó una prueba de ANOVA seguido de un test de Bonferroni comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). Sólo se representan las diferencias significativas, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

6.2.2. Efectos maternos asociados con la calidad de luz sobre la germinación de las semillas.

Con el objetivo de evaluar los efectos maternos asociados al ambiente lumínico, se cosecharon semillas de plantas provenientes de ambientes lumínicos con alta o baja relación R:RL. Las semillas se almacenaron en seco y oscuridad a 20°C hasta la realización de los ensayos.

Las semillas fueron sembradas y embebidas por 2 horas y posteriormente estratificadas a 5°C por 0, 3 y 7 días en oscuridad. Al finalizar la estratificación, las semillas fueron irradiadas con un pulso de luz R o mantenidas en oscuridad a 25°C por 3 días hasta que se evaluó la germinación. El ambiente materno lumínico afectó significativamente la respuesta de la germinación de las semillas WT ($P=0,0002$), pero no hubo efectos por el factor luz ($P=0,5716$) ni por el factor frío ($P=0,2275$). En oscuridad, las semillas WT cosechadas de plantas cultivadas en un ambiente de relación R/RL: 1.02 germinaron hasta un 40% con 3 días a 5°C (**figura 12a**); mientras que la germinación fue menor a 25% cuando las semillas provienen de plantas cultivadas a baja relación R:RL (**figura 12b**). Una respuesta similar fue observada para semillas WT irradiadas con un pulso de luz R (50% vs 20% en alta y baja R:RL, respectivamente) Las comparaciones de medias entre los materiales mutantes y el WT no mostraron diferencias significativas asociadas con el ambiente lumínico materno ($P>0,05$).

ESTRATIFICACIÓN EN FRÍO

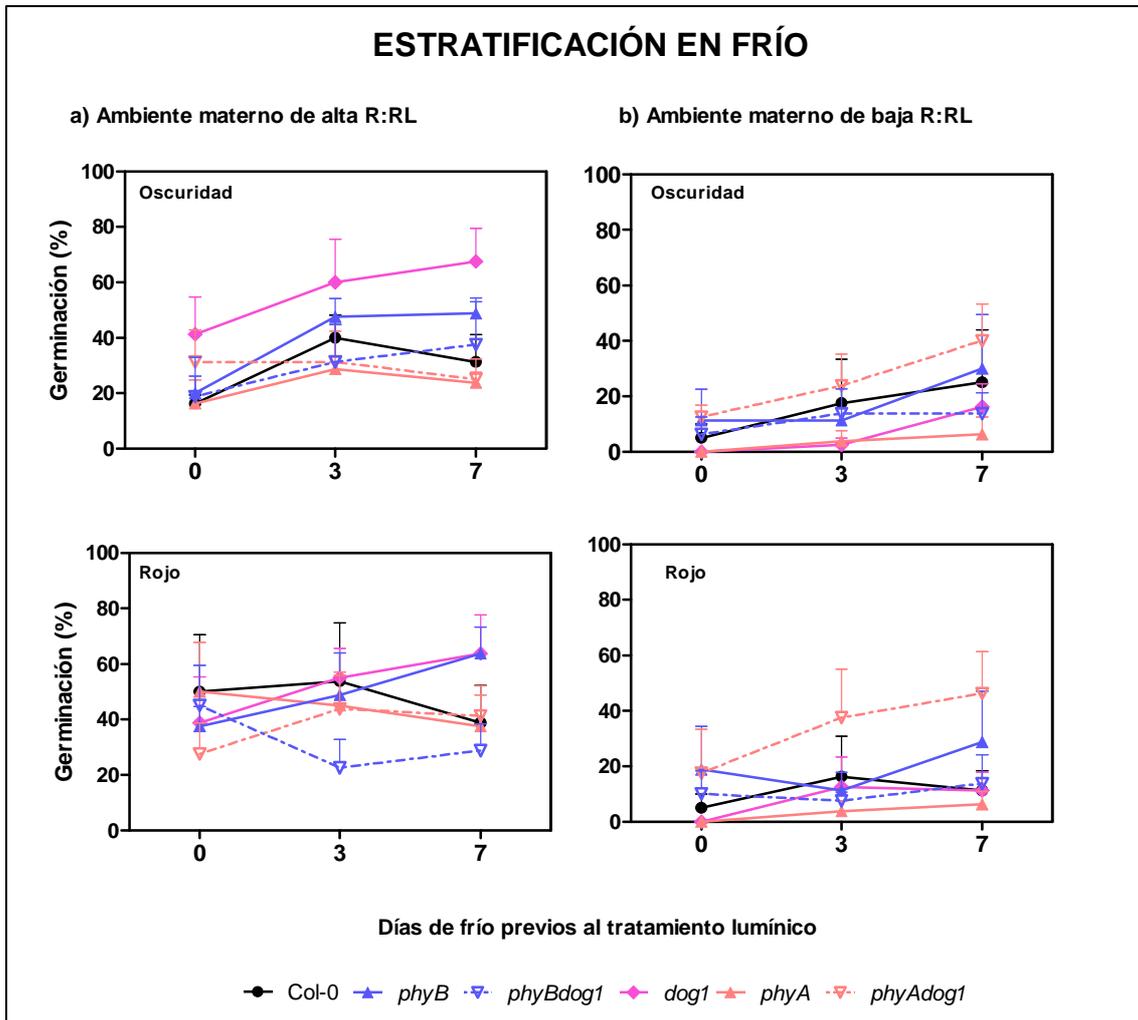


Figura 12: germinación en oscuridad y R de semillas cosechadas de plantas cultivadas con R:RL=1.02±0,02 (alta R:RL) y R:RL=0.17±0,05 (baja R:RL) y estratificadas a 5°C por 0, 3 y 7 días. Las semillas fueron post-maduradas por 90 días. Se representa la media ± ES (n=4). Se realizó una prueba de ANOVA seguido de un test de Bonferroni comparando cada genotipo con el genotipo WT (Col-0). No se observaron diferencias significativas de medias entre WT y genotipos mutantes.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Las plantas son organismos sésiles que deben adaptarse a su medio ambiente para sobrevivir. La temperatura y la luz son factores centrales a los que las semillas y plantas se adaptan para ajustar lo más finamente posible su crecimiento y su desarrollo. En esta tesis decidimos evaluar cómo el ambiente térmico y lumínico afecta el desarrollo de las plantas en algunos caracteres de crecimiento vegetativo y tiempo a floración; y los efectos maternos asociados a ambos factores ambientales sobre la germinación de las semillas de plantas salvajes y mutantes simples *dog1*, *phyA*, *phyB* y los mutantes dobles *phyAdog1* y *phyBdog1*.

Los parámetros de crecimiento vegetativo y floración evaluados fueron controlados principalmente por *phyA* y *phyB*, mientras que los efectos de *DOG1* fueron limitados. Estos resultados coinciden con resultados de trabajos previos que indican que la función de *DOG1* se limita al control de la dormición y germinación de las semillas de *Arabidopsis* y *Lepidium sativum* (Bentsink *et al.*, 2006; Bentsink *et al.*, 2010; Graeber *et al.*, 2010). También ha sido documentado que *DOG1* puede aumentar la sensibilidad a los azúcares en semillas y plántulas de *Arabidopsis* a través de la vía de señalización del ABA, mediante la inducción en la expresión de *ABI4*, un factor de transcripción temprano de esta vía de acción (Teng *et al.*, 2008). En plantas salvajes, el crecimiento de la roseta fue menor a 25°C comparado con plantas cultivadas a 15°C y 20°C (**figura 1**). A bajas temperaturas (15°C), el *phyA* promovió el crecimiento de la roseta mientras que el *phyB* lo inhibió. Si bien la elongación de pecíolo no fue afectada por la temperatura de cultivo en las plantas salvajes, la ausencia de *phyB* promovió la elongación del pecíolo en todo el rango térmico (**figura 2**). Estos resultados son concordantes con el trabajo publicado por Halliday y colaboradores (2002) en plantas cultivadas a 16°C y 22°C. Las plantas *dog1* mostraron un fenotipo idéntico al de las plantas salvajes entre 15°C a 25°C, sin embargo la doble mutación *phyAdog1* redujo el crecimiento del pecíolo a 15°C mientras que el *phyBdog1* redujo el crecimiento de la roseta sólo a 25°C (**figura 1** y **figura 2**). Estos datos sugieren que en estas condiciones, *DOG1* podría contribuir aditivamente y parcialmente a la acción promotora del crecimiento de *phyA* a 15°C y de *phyB* a 25°C. En la literatura no encontramos evidencias acerca de la contribución de *DOG1* sobre las funciones moduladas por el *phyA* y *phyB* en el control del crecimiento de las plantas a bajas y altas temperaturas. Estas conclusiones deben ser confirmadas mediante nuevos ensayos.

Por otra parte, la temperatura afectó el tiempo a floración de las plantas de *Arabidopsis*. A 25°C se aceleró el tiempo a floración (en días y número de hojas) en las plantas salvajes y mutantes y el *phyB* es el principal fitocromo responsable de reprimir la inducción floral sólo a altas temperaturas (**figura 3** y **figura 4**). Estos resultados confirman evidencias previas publicadas por el grupo de Halliday 2002, quienes observaron que la ausencia de *phyB* acelera la floración a 22°C pero no a 16°C. Tanto nuestros resultados como los de Halliday y colaboradores demuestran que el fenotipo de floración acelerada de *phyB* es dependiente de la

temperatura y que una reducción de 10°C (en esta tesis) o de 6°C (Halliday *et al.*, 2002) anula ese fenotipo. La presencia de DOG1 aceleró significativamente el tiempo a floración en días a 20°C (**figura 3**) observándose una tendencia similar aunque no significativa cuando se evaluó el número de hojas presentes al momento de la floración (**figura 4**). La falta de correlación entre el tiempo a floración en días y en número de hojas en el mutante *dog1* puede deberse a efectos diferenciales de DOG1 sobre ambos parámetros o simplemente a diferencias debidas a la sensibilidad del investigador en la evaluación de ambos parámetros (i.e., error experimental). Entre otros trabajos, Koornneff y colaboradores (1991) demostraron que ambos parámetros florales pueden no correlacionarse, como ellos observaron al caracterizar 42 mutantes de floración tardía de *Arabidopsis* cuando las plantas fueron expuestas en condiciones fotoperiódicas inductivas (i.e., día largo).

El ambiente lumínico puede ser caracterizado por cambios en la calidad de luz. Cambios en la relación de luz R:RL (1.02 vs 0.17) afectaron el patrón de crecimiento vegetativo y floral de las plantas de *Arabidopsis* cultivadas en condiciones de invernáculo. La baja relación de luz R:RL redujo el diámetro de la roseta y el phyA inhibió la respuesta (**figura 5**). También observamos que el phyA y phyB inhibieron el crecimiento del pecíolo a baja relación R:RL (**figura 6**). La falta de phyA causó un ligero retraso en la floración respecto al WT en plantas cultivadas a alta relación R:RL (**figura 7**), y estos resultados son consistentes con observaciones previas (por ej. Johnson *et al.*, 1994 y Devlin *et al.*, 1996). En oposición a lo esperado, el tiempo a floración del mutante de phyB no fue menor con respecto a las plantas salvajes cultivadas en una baja relación de luz R:RL (**figuras 7 y 8**). Es sabido que una baja relación R:RL acelera la floración y que esta respuesta es mediada principalmente por el phyB (Halliday *et al.*, 1994; Smith & Whitelam, 1997; Dorn *et al.*, 2000). Un comentario aparte requiere una observación sobre DOG1 que promovió el crecimiento en plantas cultivadas con una relación R:RL= 1.02 (**figura 5**). La función promotora de DOG1 sobre el crecimiento vegetativo en ambientes lumínicos de canopeos abiertos (sin competencia por luz de plantas vecinas) no había sido descrita antes y se contrapone a la opinión generalizada de que DOG1 solo tiene un rol en el control de la dormición y germinación de las semillas (Bentsink *et al.*, 2006).

Como hemos comentado en la introducción, los efectos maternos tienen una influencia importante sobre los procesos de dormición y germinación de las semillas (Alboresi *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2007; Donohue *et al.*, 2007; Schmutts *et al.*, 2007). El ambiente lumínico y la temperatura durante el desarrollo de la simiente en la planta madre son dos factores ampliamente reconocidos por afectar el nivel de dormición de las semillas (Hilhorst, 2007; Donohue *et al.*, 2007). Las bajas temperaturas durante la maduración de las mismas (15°C) aumentaron los niveles de dormición con respecto a aquellas cosechadas de plantas cultivadas a 25°C (**figura 9 y 10**). Cuando las semillas provenían de un ambiente materno de 25°C, se observó que salieron parcialmente de dormición primaria a los 60 días, entraron en dormición secundaria a los 120 días y salieron parcialmente de dormición secundaria a los 300 días

después de cosechadas (**figura 10**). *DOG1* fue un represor de la germinación a tiempos de post-maduración de 60 y 120 días, pero no a 300 días, sugiriendo que sus efectos represores se diluyen con el tiempo de post-maduración (**figura 10**). Evidencias muy recientes demostraron que, entre otros genes involucrados en la dormición, la expresión de *DOG1* está asociada al nivel de dormición de las semillas y que su actividad depende de factores maternos asociados con la temperatura (Kendall *et al.*, 2011 y Chiang *et al.*, 2011). Si bien nuestras condiciones experimentales fueron diferentes, como por ejemplo el fotoperíodo continuo en esta tesis y un fotoperíodo de día largo en el trabajo de Kendall y colaboradores (2011), nuestros resultados pueden ser explicados considerando que la expresión de *DOG1* se reduce en semillas con tiempos de post-maduración prolongados (i.e., 300d vs 120d). Sería interesante evaluar los niveles de expresión de *DOG1* y corroborar nuestra hipótesis de trabajo con nuevos ensayos utilizando semillas con distintos períodos de post-maduración, cosechadas de plantas cultivadas a 15°C y 25°C.

Se sabe que la luz y las bajas temperaturas (estratificación) son factores que disminuyen la dormición de las semillas (Yamauchi *et al.*, 2004; Penfield *et al.*, 2005, Oh *et al.*, 2005). Semillas dormidas con una post-maduración de 120 días que provienen de plantas cultivadas a 15°C y 25°C fueron expuestas a 5°C por 24 horas y luego irradiadas con un pulso de luz roja. En semillas cosechadas de plantas cultivadas a 15°C, la estratificación y la exposición a la luz de las semillas no fueron suficientes para disminuir la dormición (**figura 11**). Sin embargo, las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 25°C respondieron en forma muy diferente a los mismos estímulos de frío y luz. Si bien las bajas temperaturas o el pulso de luz R por sí sólo no permitió que las semillas salvajes germinaran (**figura 11b y 11**), ambos factores en forma conjunta promovieron la germinación de las semillas WT en 80% (**figura 11**). Esta respuesta es principalmente mediada por el *phyB* (**figura 11**). Heschel y colaboradores (2007) atribuyeron también diferentes roles de los fitocromos en la germinación dependiente de la temperatura. En su trabajo utilizaron varias líneas de mutantes simples, dobles y triples de los fitocromos A, B y E, a las que pusieron a germinar en un rango de temperaturas (7°C a 28°C), y observaron que el *phyB* fue importante en la germinación en todo el rango térmico, mientras que el *phyA* tiene un rol en promover la germinación a altas temperaturas. La contribución represora de *DOG1* sobre la germinación es observable en semillas mantenidas en oscuridad (**figura 11**) o sin frío (**figura 10b**); sin embargo, sus efectos desaparecen cuando las semillas son expuestas a la luz luego de una incubación en frío (**figura 11**).

Los efectos maternos asociados a la calidad del ambiente lumínico debido a cambios en la relación de luz R:RL determinan cambios en el nivel de dormición de las semillas. Una baja relación de luz R:RL durante el desarrollo de las semillas en la planta madre aumenta la dormición de las semillas mientras que un relación de luz R:RL=1,02 disminuye el nivel de dormición de las semillas. Nuestro diseño experimental no permitió distinguir efectos significativos de *DOG1*, *phyA* y *phyB* en las condiciones experimentales evaluadas (**figura 12**). Sin embargo, Dechaine y colaboradores (2009) evaluaron cómo la temperatura y la calidad de

luz durante la maduración de las semillas afecta la germinación en semillas de líneas mutantes de fitocromos (phyA hasta phyE) de *Arabidopsis thaliana*. En este trabajo se demostró que todos los fitocromos regulan la respuesta germinativa dependiendo del ambiente materno resultante de la combinación factorial de 16°C y 24°C y R:RL= 1.0 y 0.6, El phyA inhibe mientras que el phyB promueve la germinación de las semillas cosechadas de plantas cultivadas a 16°C, mientras que phyD y phyE promueve la germinación de semillas maduras a 24°C siendo estos efectos más notorios en semillas maduras a alta relación R:RL. En líneas generales, la germinación de las semillas cosechadas a una baja relación R:RL germinaron menos que cuando provienen de plantas cultivadas con alta relación R:RL McCullough & Shropshire 1970 demostraron que semillas de *Arabidopsis* maduras en una alta relación R:RL germinaron mejor embebidas en oscuridad, que aquellas semillas maduras a baja relación R:RL. Los resultados de esta tesis concuerdan con estos antecedentes (**figura 12**).

Esta tesis puso a prueba la idea de que DOG1 y los phyA y phyB pueden afectar el crecimiento de las plantas y el tiempo de inducción floral como así también la salida de la dormición de las semillas. Nuestro diseño experimental consistió en trabajar con semillas cosechadas de plantas madres expuestas a distintas condiciones de luz y temperatura. Si bien DOG1 cumple una función muy limitada en la modulación del crecimiento y desarrollo vegetativo y floral, su rol en el control de la dormición de las semillas es central. Recientemente hay un cuerpo de evidencias experimentales que demuestran que proteínas que modulan el tiempo a floración, como Flowering locus C, tienen una función destacada en la promoción de la germinación en forma dependiente a la temperatura (Chiang *et al.*, 2009). Por lo tanto, existe una notable pleiotropía entre estas dos fases de desarrollo, como son la germinación y la floración. La regulación de la germinación por *FLC* es a través de la vía de degradación del ABA y la síntesis de GA en semillas embebidas. Sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos en esta tesis, podemos concluir que no encontramos ninguna evidencia acerca de que proteínas cuya función es central en el control de la dormición de las semillas, como DOG1, tenga una influencia importante en otros procesos del desarrollo, como es el crecimiento vegetativo y floral.

8. Bibliografía.

- **Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C y Truong HN.** 2005. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28: 500-512.
- **Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P y 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.
- **Alonso-Blanco C, Bentsink L, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Koornneef M.** 2003. Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 164:711-29
- **Alonso-Blanco C, Koornneef M.** 2000. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an underexploited resource for plant genetics. *Trends Plant Sci.* 5:22-9.
- **Auge GA, Perelman S, Crocco CD, Sánchez RA, Botto JF.** 2009. Gene expression analysis of light-modulated germination in tomato seeds. *New Phytol.* 183:301-14.
- **Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA.** 1997. A deletion in the PHYD gene of the *Arabidopsis* Wassilewskija ecotype defines a role for phytochrome D in red/far-red light sensing. *Plant Cell.* 9:1317-26.
- **Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D.** 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.* 2:106.
- **Baskin CC y Baskin JM.** 1998. *Seeds—Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination.* San Diego, CA: Academic Press. 666 p.
- **Baskin JM y CC Baskin.** 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research.* 14: 1–16.
- **Batlla D y Benech-Arnold RL.** 2004. Seed dormancy loss assessed by changes in *Polygonum aviculare* L. population hydrotime parameters. Development of a predictive model. *Seed Science Research,* 14: 277-286.
- **Benech Arnold RL, Sánchez RA, Forcella F, Kruk BC, Ghera CM.** 2000. Environmental control of dormancy in weed seed soil banks. *Field Crops Research,* 67:105-122.
- **Bentsink L, Hanson J, Hanhart CJ, Blankestijn-de Vries H, Coltrane C, Keizer P, El-Lithy M, Alonso-Blanco C, de Andrés MT, Reymond M, van Eeuwijk F, Smeekens S, Koornneef M.** 2010. Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proc Natl Acad Sci.* 107:4264-9.
- **Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M.** 2006. Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:17042-7.

- **Bethke PC, Libourel IG, Aoyama N, Chung YY, Still DW y Jones RL.** 2007b. The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol.* 143: 1173-1188.
- **Bewley JD y Black M.** 1982. *The Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*, vol. 2. New Cork: Springer Verlag.
- **Bewley JD, Black M.** 1994. *Seeds: physiology of developmen and germination*, 2nd edn. New York, London: Plenum Press.
- **Bewley JD.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell.* 9:1055-1066.
- **Botto JF, Scopel AL, Ballaré CL, Sánchez RA.** 1998. The effect of light during and after soil cultivation with different tillage implements on weed seedling emergence. *Weed Science* 46, 351-357.
- **Botto JF, Sánchez RA, Casal, JJ.** 1998. Burial conditions affect light responses of *Datura ferox* seeds. *Seed Science Research* 8, 423-429.
- **Botto JF, Sánchez RA, Casal JJ.** 1995. Role of phytochrome B in the induction of seed germination by light in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 146, 307-312.
- **Botto JF, Sanchez RA, Whitelam GC, Casal JJ.** 1996. Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 110:439-444.
- **Botto JF, Scopel AL, Sánchez, RA.** 2000. The photoinduction of weed seed germination during soil disturbance depends on soil water status after cultivation. *Australian Journal of Plant Physiology* 27, 463-471.
- **Bouwmeester H y Karssen C.** 1989. Environmental factors influencing the expression of dormancy patterns in leed seeds. *Annals of Botany.* 63:113-120.
- **Bowman JL, Mansfield SG.** 1994. *Embryogenesis in Arabidopsis: an Atlas of Morphology and Development.*
- **Boyd EW, Dorn LA, Weinig C, Schmitt J.** 2007. Maternal effects and germination timing mediate the expression of winter and spring annual life histories in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Plant Sci.* 168, 205–214.
- **Briggs WR, Olney MA.** 2001. Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiol.* 125:85-8.
- **Cadman CS, Toorop PE, Hilhorst HW, y Finch-Savage WE.** 2006. Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* 46: 805-822.
- **Casal JJ, Davis SJ, Kirchbauer DJ, Viczian A, Yanovsky MJ, Clough RC, Kircher S, Jordan-Beebe ET, Schäfer E, Nagy F, Vierstra RD.** 2002. The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome A helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. *Plant Physiology* 129: 1127-1137.

- **Casal JJ, Luccioni L, Oliverio KA y Boccalandro HE.** 2003. Light, Phytochrome Signalling and photomorphogenesis in Arabidopsis. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2, 625-636.
- **Casal JJ, Sánchez RA.** 1998. Phytochromes and seed germination. *Seed Science Research*, 8:317-329.
- **Chiang GC, Bartsch M, Barua D, Nakabayashi K, Debieu M, Kronholm I, Koornneef M, Soppe WJ, Donohue K, De Meaux J.** 2011. DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in Arabidopsis thaliana. *Mol Ecol.* 20:3336-49.
- **Chiang GC, Barua D, Kramer EM, Amasino RM, Donohue K.** 2009. Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci.* 106:11661-6.
- **Chibani K, Ali-Rachedi S, Job C, Job D, Jullien M, Grappin P.** 2006. Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142:1493-510.
- **Chory J, Cook RK, Dixon R, Elich T, Li HM, Lopez E, Mochizuki N, Nagpal P, Pepper A, Poole D.** 1995. Signal-transduction pathways controlling light-regulated development in Arabidopsis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 350:59-65.
- **Chory J.** 1993. Out of darkness: mutants reveal pathways controlling light-regulated development in plants. *Trends Genet.* 9:167-72.
- **Côme D y Thêvenot C.** 1982. Environmental control of embryo dormancy and germination. The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination, p. 27 1–298. In: A.A. Khan (ed.). Elsevier Biomedical Press.
- **Cone JW y Spruit CJP.** 1983. Imbibition conditions and seed dormancy of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* 59: 416-420.
- **Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM y Koornneef M.** 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122:403–413.
- **Debeaujon I, Lepiniec L, Pourcel L, Routaboul JM.** 2007. Seed coat development and dormancy. In Bradford KJ, Nonogaki H. *Seed development, dormancy and germination.* Blackwell oxford. 25-49.
- **Dechaine JM, Gardner G, Weinig C.** 2009. Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation. *Plant Cell Environ.* 32:1297-309.
- **Del Fueyo P, Sánchez RA, Benech-Arnold RL.** 2003. Seed longevity in two sorghum varieties with contrasting dormancy level prior to harvest. *Seed Science and Technology* 31, 639-650.
- **Deng XW, Quail PH.** 1999. Signalling in light-controlled development. *Semin Cell Dev Biol.* 10:121-9.

- **Deregibus VA, Casal JJ, Jacobo EJ, Gibson D, Kauffman M, Rodriguez AM.** 1994. Evidence that heavy grazing may promote the germination of *Lolium multiflorum* seeds via phytochrome-mediated perception of high red/far-red ratios. *Functional Ecology*. 8:536-542.
- **Derkx MPM y Karssen CM.** 1993a. Variability in light-, gibberellin- and nitrate requirement of *Arabidopsis thaliana* seeds due to harvest time and conditions of dry storage. *J. Plant Physiol.* 141:574–582.
- **Derkx MPM y Karssen CM.** 1993b. Effects of light and temperature on seed dormancy and gibberellin-stimulated germination in *Arabidopsis thaliana*: studies with gibberellin-deficient and -insensitive mutants. *Physiol. Plant* 89:360–368.
- **Devlin PF, Halliday KJ, Harberd NP, Whitelam GC.** 1996. The rosette habit of *Arabidopsis thaliana* is dependent upon phytochrome action: novel phytochromes control internode elongation and flowering time. *Plant J.* 10:1127-34.
- **Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC.** 1998. Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10:1479-87.
- **Devlin PF, Robson PR, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC.** 1999. Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol.* 119:909-15.
- **Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR y Schmitt J.** 2005. Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution.* 59: 740-757.
- **Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR, Schmitt J.** 2005. Niche construction through germination cueing: life-history responses to timing of germination in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution.* 59:771-85.
- **Donohue K, Dorn L, Griffith C, Kim E, Aguilera A, Polisetty CR, Schmitt J.** 2005. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution.* 59:758-70.
- **Donohue K, Heschel MS, Chiang GC, Butler CM, y Barua D.** 2007. Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant Cell Environ.* 30: 202-212.
- **Donohue K.** 2005. Niche construction through phenological plasticity: life history dynamics and ecological consequences. *New Phytol.* 166:83-92.
- **Donohue K.** 2009. Completing the cycle: maternal effects as the missing link in plant life histories. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364:1059-74.
- **Fankhauser C y Chory J.** 1997. Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:203–229.
- **Finch-Savage WE, Cadman CS, Toorop PE, Lynn JR, y Hilhorst HW.** 2007. Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J.* 51: 60-78.

- **Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G.** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171:501-23.
- **Finkelstein RR, Gampala SS y Rock CD.** 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl: S15-S45.
- **Frankland B y Taylorson.** 1983. Light control of seed germination. In *Enciclopedia of Plant Physiology*, vol. 16^a (ed. W. Shropshire and H. Mor). New Cork: Springer Verlag.
- **Franklin KA, Davis SJ, Stoddart WM, Vierstra RD, Whitelam GC.** 2003. Mutant analyses define multiple roles for phytochrome C in Arabidopsis photomorphogenesis. *Plant Cell.* 15:1981-9.
- **Franklin KA, Whitelam GC.** 2005. Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann Bot.* 96:169-75.
- **Franklin KA, Whitelam GC.** 2007. Phytochrome a function in red light sensing. *Plant Signal Behav.* 2:383-5.
- **Froud-Williams RJ, Drennan DSH, Chancellor RJ.** 1984. The influence of burial and dry storage upon cyclic changes in dormancy germination and response to light in seeds of various arable weeds. *New Phytol.* 96:473-481.
- **Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA.** 1997. Differential patterns of expression of the Arabidopsis PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol.* 115:959-69.
- **Graeber K, Linkies A, Müller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G.** 2010. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol Biol.* 73:67-87.
- **Grappin PD, Bouinot B, Sotta E, Miginiac y Jullien M.** 2000. Control of seed dormancy in *Nicotiana glauca*: Post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta.* 210:279–285.
- **Gubler F, Millar AA, Jacobsen JV.** 2005. Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Curr Opin Plant Biol.* 8:183-7.
- **Halliday KJ, Koornneef M, Whitelam GC.** 1994. Phytochrome B and at Least One Other Phytochrome Mediate the Accelerated Flowering Response of Arabidopsis thaliana L. to Low Red/Far-Red Ratio. *Plant Physiol.* 104:1311-1315.
- **Halliday KJ, Koornneef M, Whitelam GC.** 2002. Phytochrome B and at Least One Other Phytochrome Mediate the Accelerated Flowering Response of Arabidopsis thaliana L. to Low Red/Far-Red Ratio. *Plant Physiol.* 104:1311-1315.
- **Halliday KJ, Whitelam GC.** 2003. Changes in photoperiod or temperature alter the functional relationships between phytochromes and reveal roles for phyD and phyE. *Plant Physiol.* 131:1913-20.
- **Harada JJ.** 1997. Seed maturation and control of germination. In BA Larkins, IK Vasi, eds, *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants, Vol 4, Cellular and Molecular Biology of Seed Development.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 545–592.

- **Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E.** 2002. Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128:194-200.
- **Hilhorst HW.** 1990. Dose-Response Analysis of Factors Involved in Germination and Secondary Dormancy of Seeds of *Sisymbrium officinale*: I. Phytochrome. *Plant Physiol.* 94:1090-5.
- **Hilhorst H.** 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Sci. Res* 5:61–73.
- **Hoffmann MH.** 2002. Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Brassicaceae). *Journal of Biogeography* 29: 125–134.
- **Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ.** 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.* 179:33-54.
- **Huq E, Al-Sady B, Hudson M, Kim C, Apel K, Quail PH.** 2004. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* 305: 1937–1941. [PubMed]
- **Insausti P, Soriano A, Sánchez RA.** 1995. Effects of flood-influenced factors on seed germination of *Ambrosia tenuifolia*. *Oeologia*, 103:127-132.
- **Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC.** 1994. Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol.* 105:141-149.
- **Karszen CM, Brinkhorst-van der Swan DLC, Breekland AE y 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.
- **Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H.** 2002. Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol.* 5:33-6.
- **Koornneef M, Hanhart CJ, van der Veen JH.** 1991. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet.* 229:57-66.
- **Kucera B, Cohn MA, y Leubner-Metzger G.** 2006. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.
- **Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y y Nambara E.** 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* 23: 1647-1656.
- **Laserna MP, Sánchez RA, Botto JF.** 2008. Light-related loci controlling seed germination in Ler x Cvi and Bay-0 x Sha recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* 2008 Oct;102(4):631-42. Epub 2008 Aug 6.
- **Lefebvre V, North H, Frey A, Sotta B, Seo M, Okamoto M, Nambara E y Marion-Poll, A.** 2006. Functional analysis of *Arabidopsis* NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J.* 45: 309-319.

- **Leubner-Metzger G, Meins F.** 2001. Antisense-transformation reveals novel roles for class I beta-1,3-glucanase in tobacco seed after-ripening and photodormancy. *J Exp Bot.* 52:1753-9.
- **Leubner-Metzger G.** 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta.* 213:758-63.
- **Leubner-Metzger G.** 2003. Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res* **13**: 17-34
- **Mancinelli AL, Kendrick RE, Kronenberg GHM.** 1994. The physiology of phytochrome actions. *in Photomorphogenesis in plants, eds Kendrick R.E., Kronenberg G.H.M.*(Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands), 2nd ed. *pp* 211–270.
- **Mayer SS, Charlesworth D.** 1991. Cryptic dioecy in flowering plants. *Trends Ecol Evol.* 6:320-5.
- **McCullough JM y Shropshire WJr.** 1970. Physiological predetermination of germination responses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Physiology.* 11:139–148.
- **McNellis TW, Deng XW.** 1995. Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell.* 7:1749-61.
- **Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M.** 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science.* 282:662, 679-82.
- **Meyerowitz EM, Pruitt RE.**1985. *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science.* 229:1214-8.
- **Meyerowitz EM.** 1987. *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Genet.* 21:93-111.
- **Meyerowitz EM.** 1989. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell.* 56:263-9.
- **Meyerowitz EM.** 1994. Flower development and evolution: new answers and new questions. *Proc Natl Acad Sci* 91:5735-7.
- **Meyerowitz EM.** 1994. Plant evolution. De-evolution and re-evolution of maize. *Curr Biol.* 4:127-30.
- **Meyerowitz EM.** 2001. Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiol.* 125:15-9.
- **Meyerowitz EM.** 2002. Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science.* 295:1482-5.
- **Millar AA, Jacobsen JV, Ross JJ, Helliwell CA, Poole AT, Scofield G, Reid JB, Gubler F.** 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J.* 45:942-54.
- **Monte E, Alonso JM, Ecker JR, Zhang Y, Li X, Young J, Austin-Phillips S, Quail PH.** 2003. Isolation and characterization of phyC mutants in *Arabidopsis* reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell.* 15:1962-80.
- **Nagy F, Kircher S, Schäfer E.** 2001. Intracellular trafficking of photoreceptors during light-induced signal transduction in plants. *J Cell Sci.* 114:475-80.

- **Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E.** 2005. Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J.* 41:697-709.
- **Nambara E, Marion-Poll A.** 2003. ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8:213-7.
- **Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C y Choi G.** 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 16: 3045-3058.
- **Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun TP, Kamiya Y y Choi G.** 2007. PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell.* 19: 1192-1208.
- **Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI y Choi G.** 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47: 124-139.
- **Ooms JJJ, Léon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M y Karszen CM.** 1993. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* - A comparative study using abscisic acid- insensitive *abi3* Mutants. *Plant Physiol.* 102: 1185-1191.
- **Penfield S, Josse EM, Kannangara R, Gilday AD, Halliday KJ, Graham IA.** 2005. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol.* 15:1998-2006.
- **Poethig RS.** 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science.* 250:923-30.
- **Probert RJ.** 1992. The role of temperature in germination ecophysiology. In: Fenner, M. (ed.) *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities.* Oxford: CAB International.
- **Probert RJ.** 2000. The Role of Temperature in the Regulation of Seed Dormancy and Germination. In: *The Ecology of Regeneration in Plant Communities, 2nd edition* 261 (ed. M. Fenner).
- **Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D.** 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science.* 268:675-80.
- **Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D.** 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science.* 268:675-80.
- **Quail PH.** 1991. Phytochrome: a light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. *Annu Rev Genet.* 25:389-409.
- **Quail PH.** 1997. The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight?. *Bioessays.* 19:571-9.
- **Raz V, Bergervoet JH, Koornneef M.** 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development.* 128:243-52.

- **Reed JW, Chory J.** 1994. Mutational analyses of light-controlled seedling development in *Arabidopsis*. *Semin Cell Biol.* 5:327-34.
- **Roach D y Wulff R.** 1987. Maternal Effects in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 18:209-235.
- **Schäfer E, Bowler C.** 2002. Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep.* 3: 1042–1048.
- **Schmuths H, Bachmann K, Weber WE, Horres R, Hoffmann MH.** 2006. Effects of preconditioning and temperature during germination of 73 natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot.* 97:623-34.
- **Schopfer P, Plachy C.** 1984. Control of Seed Germination by Abscisic Acid : II. Effect on Embryo Water Uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* 76:155-60.
- **Scopel AL, Ballaré CL y Sánchez RA.** 1991. Induction of extreme light sensitivity in buried weed seeds and its role in the perception of soil cultivations. *Plant, Cell and Environment.* 14:501-508.
- **Shichijo C, Katada K, Tanaka O, Hashimoto T.** 2001. Phytochrome A-mediated inhibition of seed germination in tomato. *Planta.* 213:764-9.
- **Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M.** 1994. The Induction of Seed Germination in *Arabidopsis thaliana* Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secundarily 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.* 93:8129-33.
- **Smith H y Whitelam GC.** 1990. Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell Environ.* 13:695-707.
- **Somers DE, Quail PH.** 1995. Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 7:413-27.
- **Taiz L, Zeiger E.** 1998. *Plant Physiology*. 2nd. Edition. Sinauer Associates Inc. Pub., Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 793.
- **Taylorson RB.** 1972. Phytochrome controlled changes in dormancy and germination of buried weed seeds. *Weed Science.* 20:417-422.
- **Teng S, Rognoni S, Bentsink L, Smeekens S.** 2008. The *Arabidopsis* GSQ5/DOG1 Cvi allele is induced by the ABA-mediated sugar signalling pathway, and enhances sugar sensitivity by stimulating ABI4 expression. *Plant J.* 55:372-81.
- **Tognacca RS, Ibarra SE, Sánchez RA, Botto JF.** 2011. DOG1 es un regulador negativo de la promoción de la germinación por luz. IFEVA-Facultad de Agronomía, UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina. *Primera Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos.*
- **Vázquez-Yañes C y Orozco-Segovia A.** 1990. Ecological significance of Light controlled seed germination in two contrasting tropical habitats. *Oecología.* 83:171-175.

- **Wang H, Deng XW.** 2003. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci.* 8:172-8.
- **Wang M, Heimovaara-Dijkstra S y Van Duijn B.** 1995. Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta.* 195:586–592.
- **Wolpert L.** 1998. Pattern formation in epithelial development: the vertebrate limb and feather bud spacing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 353:871-5.
- **Yamauchi Y, Ogawa M, Kuwahara A, Hanada A, Kamiya Y 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.
- **Yanovsky MJ, Kay SA.** 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature.* 419:308-12.

