

**Control de la inducción a floración en la especie perenne *Lesquerella*
mendocina: un potencial cultivo oleaginoso.**

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

Liliana Beatriz Windauer
Ingeniero Agrónomo - Universidad de Buenos Aires- 1989
Magister de la Universidad de Buenos Aires- 2002

**Lugar de trabajo: Cátedra de Cultivos Industriales. Facultad de Agronomía.
Universidad de Buenos Aires**



FAUBA

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



COMITÉ CONSEJERO

Director de Tesis

Edmundo Leonardo Ploschuk

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires (UBA)

Consejero de Estudios

Roberto Luis Benech -Arnold

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (University of Southampton)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Edmundo Leonardo Ploschuk

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires (UBA).

JURADO

Pablo Cerdán

Licenciado en Ciencias Biológicas (Universidad de Buenos Aires)

Doctor de la Universidad de Buenos Aires (Área Química)

JURADO

Cecilia Rousseaux

Ingeniera Agrónoma (Universidad de Buenos Aires)

Doctora de la Universidad de Buenos Aires(UBA)

Gillermo Eyherabide

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

Doctor of Philosophy (Iowa State University.EE:UU)

24 de Abril de 2013

A mi familia y amigos

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar un trabajo arduo como el desarrollo de una tesis doctoral me asaltó un muy humano egocentrismo que me llevó a concentrar la mayor parte del mérito en el aporte que había hecho. Sin embargo, el análisis objetivo me mostró inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que me han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a buen fin. Por esto, es para mí un placer utilizar este espacio para ser justa y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Debo agradecer al Dr Edmundo Ploschuk por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su apoyo y confianza en mi trabajo que en muchos momentos fue mayor que lo que yo confío en mí misma. Su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante esta tesis. Gracias Edy creo que hemos crecido juntos, fue una alegría inmensa compartir este trabajo con quien considero un amigo.

Quiero agradecer también de manera especial y sincera al Dr. Roberto Benech Arnold por su importante aporte en el desarrollo de esta tesis. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación han sido la clave para este trabajo, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras discusiones redundaran en beneficios tanto a nivel científico como personal. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y, además, ha significado la confirmación de una sólida amistad. Gracias Roberto!

A todos mis compañeros de la Cátedra de Cultivos Industriales y a muchos de la cátedra de Cereales, especialmente a la Dra Guillermina Menciondo. A Luis Pedace por ayudarme en el trabajo de campo.

A los Ingenieros Loreta Portatandino, Ivan Klemencik y a los alumnos Julian Bouilly y Federico Minardi por su dedicación y compromiso, sin su ayuda hubiese sido casi imposible realizar este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Agronomía y al programa UBACyT que financiaron este trabajo.

Y por ultimo a mi familia ya que sin su amor incondicional no hubiese tenido ni la fuerza ni la tranquilidad que me permitieron concluir con éxito este trabajo.

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

INDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción

1.1	Introducción general.....	1
1.2	Factores ambientales que regulan el tiempo a floración en las plantas.....	2
1.3	Señales fisiológicas y mecanismos que regulan el tiempo a floración en las plantas.....	6
1.4	El análisis del caso de <i>Lesquerella mendocina</i>	8
1.5	Objetivos e hipótesis.....	11
1.5.1	Objetivo general.....	11
1.5.2	Objetivos específicos e hipótesis.....	11
1.6	Estructura de la Tesis.....	12

Capítulo 2: Factores ambientales que influyen en el crecimiento modulan el tiempo hasta floración en *L. mendocina*.

4.1	Introducción	13
4.2	Materiales y Métodos.....	14
4.2.1	Condiciones generales.....	14
4.2.2	Determinación de Estados de Desarrollo.....	14
4.2.3	Experimento 1. Restricción de radiación.....	15
4.2.4	Experimento 2. Restricción de nutrientes.....	16
4.2.5	Experimento 3. Restricción hídrica.....	17
4.2.6	Mediciones y análisis estadístico.....	19
4.3	Resultados.....	19
4.3.1	Fenología de las plantas.....	19
4.3.2	Tasas de crecimiento.....	20
4.4	Discusión.....	28

Capítulo 3: El Cambio de la Tasa de crecimiento como factor disparador de la inducción floral en *Lesquerella mendocina*. regula la expresión de los genes que codifican para una GA2 oxidasa y la FLOWERING LOCUS T (FT).

4.1	Introducción	31
4.2	Materiales y Métodos.....	37
4.2.1	Experimento 1.....	37

32.1.1	Generales.....	37
32.1.2	Tratamientos.....	38
4.2.2	Experimento 2.....	41
4.2.2.1	Generales.....	41
4.2.2.2	Tratamientos.....	41
4.2.2.3	Análisis de expresión de genes.....	41
4.2.2.3.1	Generales.....	42
4.2.2.3.2	Análisis de la expresión de genes.....	42
3.2.3	Mediciones y análisis estadístico.....	43
3.3	Resultados.....	43
3.3.1	Experimento 1.....	43
3.3.1.1	Fenología de plantas.....	43
3.3.1.2	Tasas de crecimiento.....	42
3.3.2	Experimento 2.....	48
3.3.2.1	Tasas de crecimiento.....	48
3.4	Discusión.....	50

Capítulo 4: Efecto de la disponibilidad de hidratos de carbonos en la determinación del tiempo hasta iniciación floral en plantas de *Lesquerella mendocina*.

4.1	Introducción.....	53
4.2	Materiales y Métodos.....	54
4.2.1	Condiciones generales y preparación del sistema experimental.....	54
4.2.2	Tratamientos.....	56
4.2.3	Mediciones y análisis estadístico.....	59
4.3	Resultados	60
4.4	Discusión	67

Capítulo 5: Discusión general

5.1	Síntesis y aportes en relación a lo anteriormente conocido	71
5.2	Modelo conceptual.....	74
5.3	Impacto de la tesis sobre potenciales aplicaciones y futuras líneas de Investigación.....	77

Bibliografía.....	78
-------------------	----

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
TC	Tasa de crecimiento
TCu	Tasa de crecimiento umbral
GAs	Giberelinas
FT	Flowering locus T
HC	Hidrato de carbono
BFV	Botón floral visible
DDS	Días desde la siembra
DDE	Días desde la emergencia
Ψ_s	Potencial agua del suelo
Ψ_{apl}	Potencial agua de la planta

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 2.1.** Número de días desde emergencia (DDE) hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de radiación (Exp. 1,) disponibilidad nutricional e hídrica (Exp.2 y 3). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada experimento ($p < 0,05$). Medias \pm error estándar.....**20**
- Cuadro 2.2.** Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del experimento 1, de radiación mostrados en la en la figura 2.3. **TCR:** control, 100% de radiación incidente, T1: 21 días, T2: 42 días, T3: 64 días y T4: mantenido en baja radiación hasta BFV (tratamientos de sombreo)..... **24**
- Cuadro 2.3.** Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) de los experimentos de agua y nutrientes mostrados en la en la figura 2.4 y 2.5. **TCA:** control, capacidad de campo, **TCS:** estrés hídrico; **TCF:** control sin limitaciones nutritivas, **TSF:** con limitaciones nutritivas.....**26**
- Cuadro 2.4.** Número de días entre el cambio en la tasa de crecimiento, parámetro *c* del modelo de ecuación lineal, hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de radiación (Exp. 1), disponibilidad nutricional (Exp.2) y hídrica (Exp. 3).....**41**
- Cuadro 3.1.** Números de días desde emergencia (E) a botón floral visible (BFV) y porcentaje de plantas reproductivas para cada uno de los tratamientos. C: control plena radiación; CP: radiación + paclobutrazol; S: control sombra, SG:Sombra + giberelinas..... **44**
- Cuadro 3.2.**Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) en la Figura 3.4. C: control plena radiación; CP: radiación + paclobutrazol S: control sombra.....**45**
- Cuadro 4.1.** Análisis de variancia para el tiempo entre siembra y botón floral visible (BFV).....**60**
- Cuadro 4.2.** Días desde siembra (DDS) hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de plena radiación y en los de sombra. Letras deferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de disponibilidad de carbohidratos para cada tratamiento de radiación ($P < 0.05$)..... **61**
- Cuadro 4.3.** Porcentaje de Mortandad de plantas de los diferentes tratamientos de sacarosa y osmóticas bajo las dos condiciones de radiación..... **63**

Cuadro 4.4. Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del Experimento de Sombra.....**64**

Cuadro 4.5. Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del Experimento de Luz**65**

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Duración de una etapa de desarrollo sometida a distintas temperaturas (a) y su inversa (b), la tasa de desarrollo de una etapa de desarrollo a distintas temperaturas. La inversa de la pendiente de la fase lineal inicial de la figura 1b es el tiempo térmico. En a y b, sobre el eje de las abscisas se indican las distintas temperaturas cardinales.....3
- Figura 1.2:** Efecto del fotoperíodo sobre el tiempo térmico hasta el fin de la etapa emergencia - floración, en una planta con respuesta cuantitativa de día largo, bajo temperatura constante. Adaptado de Major, 1980.....5
- Figura 2.1:** Vista parcial del armado del Experimento 2 y 3.....17
- Figura 2.2:** Vista y detalle del experimento con los plásticos corredizos desplegados para no recibir el agua de lluvia.....18
- Figura 2.3:** Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de radiación (Experimento 1). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV). Las barras horizontales indican la duración de los tratamientos de sombreado.....21
- Figura 2.4:** Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de disponibilidad de nutrientes (Experimento 2). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV).....22
- Figura 2.5:** Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de disponibilidad hídrica (Experimento 3). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV). La barra horizontal indica la duración del tratamiento de restricción hídrica.....23
- Figura 2.6:** Números de días a botón floral visible (BFV) en función a los días a cambio de tasa de crecimiento (parámetro c, de la regresión lineal) en las plantas de los tratamientos de radiación (●), disponibilidad hídrica (▲) y nutricional (■). Los símbolos llenos pertenecen al tratamiento control los símbolos vacíos los tratamientos de restricción de cada uno de los factores de crecimiento. El símbolo gris indica el T1 del experimento de radiación (que no difirió estadísticamente del control).....27

- Figura 2.7:** Potencial agua de las plantas de *L. mendocina* en los tratamientos control (■) y con estrés hídrico (▲) medido al mediodía. Las flechas rojas indican el comienzo y la finalización del periodo con restricción en el riego en el tratamiento con estrés hídrico y la flecha negra indica el momento en que se produce el cambio en la tasa de crecimiento (parámetro *c*). Los segmentos verticales indican el error estándar y sólo se muestran cuando son más grandes que el símbolo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos para cada fecha.....27
- Figura 3.1:** Múltiples señales o vías que regulan la transición al estado reproductivo de las plantas y determinan el tiempo a floración. Las diferentes vías promueven (→) ó reprimen(—) a los genes integradores de señales para la floración. Adaptado de Tan y Swain, 2006.....32
- Figura 3.2:** Estructura básica del *ent- giberelano*, *ent- kaureno* y de la Giberelina 3 (*GA₃*).....34
- Figura 3.3:** Vista parcial del armado del Experimento 1. Cada repetición constó de 16 macetas rectangulares. En la foto se puede observar la disposición de las macetas y la estructura que sostenía las mallas que interceptaban la radiación.....37
- Figura 3.4:** Vista parcial de los tratamientos con restricciones de radiación impuestas por las mallas que interceptaban el 80 % de la radiación.....38
- Figura 3.5:** Diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por combinación de tratamientos.....40
- Figura 3.6:** Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos (C: radiación plena; CP: radiación plena con paclobutrazol; S: sombreado; SG: sombreado con giberelinas). Experimento 1. La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas indican estado reproductivo visible (BFV).....46
- Figura 3.7.** Plantas representativas de los diferentes tratamientos del Experimento 1: C plena radiación o 100% de radiación incidente (macetas negra); CP: plena radiación con el asperjado de Paclobutrazol (macetas blancas); S con restricciones de radiación macetas verdes); SG con restricciones de radiación con el asperjado de giberelinas (*GAs₄* y *GAs₇*, macetas rojas). La foto fue tomada a los 85 días después de la emergencia. Las plantas de los tratamientos C y SG se encuentran en estado reproductivo y las plantas de los CP y S se encuentran en estado vegetativo..... 47
- Figura 3.8:** Representación esquemática de los momentos de muestreo para la expresión del análisis de genes en los tratamientos de plena radiación y

sombra en el Experimento 2. Los muestreos expresados en días después de la emergencia (DDE) están referidos al peso seco de las plantas en esos momentos. Las barras verticales indican el momento de primer muestreo (20 DDE) y del segundo muestreo (50 DDE). Las letras **V** seguidas de un número indican la cantidad de hojas aparecidas que tenían las plantas en el momento de la toma de muestras..... **49**

- Figura 3.9:** Efecto de la radiación sobre la expresión de *GA2 oxidasa* y *FT* creciendo bajo de dos condiciones de radiación (control, TC, y sombra, TS) en los dos momentos de muestreo 20 DDE (TC1; TS1) y 50 DDE (TC2; TS2) como se muestra en la Figura 3.6. Experimento 2. Los asteriscos sobre el segundo momento de muestreo (50 DDE) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los niveles de la expresión de genes observados en el primer muestreo.....**50**
- Figura 4.1:** Vista y detalle de maceta plástica con malla (tul) en su interior.....**55**
- Figura 4.2:** Vista y detalle de una cubeta con macetas, medio porosos y plantas en estado vegetativo.....**56**
- Figura 4.3:** Vista del experimento al aire libre una vez aplicados los tratamientos de sombra..... **57**
- Figura 4.4:** Diseño experimental. Cada repetición consto de 5 cubetas que contenían 10 macetas por cubeta. Vista detalla de la andeja.....**58**
- Figura 4.5:** Vista de los techos corredizos cubriendo el ensayo en el campo experimental.....**59**
- Figura4.6:** Porcentaje final de plantas en estado reproductivo (BFV) de los tratamientos de disponibilidad de HC bajo tratamientos de luz y de sombra. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los segmentos verticales indican el error estándar ($n=10$).....**62**
- Figura 4.7:** Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para todas las combinaciones de tratamientos de Luz y de Sombra. La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV)..... **66**

Figura 5.1: Modelo conceptual para explicar el control del desarrollo a floración en *L. mendocina*. El esquema incorpora el efecto de los factores de crecimiento (radiación, agua y nutrientes) sobre la tasa de crecimiento umbral (TCu), sin limitaciones de estos factores (parte a). La flecha vacía indica el camino a seguir por la planta cuando los factores de crecimiento son escasos (parte b del esquema). Las flechas negras (\rightarrow) indican el efecto promotor de factores del crecimiento y endógenos sobre la determinación del pasaje al estado reproductivo de las plantas durante el primer año de vida. Las flechas truncadas (\dashrightarrow) indican el efecto inhibitorio de temperaturas supraóptimas y de factores endógenos, ya sea por la acción sobre la proteína codificada por el gen FT o por genes de la vía de GAS. Los signos de interrogación indican la necesidad de seguir investigando si la sacarosa actúa independientemente y directamente o vía GAS y FT durante la transición floral.....76

RESUMEN

La floración es el resultado de complejas interacciones entre factores ambientales, y está mediada por señales endógenas y por el programa genético de la planta. Las respuestas a la floración fueron poco estudiadas en especies perennes facultativas como la autóctona *Lesquerella mendocina*, potencial cultivo oleaginoso. El objetivo general fue generar avances en el conocimiento de los mecanismos que regulan la floración en especies herbáceas perennes, utilizando a *L. mendocina* como objeto de estudio. Se caracterizó el papel de factores que controlan el crecimiento en la regulación del tiempo a floración, encontrándose una asociación entre la adquisición de una tasa de crecimiento Umbral (TC_U) y el momento de floración, que resultó ser de naturaleza causal. Se puso en evidencia la participación de las giberelinas en la cascada de eventos que, iniciada por la adquisición de la TC_U , desemboca en la iniciación floral. La exposición de las plantas a condiciones que aumentan la tasa de crecimiento (i.e. alta radiación incidente) suprimió la expresión del gen que codifica para la enzima GA2-oxidasa (lo que conduciría a la acumulación de giberelinas activas) y aumentó la proteína codificada por el gen FT. Además, se corroboró un rol positivo de los carbohidratos que actuarían como una señal a distancia para desencadenar la floración. Sobre la base de estos resultados, se elaboró un modelo conceptual para explicar los mecanismos que regulan la transición del estado vegetativo a reproductivo en *L. mendocina*, que se integra con conocimientos previos acerca del efecto de la temperatura sobre el desencadenamiento de la floración en esta especie. La información obtenida en esta tesis implica un avance en el conocimiento de los mecanismos que controlan la inducción a floración en especies perennes, y además sienta las bases para la puesta en cultivo y diseño de estrategias de manejo de cultivos alternativos con estas características.

Lesquerella mendocina; perennes; floración; giberelinas; tasa de crecimiento

ABSTRACT

Flowering is the result of complex interactions between environmental factors and is mediated by endogenous signals and the genetic program of the plant. Responses to flowering have been recently studied in facultative perennial species such as the native *Lesquerella mendocina*, a potential oilseed crop. The main objective was to produce advances in the knowledge of the mechanisms involved in flowering of perennial herbaceous species, using *L. mendocina* as an object of study. The role of growth factors that influence in regulating flowering time was characterized, and an association was found between the acquisition of a growth rate threshold (TCu) and time to flowering, revealing a causal relationship. The role of gibberellins in the cascade of events initiated by the acquisition of the TCU and arriving to floral initiation was verified. Plant exposure to conditions that increase growth rate (eg high incident radiation) suppressed the gene expression for the enzyme GA2-oxidase (which would lead to accumulation of active gibberellins) and increased the protein encoded by the FT gene. Furthermore, a positive role of the carbohydrates that act as a signal to trigger the flowering at distance was confirmed. Based on these results, we developed a conceptual model to explain the mechanisms that regulate the transition from vegetative to reproductive state in *L. mendocina*, which is integrated with prior knowledge about the effect of temperature on flowering developing rate in this species. The information obtained in this thesis represents an advance in the understanding of the mechanisms that control the induction of flowering in perennial species, and also establishes the background for the design of management strategies for developing alternative crops with these characteristics.

Lesquerella mendocina; perennials; flowering; gibberellins; growth rate

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.6 Introducción general

La floración es un cambio en el patrón básico de desarrollo del meristema apical que se produce en respuesta a diferentes estímulos. El éxito reproductivo de una planta depende de que la inducción floral y posterior floración tenga lugar en el momento más adecuado de su desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean favorables (Turnbull, 2011). Debido a la falta de movilidad de las plantas y de sus características particulares de desarrollo, éstas han adquirido mecanismos especializados de control de tiempo de floración que aseguren el éxito reproductivo y la persistencia de la especie (Bernier, 1988; Tan y Swain, 2006).

Se puede distinguir entre plantas que completan su desarrollo dentro del año, floreciendo sólo una vez durante su ciclo de vida, llamadas plantas anuales y plantas que viven más de un año, tales como las bianuales o perennes. Dentro de éstas últimas, hay especies que florecen una sola vez durante su ciclo de vida (especies monocarpicas) y otras que florecen todos los años en forma recurrente (especies policarpicas).

Aunque no hay una uniformidad general, normalmente la floración es estacional y requiere de un cierto grado de desarrollo vegetativo (“madurez” para la floración). Así, plantas de la misma especie en un área geográfica determinada, florecen en forma sincronizada para que pueda producirse el intercambio génico entre ellas. Por otro lado, el tiempo en que se produce la transición entre crecimiento vegetativo y la floración es de vital importancia en la agricultura (Bernier et al., 1993). El momento en que ocurre esta transición es uno de los eventos de desarrollo más plásticos en el ciclo de vida de las plantas y es determinante para asegurar que la floración y fructificación ocurran en condiciones favorables (Ausín et al., 2005).

En sentido fisiológico, se entiende por floración a la inducción y formación de los primordios florales. Factores internos (hormonales y nutritivos) y externos (fotoperíodo, temperatura y vernalización principalmente) condicionan el control de la inducción floral. Una característica importante de la adaptabilidad de las plantas, reside en su capacidad de acelerar o disminuir la tasa de desarrollo en función del ambiente. Las plantas poseen diferentes estrategias reproductivas y son múltiples las causas que convergen para regular el desarrollo del meristema apical. Muchas plantas responden al ambiente para controlar el tiempo a floración y se disparan señales endógenas que regulan su transición (Tan y Swain, 2006). En conjunto, los condicionamientos del medio externo sobre la dirección del desarrollo de la planta indicarían un alto grado de adaptación de las especies a su entorno mediante una interacción entre distintos receptores - sensores de la planta con los factores cambiantes del medio, los niveles hormonales internos, la distribución de asimilados y el programa genético de la planta (Ausín et al., 2005).

En los apartados siguientes se presenta un breve resumen del estado actual del conocimiento acerca de: 1) Factores ambientales que regulan el tiempo a floración en las plantas, 2) Señales fisiológicas y mecanismos de control que regulan el tiempo a floración en las plantas, 3) El análisis del caso de *Lesquerella mendocina*. Estos

antecedentes generan el marco en el que se inscriben los objetivos e hipótesis de esta tesis.

1.2 Factores ambientales que regulan el tiempo a floración en las plantas

El descubrimiento de la dependencia ambiental de la floración es relativamente reciente, de principios del siglo XX, que es cuando comenzaron a descubrirse variaciones ambientales que las plantas eran capaces de distinguir o de requerir para iniciar la floración. Las plantas “perciben” que las condiciones sean favorables para el desarrollo, crecimiento, reproducción sexual y maduración de semillas (Bernier et al., 1993; Levy y Dean, 1998; Simpson y Dean, 2002; Turnbull, 2011). La duración de las fases del desarrollo, entonces, es controlada por el genotipo y el ambiente.

La temperatura es un factor primario en la regulación del momento de floración de las plantas. El tiempo a floración también es regulado por la duración del día (fotoperíodo) y por el proceso de vernalización (acumulación de horas de frío) (Myers et al., 1982; Bernier et al., 1993; Slafer y Rawson, 1994; Roldan y Martínez Zapater, 2000). Las variaciones genotípicas en la respuesta a estos factores ambientales son responsables directas que determinan diferencias fenotípicas en el desarrollo (Garner y Allard., 1923; Aspinall, 1966; Wright y L. Hedges, 1987) e, indirectamente, en el rendimiento, atributo que se encuentra fuertemente asociado al tiempo a floración (Russell y R. Ellis, 1988).

En la mayoría de las plantas anuales, el tiempo a floración se establece como respuesta a los factores externos ambientales que son percibidos por diferentes órganos de la planta (Bernier y Perilleux, 2005). Así, el fotoperíodo y la irradiancia son percibidos por las hojas maduras, las bajas temperaturas (vernalización) por el ápice del tallo (Dennis et al., 1996; Amasino, 2005), mientras que el efecto de la temperatura es captado por toda la planta.

La temperatura y el fotoperíodo varían en forma regular a través del año. En el Ecuador, estas variaciones no existen y, conforme nos alejamos hacia los polos, las variaciones de estos dos factores se hacen más marcadas. La mayoría de las especies vegetales han desarrollado mecanismos para reconocer estas variaciones e identificar el momento propicio para florecer. Dependiendo del grado y tipo de requerimientos ambientales, las especies pueden ser clasificadas como con requerimientos absolutos o cualitativos (i.e. para florecer necesitan determinadas condiciones ambientales) o con requerimientos cuantitativos, (i.e. pueden florecer bajo muy variadas condiciones ambientales, pero el tiempo a floración se acelera o se retrasa dependiendo del ambiente).

El desarrollo fenológico tiene una respuesta a la temperatura (Wallace, 1985) y es considerada como un factor principal en el control de la tasa de desarrollo de las plantas (Morrison et al., 1989). La velocidad de desarrollo que determina la duración de una fase fenológica, medida en días, tiene una relación directa con la temperatura (Hodges y Dorainswamy, 1979; Monteith y 1981). De este modo, la relación curvilínea entre la duración de una fase y la temperatura (Fig. 1.1a), es caracterizada más convenientemente por una respuesta bi-lineal de la tasa de desarrollo, que se estima indirectamente como la recíproca de la duración y cuya unidad es d^{-1} (Fig. 1.1b).

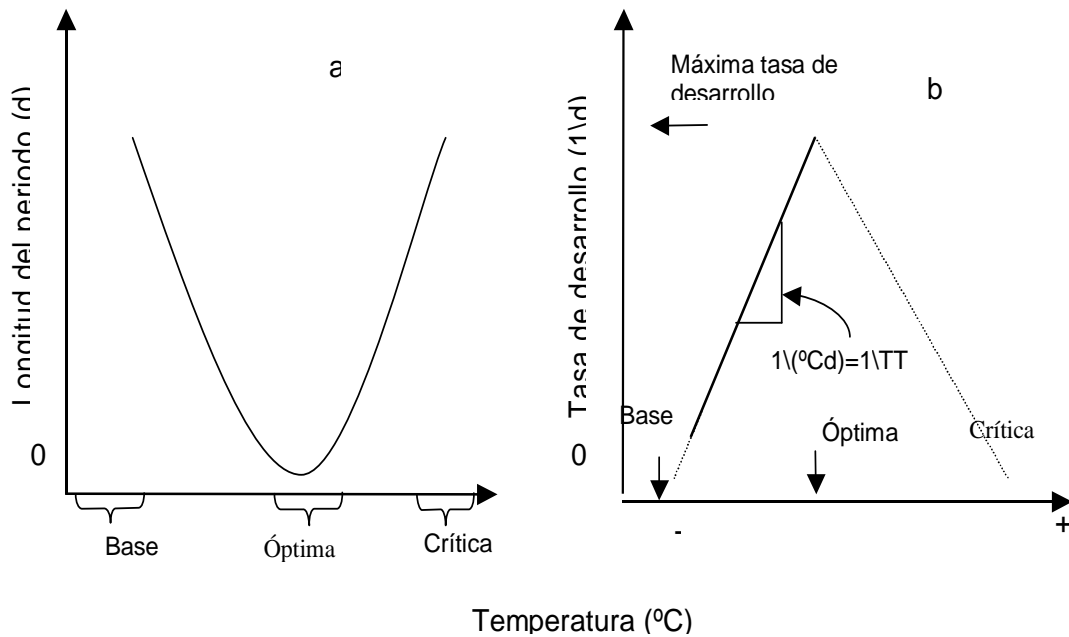


Figura 1.1: Duración de una etapa de desarrollo sometida a distintas temperaturas (a) y su inversa (b), la tasa de desarrollo de una etapa de desarrollo a distintas temperaturas. La inversa de la pendiente de la fase lineal inicial de la figura 1b es el tiempo térmico. En a y b, sobre el eje de las abscisas se indican las distintas temperaturas cardinales.

Con temperaturas inferiores a la temperatura base no hay desarrollo mensurable del cultivo. Por sobre ésta, la tasa de desarrollo se incrementa en la medida en que aumenta la temperatura, hasta que alcanza su máxima tasa a una temperatura óptima (o rango de temperaturas cuando la respuesta es de tipo hiperbólico). Temperaturas sobre este valor generalmente reducen la tasa de desarrollo del cultivo hasta que en la temperatura máxima o crítica cesaría el desarrollo del cultivo (Major et al., 1975; Ritchie y NeSmith., 1991; Salisbury y Ross, 1994). Así, muchos estudios se han hecho para determinar las temperaturas base, óptimas y máximas para el desarrollo de varios cultivos (Major et al., 1975; Major et al., 1977; Ritchie y NeSmith., 1991; Slafer y Rawson, 1995), enfatizando la importancia de conocer el valor de estos parámetros en el manejo y mejoramiento de los mismos.

La vernalización también influye en la floración de muchas plantas. Aquellas plantas o cultivos que disparan (requerimiento cualitativo) o aceleran (requerimiento cuantitativo) su desarrollo hacia la fase reproductiva luego de un período de frío tienen requerimientos de vernalización (Ahrens y Loomis, 1963). A pesar de que existen excepciones, la mayoría de las plantas originarias de latitudes mayores a 30° muestran respuesta a la vernalización (Roberts et al., 1988). Los requerimientos de vernalización reducen la posibilidad de que la floración se produzca antes de que termine la estación fría o cesen los riesgos de heladas durante la floración, momento en que las plantas son menos tolerantes a estrés por frío. El estímulo de la vernalización puede ser captado en semillas pregerminadas (Chouard, 1960).

Otro factor ambiental fundamental para la floración de las plantas es el fotoperíodo. Al igual que para la vernalización, la respuesta a este factor también puede ser cualitativa o cuantitativa. Para la etapa emergencia-floración se ha definido al fotoperíodo óptimo como aquel que determina que el subperíodo emergencia-floración se cumpla en el tiempo mínimo posible (Figura 1.2). El fotoperíodo óptimo mínimo o máximo según se trate de especies que responden a días largos o cortos, respectivamente, separa a rangos de fotoperíodo óptimos y no óptimos, siendo estos últimos responsables de atrasos en el inicio de la floración. En el caso de las plantas con requerimientos cuantitativos, la respuesta a este estímulo fuera del rango de valores de fotoperíodo óptimo se manifiesta como un alargamiento de la etapa vegetativa (Major y Kiniry, 1991). Un fotoperíodo crítico aparece en el modelo propuesto por Rood y Major (1980) definido como aquella duración del día en que la floración no se produce o marca el punto en que comienza el “plateau” de la duración máxima en días a floración con fotoperíodos no óptimos.

Entonces, los clásicos experimentos realizados por Garner y Allard. (1923), donde se descubrió el papel del fotoperíodo en el control de la floración, promovieron la investigación acerca del efecto de los factores ambientales sobre la duración del desarrollo en plantas y su cuantificación. Revisiones posteriores, como la realizada por Vince-Prue (1975), destacaron la complejidad de las interacciones entre la temperatura y la respuesta fotoperiódica. Estas interacciones entre los diferentes factores del ambiente pueden hacer que cada factor pueda cambiar el valor del umbral para la efectividad de los otros factores. Estas interacciones se intentaron explicar por diferentes modelos (Major y Kiniry, 1991; Summerfield et al., 1991) que cuantifican los efectos de la temperatura y el fotoperíodo sobre la duración de las fases del desarrollo y fueron desarrollados con fines predictivos y/o de manejo agronómico.

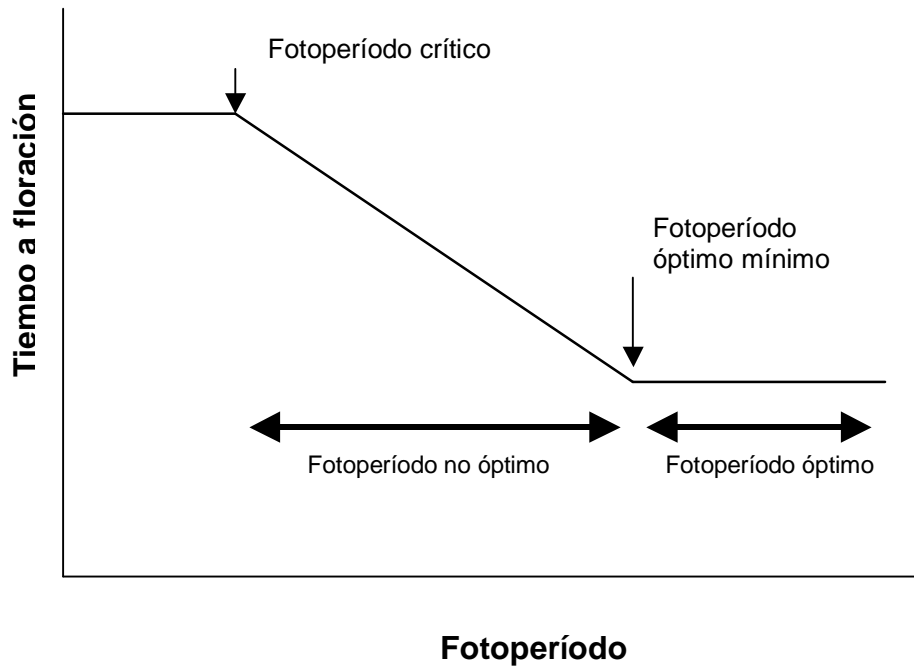


Figura 1.2: Efecto del fotoperíodo sobre el tiempo térmico hasta el fin de la etapa emergencia - floración, en una planta con respuesta cuantitativa de día largo, bajo temperatura constante. Adaptada de Major, 1980.

Además de responder positivamente a las señales ambientales, existen evidencias que revelan que la floración también podría ser inducida por otras señales del ambiente (sequía, deficiencias de nutrientes, cambios en la calidad de luz, etc). La ventaja adaptativa de estas respuestas residiría en permitir la producción de semillas antes de que la competencia por los recursos se haga muy severa, contribuyendo positivamente a la perpetuación de la especie (Levy y Dean, 1998; Simpson y Dean, 2002; Casal et al., 2003; Turnbull, 2011).

Respecto a la capacidad para percibir los estímulos ambientales, muchas plantas poseen una fase juvenil durante la cual son insensibles a cualquier señal del ambiente desencadenante de la floración. Esta sería una manera de asegurarse la suficiente acumulación de reservas como para sostener el costo reproductivo (Simpson y Dean, 2002).

Una categoría diferente de plantas en cuanto a su respuesta a los factores del ambiente para la determinación del tiempo hasta inducción floral, son las especies bianuales o perennes facultativas. Estas especies parecen comportarse como autónomas o independientes de la temperatura o el fotoperíodo para florecer. Es conocido que las plantas “bienales” pueden florecer en un año si crecen en ambientes favorables (Hirose y Kachi 1982) o bien demorar su floración más allá del segundo año de vida en estado silvestre (Kelly 1985; de Jong et al., 1986; Prins et al., 1990). Como el fotoperíodo no varía entre años, esta variabilidad estaría relacionada con la duración e intensidad del período de frío invernal (de Jong et al., 1986), o con la influencia de otros factores ambientales como la cantidad y calidad de luz, la disponibilidad de nutrientes, humedad y/o temperaturas extremas (Harper y Orden 1970; de Jong 1986; Reekie 1997; Reekie et al., 1997).

Bernier et al. (1993) detectaron en plantas perennes sensibilidad a la intensidad de radiación y señalan a este factor del ambiente como modulador del tiempo hasta inducción floral. Otros autores sugieren que las especies perennes florecen una vez que acumulan una determinada cantidad de biomasa, aparentemente respondiendo a señales internas, tales como tamaño de planta o número de nudos vegetativos (Hirose y Kachi, 1982; Lacey, 1986; Klinkhamer et al., 1987; Bazzaz, 1997; Reekie, 1997; Wesselingh et al., 1997). En cualquier caso, no hay evidencia suficiente que permita señalar a algún elemento ambiental o a algún atributo de la planta cuya adquisición esté regulada por el ambiente, como disparador de la cadena de eventos conducentes a la floración en especies perennes.

1.3 Señales fisiológicas y mecanismos que regulan el tiempo a floración en las plantas.

Si bien el tiempo a floración de la mayoría de las plantas se establece en respuesta a los factores ambientales, la transición a la floración, a su vez, está mediada por una serie de señales endógenas. Es decir, recién cuando las plantas alcanzan un estado de desarrollo que permite la transición al estado reproductivo, las señales del ambiente pueden ser percibidas por distintos órganos de la planta, los cuales generan señales endógenas hacia el meristema apical, determinando que el ápice permanezca vegetativo o se transforme en reproductivo (Bernier et al., 1993; Battey, 2000; Tan y Swain, 2006; Turnbull, 2011). En este sentido, hay evidencias de que existen una serie de vías (que pueden o no presentar tramos con cierto grado de superposición) que confluyen al final de la cadena, determinando de esa manera la integración de las señales ambientales y endógenas (fotoperíodo, vernalización, giberelinas y vía autónoma) y “decidiendo” o no la iniciación floral (Mouradov et al., 2002; Simpson y Dean, 2002; Boss et al., 2004; Corbesier y Coupland, 2005; Tan y Swain, 2006).

Existen evidencias de que el fotoperíodo produce estímulos transmisibles que inducen a la floración (Chailakhyan, 1936) y que éste se transmite a través del floema (King and Zeevaart, 1973; Corbesier y Coupland, 2006). La naturaleza química del estímulo ha sido investigada y el análisis de sustancias que llegan al meristema apical durante el proceso de inducción ha permitido observar cambios en los niveles de azúcares y fitohormonas (giberelinas, citocininas, poliaminas) (Morris y Arthur, 1985; Pharis et al., 1987; Bernier et al., 1993; Zeevaart y Gage, 1993; Roldan et al., 1997; Levy y Dean, 1998; Gocal et al., 2001; Ohto et al., 2001; Eriksson et al., 2006; King et al., 2008).

Varios experimentos han mostrado que en las hojas, el fotoperíodo produce promotores e inhibidores de la floración cuando la duración del día es favorable o desfavorable, respectivamente. Los tratamientos que inducen la floración pueden también incrementar el transporte de carbohidratos desde las hojas hasta el meristema apical (Corbesier et al., 1998; Rolland et al., 2006; King et al., 2008). Las señales son generalmente transportadas por el floema junto con los asimilados (King et al., 1973; Bernier, 1988; Corbesier y Coupland, 2006; Rolland et al., 2006). Si las señales se originan en las raíces, presumiblemente son transportadas por el xilema con la corriente transpiratoria. También existen evidencias de que la vernalización produce estímulos transmisibles que inducen a la floración (Roldan y Martínez Zapater, 2000) aunque la naturaleza de estos estímulos es aún controvertida. Es conocido que la floración en plantas que requieren frío para florecer puede ser disparada en condiciones no

inductivas por la aplicación de giberelinas: algunas evidencias muestran que la aplicación de giberelinas en plantas de roseta (*Arabidopsis*) que crecen en condiciones desfavorables para la inducción floral promueve la floración (Wilson et al., 1992; Bernier et al., 1993; Blázquez et al., 1998; Gocal et al., 2001; Eriksson et al., 2006; Zeevaart, 2006).

Durante las últimas décadas se propusieron modelos o teorías no mutuamente excluyentes que intentan explicar el control químico de la transición para la floración. La propuesta por Lang, 1965 y retomada por Colasanti y Sundaresan (2000), supone que la floración es promovida o inhibida por una hormona simple, específica y universal para todas las especies "el florigeno". Por otra parte, la hipótesis de Sachs y Hackett (1983), postula que la transición floral es inducida por los factores ambientales que modifican la relación fuente / destino dentro de la planta, de tal modo que el ápice bajo condiciones inductivas reciben mejor suplemento de asimilados que bajo condiciones no inductivas. El efecto de azúcares sobre la transición floral parece ser un mecanismo muy complejo (Rolland et al., 2002). En *Sinapsis alba*, una planta anual que se induce a la floración por días largos, ha sido sugerido que los azúcares podrían funcionar como una señalización a distancia durante la inducción floral (Bernier et al., 1993).

Algunos carbohidratos parecerían estar involucrados en la transición floral activando (Araki y Komeda, 1993; Roldan et al., 1999) o inhibiendo genes (Zhou et al., 1998; Ohto et al., 2001). Son numerosos los trabajos que muestran que el efecto del promotor o inhibidor del azúcar sobre el tiempo a floración depende de la concentración y el tiempo de adición del azúcar y del "background genético de las plantas (Koch, 1996; Zhou et al., 1998; Ohto et al., 2001; Rolland et al., 2002; Rolland et al., 2006). Finalmente, la teoría de control multifactorial postula que varias sustancias químicas (asimilados, Ca^{2+} , y fitohormonas) participan en forma conjunta en la inducción floral (Bernier et al., 1993). Ha sido sugerido que la sacarosa, proveniente de la degradación de almidón se acumula en el meristema apical e induce la floración en algunas especies (Heyer et al., 2004) y que las giberelinas, citocininas y auxinas podrían actuar como señales que producen la transcripción de genes para la transición floral en algunas especies (Bernier et al., 1993; Blázquez et al., 1998; Gocal et al., 2001; Ohto et al., 2001; Sakamoto et al., 2001). El análisis genético del tiempo a floración en cereales, arveja y *Arabidopsis* sostiene la hipótesis del control multifactorial de la floración (Weller et al., 1997; Koornneef et al., 1998). Se han identificado muchos genes que actúan promoviendo o inhibiendo la floración en estas especies que interactúan con factores ambientales o en forma autónoma (Levy y Dean, 1998; Simpson y Dean, 2002; Casal et al., 2003).

El estudio del control genético de la floración es posible sólo en plantas cuyo mapeo genético es completo; ese es el caso de *Arabidopsis*, en la cual muchos genes que afectan el tiempo a floración han sido identificados (Weigel, 1995; Amasino, 1996; Koornneef et al., 1998; Blázquez y Weigel, 2000; Sakamoto et al., 2001; Simpson y Dean, 2002; Casal et al., 2003). La transición del estado vegetativo a reproductivo en *Arabidopsis* involucra una acción secuencial de tres grupos de genes que han sido identificados (Amasino, 1996; Levy y Dean, 1998; Simpson y Dean, 2002). Estos grupos son 1) Genes que perciben y traducen las señales; 2) Genes integradores de señales (*FT*, *SOCI* y *AGL 20*) son genes que integran señales del ambiente y señales endógenas y 3) Genes específicos del desarrollo floral (*LFY*, *API*, *Cal*, *AP2* y *UFO* entre otros).

De acuerdo al modelo multifactorial, la floración puede ocurrir cuando los factores que la inducen están presentes en el meristema apical en concentraciones

apropiadas y en el momento adecuado (Levy y Dean, 1998). Este modelo intenta explicar las diversas respuestas a la floración, proponiendo que diferentes factores podrían limitar la floración en organismos de diferentes “background” genético y /o bajo particulares condiciones ambientales.

Por otra parte, teniendo en cuenta la primer teoría expuesta y conociendo que la naturaleza química de este estímulo es posiblemente compleja e involucre cambios en niveles de azúcares y fitohormonas, se ha demostrado recientemente en varias especies (*Arabidopsis*, Tomate (*Solanum lycopersicum*), Tabaco (*Nicotiana tabacum*) y especies con requerimientos ambientales contrastantes en lo que al control de la floración se refiere), que la proteína codificada por el gen Flowering locus T (FT) tendría un rol central en el proceso de inducción de la floración (An et al., 2004; Terper-Bammolker y Samach, 2005; Corbesier y Coupland, 2006; Zeevaart, 2006; Turck et al., 2008; Turnbull, 2011).

Por lo expuesto mas arriba, si bien existen numerosas evidencias fisiológicas que indican la existencia de señales o sustancias que inducen la floración, no está determinada la causalidad de estas asociaciones y se requiere la realización de estudios genéticos para arribar a conclusiones definitivas.

Por otra parte, la mayor parte de la información vertida más arriba proviene de estudios llevados a cabo con plantas anuales. Los mecanismos fisiológicos en interacción con el ambiente que controlan el desencadenamiento de la floración en las especies perennes no son conocidos en la actualidad (Tan y Swain, 2006). No obstante, una vez disparada la inducción floral, podrían operar en plantas perennes la misma cascada de eventos que opera en especies anuales (Heide, 1994; Erwin, 2007).

1.4 El análisis del caso de *Lesquerella mendocina*

Con posibilidades de ser introducidos como nuevos cultivos oleaginosos se encuentran especies del género *Lesquerella*, de origen americano. En Argentina, *L. mendocina* es la única especie ampliamente distribuida en las regiones serranas y montañosas del país, desde el sur de Buenos Aires a Mendoza y desde Jujuy al norte de la Patagonia (Correa, 1984). *Lesquerella mendocina* pertenece a la familia de las Brassicaceae, es una especie herbácea perenne policárpica, que se encuentra en proceso de domesticación. En consecuencia, una vez alcanzada la etapa reproductiva, los individuos tienen ciclos florales con frecuencia anual (Windauer et al., 2006). A pesar de ser una especie herbácea, su primer ciclo floral no se produce necesariamente durante su primer año de vida, pudiendo presentar una gran variabilidad en el momento de su floración. Así, pueden florecer durante la primera estación de crecimiento, la segunda o aún en años posteriores (Bloom et al., 2003). El interés en estas especies radica en que su semilla tiene un aceite de uso industrial. La planta alcanza hasta 50 cm de altura, tiene raíz pivotante, su semilla es ovada a reniforme y contiene alrededor de un 25-35% de aceite de alto valor, cuyo principal componente es un ácido graso hidroxilado (HFA, C20:1OH). Desde el punto de vista químico, estos ácidos grasos se caracterizan por poseer en su estructura un grupo “hidroxy” (OH) en su molécula. Estos ácidos grasos son utilizado para la fabricación de resinas, ceras, nylons, plásticos, inhibidores de la corrosión, cosméticos y grasas (Roetheli et al., 1991).

El tiempo en que ocurre la floración en las plantas es generalmente el carácter más importante para su adaptación y la obtención de los máximos rendimientos en un

ambiente dado (Richards, 1991), y en particular para su adaptación a ambientes adversos (Andrade y Sadras, 2000). Una característica importante de la adaptabilidad de las plantas, reside en su capacidad de acelerar o disminuir la tasa de desarrollo en función del ambiente. En este sentido, en poblaciones naturales situadas en la provincia de La Pampa, Argentina (Lihue Calel, 38° 65' 63'' S), se observó que durante el invierno la planta permanece en estado vegetativo (roseta), que el momento de floración ocurre a fines de agosto – principio de septiembre y que la semilla madura durante el mes de noviembre.

En investigaciones anteriores se observaron las siguientes respuestas de esta especie a factores ambientales en relación a la determinación del tiempo a floración: i) una respuesta cualitativa en relación a la temperatura (i.e. las plantas no florecían cuando crecían a temperaturas medias iguales o superiores a 24 °C (Windauer et al., 2004), ii) insensibilidad al fotoperíodo, a la vernalización y a las temperaturas cuando las mismas eran inferiores a 24 °C (Windauer et al., 2006) iii) la tasa de desarrollo se aceleraba conforme se atrasaba la fecha de siembra (Windauer et al., 2007). Estos resultados sugieren la existencia de un factor ambiental desconocido (i.e. ni temperatura, ni fotoperíodo) cuya capacidad inductiva aumenta cuando avanza la estación de crecimiento. Se observó también, que las plantas de *L. mendocina* florecían aún cuando existían grandes diferencias en la cantidad de biomasa acumulada (Windauer, 2002) lo que estaría descartando para esta especie, a la adquisición de un tamaño de planta “umbral” como un disparador de la inducción floral, como ha sido indicado para otras especies perennes (Hirose y Kachi, 1982; Lacey, 1986; Klinkhamer et al., 1987; Bazzaz, 1997; Reekie, 1997; Wesselingh et al., 1997). Tomados en conjunto, estos resultados permiten inferir que: i) *L. mendocina* puede ser clasificada como especie “autónoma” (i.e. su fenología no responde ni a la temperatura ni al fotoperíodo); ii) el factor del ambiente desconocido cuya capacidad inductiva aumenta con el avance de la estación de crecimiento sería la intensidad de radiación, en línea con lo que proponen Bernier et al. (1993) para especies autónomas; iii) la señal endógena (cuyo tiempo de determinación estaría modulado, entre otros factores, por la intensidad de radiación) disparadora de la inducción floral sería la adquisición de una “tasa de crecimiento umbral” y no de un “tamaño de planta umbral”.

Por cierto, una alta tasa de crecimiento por planta estaría indicando una alta circulación de azúcares en la planta (Bernier et al., 1993). El efecto de los azúcares sobre la transición floral, como se menciona en una sección anterior, fue estudiado en detalle y algunos carbohidratos parecerían estar involucrados, activando o desactivando la expresión de genes (Araki y Komeda, 1993; Zhou et al., 1998; Roldan et al., 1999; Ohto et al., 2001; King et al., 2008). En este marco, se podría argumentar que el cambio en la tasa de crecimiento de las plantas de *L. mendocina* (mencionado más arriba como asociado a la determinación de la inducción floral) podría producir una mayor disponibilidad de hidratos de carbono que dispararían la cadena de eventos que conducen a la floración. Es posible que, una vez disparada la señal por efecto de la concentración de carbohidratos, operen en *L. mendocina* (como así también en otras especies “autónomas”) elementos comunes a la cadena de señalización descrita para especies anuales. En este sentido, el papel de las giberelinas ya ha sido señalado (Mutasa- Göttgens and Hedden, 2009). Como este trabajo intenta profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la inducción de la floración, se pretende investigar hasta qué punto la síntesis de giberelinas forma parte de la cascada de eventos que, iniciada por un aumento en la concentración de carbohidratos, desemboca en la inducción de la floración. Ha sido reportado para *Arabidopsis* y arroz, que la síntesis de giberelinas que intermedia al estímulo

fotoperiódico, se encuentra regulada a nivel de la expresión del gen que codifica para una GA 2-oxidasa (Gocal et al., 2001; Sakamoto et al., 2001). Esta enzima inactiva giberelinas con actividad biológica y el gen que la codifica se expresa activamente cuando la planta no ha sido inducida. Una vez disparada la inducción, el gen de la GA 2-oxidasa deja de expresarse, lo que permite la acumulación de giberelinas activas que intermedian la señal.

Resulta evidente que las respuestas a la floración fueron mayoritariamente estudiadas en especies anuales y que poco se conoce en especies perennes y de comportamiento “autónomo” como *L. mendocina*. Sobre esta base, y a partir del cúmulo de evidencias expuesto hasta aquí, se enumeran a continuación los objetivos e hipótesis de esta tesis.

1.5 Objetivos e hipótesis

1.5.1 Objetivo general:

El objetivo general de esta tesis es el de generar avances relevantes en el conocimiento de los mecanismos que regulan o controlan la floración en especies herbáceas perennes.

1.5.2 Objetivos específicos e hipótesis:

- 1) Cuantificar en *L. mendocina* el tiempo hasta floración en respuesta a restricciones de factores ambientales que normalmente influyen en el crecimiento (radiación, nutrientes y disponibilidad hídrica, objetivo específico 1a). De esta manera se pondrá a prueba la hipótesis 1 (H_1) que sostiene que la inducción floral en *L. mendocina* está asociada con la adquisición de una determinada tasa de crecimiento umbral por planta. En la medida en que se encuentre una asociación entre la adquisición de una tasa de crecimiento umbral y la inducción a floración, se hará necesario determinar si efectivamente ese cambio de tasa de crecimiento es el que dispara la inducción floral, o si es meramente una consecuencia de que la inducción floral se haya disparado (objetivo específico 1b).
- 2) Determinar si la síntesis *de novo* de giberelinas forma parte de la secuencia de eventos que desencadena la inducción a floración. La hipótesis 2 (H_2) que subyace a este objetivo, sostiene que la inducción a floración disparada a partir de la adquisición de una TC umbral está mediada por una síntesis de giberelinas.
- 3) Identificar en *L. mendocina* la instancia regulatoria de la síntesis de giberelinas que se produciría como resultado de que se haya desencadenado la inducción a floración “aguas arriba”. De esta manera se pondrá a prueba la hipótesis 3 (H_3) que sostiene que la biosíntesis de giberelinas que conduce a la expresión de la inducción floral en *L. mendocina* está regulada a nivel de la expresión de genes que codifican para la enzima GA 2-oxidasa (que inactiva las GAs con actividad biológica) y/o el gen FT.
- 4) Establecer si el cambio en la tasa de crecimiento (TC) conlleva un aumento en la concentración endógena de hidratos de carbono que actuaría como señal para disparar la cadena de eventos conducentes a la inducción floral. La Hipótesis 4 (H_4) que subyace a este objetivo sostiene que la mayor disponibilidad de hidratos de carbono que resulta de la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por parte de la planta, es una señal que participa en el desencadenamiento de los eventos que conducen a la inducción floral.

1.6 Estructura de la Tesis

La presente tesis se estructura en 5 capítulos. Con el propósito de cumplir con los objetivos propuestos, el cuerpo de los resultados de este trabajo se presenta en los capítulos 2, 3 y 4. En cada uno de ellos, se presenta una introducción al tema, los objetivos particulares y se discuten los resultados obtenidos. En el capítulo 2, se describen los **resultados de cómo los factores ambientales que influyen en el crecimiento modulan el tiempo hasta floración en *L. mendocina***. En el capítulo 3, se describen los resultados **del cambio de la tasa de crecimiento como factor disparador de la inducción floral en *L. mendocina* y como la síntesis de novo de giberelinas forma parte de la secuencia de eventos que desencadena la inducción a floración en *L. mendocina*, conjuntamente con la síntesis del gen FT**. En el capítulo 4, se describen los resultados del **efecto de la disponibilidad de hidratos de carbono en la determinación del tiempo hasta el desencadenamiento de la floración en plantas de *L. mendocina***. Finalmente, el capítulo 5 comprende la discusión general de los resultados obtenidos en esta tesis.

CAPÍTULO 2

FACTORES AMBIENTALES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO MODULAN EL TIEMPO HASTA FLORACIÓN EN *L. mendocina*

2.1 Introducción

La transición entre el estado vegetativo y el estado reproductivo es un evento de desarrollo fundamental en las plantas (Koorneef et al., 1998; Simpson and Dean, 2002; Mouradov et al., 2002). El éxito reproductivo de una planta depende de que la inducción floral y posterior floración tenga lugar en el momento más adecuado de su desarrollo y cuando las condiciones ambientales sean favorables. Para maximizar el éxito reproductivo, esta transición es determinada por complejas interacciones entre factores ambientales y el programa genético interno de la planta. Debido a la falta de movilidad de las plantas y de sus características particulares de desarrollo, éstas han adquirido mecanismos especializados de control del tiempo de floración, que aseguren el éxito reproductivo y la persistencia de la especie (Bernier, 1988; Tan y Swain, 2006).

Se entiende por floración a la inducción y formación de los primordios florales. Factores internos (hormonales y nutritivos) y externos (fotoperíodo y temperatura, principalmente) condicionan el control de la inducción floral en la mayoría de las plantas. Sin embargo, algunas especies bianuales o perennes parecen comportarse como autónomas o independientes de la temperatura o el fotoperíodo para florecer (Boss et al., 2004). Así, es conocido que las plantas “bianuales facultativas” y algunas especies perennes pueden florecer en un año si crecen en ambientes favorables (Hirose y Kachi 1982) o bien demorar su floración más allá del segundo año de vida en estado silvestre (Kelly 1985; de Jong et al., 1986; Prins et al., 1990) o en sistemas de cultivos con ambientes desfavorables (Prins et al., 1990; Klinkhamer et al., 1991, Wesseling y de Jong, 1995; Burd et al., 2006). Como el fotoperíodo no varía entre años, esta variabilidad estaría dada por la duración e intensidad del período de frío invernal (de Jong *et al.* 1986), o por la influencia de otros factores ambientales como la cantidad y calidad de luz, la disponibilidad de nutrientes, humedad y/o temperaturas extremas (Harper y Orden 1970; de Jong, 1986; Reekie, 1997; Reekie et al., 1997).

Muchos autores sugieren que las especies perennes florecen una vez que acumulan una determinada cantidad de biomasa, aparentemente respondiendo a señales internas, tales como tamaño de planta o número de nudos vegetativos o tasa de crecimiento (Hirose y Kachi, 1982; Lacey, 1986; Klinkhamer et al., 1987; Bazzaz, 1997; Reekie, 1997; Wesselingh et al., 1997, Levy an Dean, 1998). Sin embargo, los resultados observados en algunas especies oleaginosas promisorias con comportamiento bianual facultativo descartan esta posibilidad (Gimenez, 2010 en *O. biennis*; Windauer et al., 2006 en *L. mendocina*). Por el contrario, existen evidencias que sugieren que la adquisición de una tasa de crecimiento umbral de la planta podría ser el factor endógeno que dispara los eventos posteriores que desencadenan la floración (ver Capítulo 1).

Tomando en cuenta que la tasa de crecimiento es fuertemente modulada por la disponibilidad de recursos, tales como nutrientes, radiación y agua (Taiz y Zeiger, 2006), parece razonable predecir que una limitación en la disponibilidad de estos recursos debería retrasar el desencadenamiento de la floración. No obstante, la información existente al respecto en la literatura es dispersa y contradictoria.

Algunos estudios han detectado, en plantas bianuales y perennes, sensibilidad a la intensidad de radiación, señalando a este factor como modulador del tiempo hasta inducción floral (Bernier et al, 1993; Bernier and Perilleux, 2005). Por otra parte, el nitrógeno inorgánico (N) es el nutriente más importante para el crecimiento de las plantas (Marschner, 1995; Miller et al., 2007). Existen estudios contradictorios en los que la baja disponibilidad de N acelera el tiempo a inducción floral y la floración (Dickens and van Staden, 1988; Bernier et al. 1993, Castro Marín et al., 2011), y en los que lo retrasa (Gimenez, 2010; Ploschuk y Windauer, 2010). Es posible que en los primeros el efecto del N haya actuado positivamente como señal desencadenadora de la floración en forma de nitrato (Castro Marín et al., 2011), mientras que en los segundos haya influido negativamente su efecto detractor sobre la tasa de crecimiento (Wesseling et al., 1997; Gimenez, 2010). De la misma manera, otro factor que condiciona el ambiente en que se desarrolla y crece una planta es la disponibilidad hídrica. Es conocido que el déficit hídrico conduce directa o indirectamente, a niveles bajos de fotosíntesis y por lo tanto a la disminución a la fuente de carbono (Syverstsen y Lloyd, 1994). Existen estudios en los que déficit hídricos previenen o retrasan la inducción floral en gramíneas (Aspinall and Husain, 1970; King and Evans, 1977), mientras que en girasol un déficit hídrico durante la etapa vegetativa no modifica el momento de inducción floral (Yegappan et al., 1980). Si bien el efecto de un estrés hídrico ha sido parcialmente estudiado en *L. mendocina* (Ploschuk, 2005; Ploschuk et al., 2005) en la actualidad es muy limitado el conocimiento del impacto del stress sobre el tiempo a inducción floral y la floración.

Sobre esta base, en este capítulo se propone abordar el objetivo específico 1^a de esta tesis, que es **Cuantificar en *L. mendocina*, el tiempo hasta floración en respuesta a restricciones de factores ambientales que normalmente influyen en el crecimiento (radiación, nutrientes y disponibilidad hídrica). De esta forma, se pondrá a prueba la H₁ que sostiene que el tiempo a floración en *L. mendocina* está asociado con la adquisición de una determinada tasa de crecimiento umbral por planta.**

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Condiciones generales

Las semillas de *L. mendocina* utilizadas provenían de cultivos de multiplicación en Buenos Aires, cuyo lugar de origen natural es el Parque Nacional Lihuel Calel, La Pampa, Argentina (37° 57' S, 65° 33' O). Todos los experimentos se llevaron a cabo en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA; 34°35'S, 58°29'O).

2.2.2 Determinación de Estados de Desarrollo

Escala fenológica

Por tratarse de una especie en la que no se encuentra ninguna descripción para diferentes estados fenológicos, se construyó una escala fenológica, que describe los aspectos más importantes del crecimiento y desarrollo.

Emergencia (E): cuando los cotiledones son visibles en la línea de siembra.

Aparición de hojas verdaderas (Vn): n hojas verdaderas desplegadas, se considera que una hoja esta desplegada cuando mide más de 1cm.

Estado de Roseta (ER): este estado se extiende desde la aparición de la cuarta hoja verdadera hasta que el primer entrenudo comienza a alargarse, e incluye parte de la aparición de hojas. Durante la formación de la roseta las hojas más viejas se encuentran en el exterior y las nuevas se encuentran en el centro de la misma.

Aparición de Ramificaciones (AR):

AR1: este estado comprende la aparición de ramificaciones en las axilas de las hojas, comenzando por las hojas más viejas (esto depende de las condiciones lumínicas a las que están sometidas las hojas).

AR2: Alargamiento de los entrenudos de las ramificaciones.

Botón floral visible (BFV): yemas florales unidas, todavía escondidas por las hojas terminales en las ramificaciones.

Alargamiento de pedúnculos de las yemas florales(A): los pedúnculos florales se alargan comenzando por los de la periferia, en sentido acrópeto.

Principio de floración (PF): una flor abierta sobre la vara floral sobre alguna ramificación.

Plena floración (FL): Alargamiento de vara floral con numerosas flores abiertas.

Llenado de granos (P): Formación y llenado de frutos.

Madurez(M): cuando el 25 % de las semillas de la parte media de la vara floral vira del color verde a marrón o anaranjado según la especie.

A fin de cuantificar la duración de las fases de desarrollo, es necesario conocer precisamente el momento en el que ocurren los eventos que dividen el ciclo completo en dichas fases, es decir los marcadores del progreso fenológico. En esta tesis se han considerado como estados claves las siguientes etapas visibles a simple vista, la emergencia de la plántula (E), el botón floral visible (BFV), la aparición de las primeras flores (PF), plena floración (FL) y Madurez (M). Se eligieron estos eventos para dividir el desarrollo total por ser indicativos de cambios en la ontogenia y por su fácil observación. Como existía variabilidad entre plantas, las fechas en que ocurrieron los eventos fenológicos fueron consideradas como el momento en que el 50% de las plantas se encontraban en el estado considerado. La duración de las fases se calculó en días.

2.2.3 Experimento 1. Restricción de radiación

El experimento se llevó a cabo durante el año 2005 y el suelo era un Argiudol típico, con alto contenido de fósforo y bajo de nitrógeno, cuyo pH es de 6.5. Previo a la siembra se realizó una aplicación de 150kg/ha de urea al voleo. El experimento constó de parcelas de campo con tres repeticiones (n=3), con un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) con una densidad de 50 pl.m⁻². Cada parcela constaba de 8 hileras de 1,2 m de longitud, separadas a 0.20 cm. El experimento fue sembrado a mano

el 5 de junio y se mantuvo a las parcelas libres de malezas en forma manual mediante un desmalezado periódico.

Se diseñó un sistema para controlar la radiación incidente sobre el cultivo y generar restricciones en su tasa de crecimiento. Cuando las plantas alcanzaron 3 hojas (V3), aproximadamente a los 15 días de la emergencia se aplicaron aleatoriamente los tratamientos de restricciones de la radiación. Se realizaron tratamientos con 5 niveles de radiación que difirieron en la duración del período de sombreo, y fueron los siguientes:

TCR: Tratamiento control con plena radiación o 100% de radiación incidente

T1: Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación durante 21 días

T2: Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación durante 42 días.

T3: Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación durante 64 días.

T4: Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación hasta que se detectó botón floral visible.

En los tratamientos de restricción de radiación (T1, T2, T3, T4), el sombreo fue logrado con mallas que interceptaban el 65% de la radiación incidente, de manera que solo el 35% de la radiación incidente alcanzaba el canopeo. Las mallas no modificaban la calidad de luz (i.e. la relación rojo/rojo lejano). Se midió en forma instantánea la intercepción de la radiación durante el mediodía solar con un sensor puntual de radiación PAR Li-190 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska), conectado con un registrador de datos Li-1000 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska) durante un día totalmente despejado. Para cada parcela se realizaron cinco submuestreos en forma aleatoria. La temperatura del aire fue registrada con un sensor conectado al mismo registrador, que fue programado para testear el efecto del sombreo sobre la temperatura (mediciones semihorarias), encontrándose que las mallas no modificaban la temperatura del aire significativamente.

2.2.4 Experimento 2. Restricción de nutrientes

El 18 de mayo de 2011 se sembraron manualmente semillas de *L. mendocina* en terreras a campo con una mezcla de tierra negra y arena (microparcelas). Las unidades experimentales eran terreras situadas a campo (1.2 m x 1.00m x 0.12m) que contenían una mezcla de tierra negra y arena (20% y 80% respectivamente) con 4 repeticiones (n=4), con un diseño completamente aleatorizado (DCA) y una densidad de 50 pl m⁻² (Fig.2.1). En estas terreras se realizaron ocho líneas de siembra, separadas a 0,20 m. El experimento se mantuvo libre de malezas mediante remoción manual periódica y se regaba diariamente para llevar al suelo a la capacidad de campo.

El experimento constó de dos tratamientos que se aplicaron en forma aleatoria en las terreras:

TCF: Tratamiento control que se regó con solución nutritiva (Fertiriego) y agua, alternativamente (día por medio), desde el momento en que el 50 % las plantas de las terreras alcanzó 2 hojas (V2) hasta el fin del experimento.

TSF: tratamiento sin Fertiriego (con limitaciones nutricionales) que se regó con agua solamente.

Durante todo el experimento, cada vez que se pronosticaron lluvias (Servicio Meteorológico Nacional, SMN), las plantas se cubrieron transitoriamente con techos

plásticos corredizos, para evitar la incidencia de precipitaciones que modifique la concentración de los nutrientes y que no se produzcan daños sobre las plantas (Fig. 2.2).



Figura 2.1: Vista parcial del armado del Experimento 2 y 3

2.2.5 Experimento 3. Restricción hídrica

Se sembraron semillas de *L. mendocina* el 18 de mayo de 2011 en terreras a campo (microparcels) con una mezcla de tierra negra y arena. Las unidades experimentales eran terreras a campo (1.2 m x 1.00m x 0.12m) que contenían con una mezcla de tierra negra y arena (80% y 20% respectivamente) con tres repeticiones (n=3), con un diseño completamente aleatorizado (DCA) y una densidad de 50 plm⁻². El arreglo espacial y el control de malezas es el mismo que el utilizado para el Exp. 2 (Figura 2.1).

Todas las microparcels fueron regadas diariamente hasta la saturación del suelo hasta que se establecieron los tratamientos de stress hídrico, los cuales fueron impuestos por la interrupción del riego a partir de que las plantas alcanzaron el estado tres hojas (V3). Se monitoreó el contenido gravimétrico de humedad del suelo (HR%), a partir de toma de muestras cada 4-5 días. De esta manera, se estimó el potencial agua del suelo (Ψ_s) a través de la evolución de la HR%, con una curva de calibración de (Ψ_s) en función a la HR%. Para cuantificar el estado hídrico de las plantas, se realizaron mediciones de potencial agua (Ψ_{apl}) semanalmente mediante una bomba de Scholander (Scholander et al, 1965). Todas las mediciones se hicieron al mediodía en el tallo principal de plantas enteras.

En cada una de las terreras se aplicaron en forma aleatoria los siguientes tratamientos de disponibilidad hídrica

TCA: Tratamiento control, las terreras fueron mantenidas a capacidad de campo.

TSA: Tratamiento de estrés hídrico, las terreras fueron restringidas en el riego para generar un estrés hídrico.

TSA comenzó cuando las plantas se encontraban con 2 hojas (V2), y fueron aplicados durante 40 días aproximadamente y a partir de allí se restableció el suministro hídrico hasta terminar el experimento. Al igual que lo hecho en el Exp. 2, cada vez que se pronosticaron lluvias, las plantas se cubrieron transitoriamente con techos plásticos corredizos, de manera de evitar que se modifique el contenido hídrico con las precipitaciones (Fig. 2.2)



Figura 2.2: Vista y detalle del experimento con los plásticos corredizos desplegados para no recibir el agua de lluvia.

2.2.6 Mediciones y análisis estadístico

En todos los experimentos se realizaron observaciones fenológicas diarias de las plantas en cada uno de los tratamientos. Para la descripción de los estados fenológicos, se generó una escala que es descripta en la primera sección de los resultados. Los estados registrados fueron emergencia (E), aparición de inflorescencia o botón floral (BFV), principio de floración (PF) y madurez (M). Se consideró que se llegaba a un determinado estado fenológico cuando el 50% de las plantas de cada parcela se encontraban en el mismo estado. En todos los tratamientos se cuantificó el número de días en que las plantas alcanzaron el botón floral visible (BFV).

Para establecer la asociación entre los cambios en la tasa de crecimiento y la inducción floral de las plantas, se cosecharon semanalmente 2-3 plantas por tratamiento, se secaron en estufa a 65°C por 72 h hasta peso constante. Posteriormente las plantas enteras fueron pesadas para determinar su peso seco. Para estimar las tasas de crecimiento, se utilizó el siguiente modelo condicional de regresión lineal que asociaba la marcha del peso seco con el tiempo:

$$\text{Peso seco} = a + b * \text{DDE si } (\text{DDE} \leq c) + d (\text{DDE} - c) \text{ si } (\text{DDE} \geq c); \quad (\text{Eq. 1})$$

donde DDE son los días después de la emergencia; “a” es la ordenada al origen, “b” y “d” son diferentes pendientes de la regresión lineal equivalentes a tasas de crecimiento y “c” es el punto de quiebre de la función que indica el día en que se produjo un cambio en la de tasa de crecimiento. Todos los parámetros se compararon estadísticamente usando un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) se compararon las medias mediante un test de Tukey.

Las mediciones de potencial agua de las plantas del Experimento 3 se analizaron en cada fecha mediante análisis de variancia.

2.3 Resultados

2.3.1 Fenología de las plantas

El tiempo desde la emergencia hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de *L. mendocina* fue afectado tanto por el nivel de radiación disponible, como por la disponibilidad de agua y de nutrientes, respectivamente (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1: Número de días desde emergencia (DDE) hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de radiación (Exp. 1,) disponibilidad nutricional e hídrica (Exp.2 y 3). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada experimento ($p < 0,05$). Medias \pm error estándar

Experimento	Tratamiento	Días a BFV
1. Radiación	TCR	68 \pm 1 b
	T1	70 \pm 2 b
	T2	91 \pm 2 a
	T3	92 \pm 3 a
	T4	97 \pm 3 a
2. Nutrientes	TCF	74 \pm 1 b
	TSF	81 \pm 2 a
3. Agua	TCA	74 \pm 2 b
	TSA	94 \pm 4 a

En todos los experimentos, las plantas de los tratamientos control adelantaron sensiblemente su fenología ($P < 0,05$) con respecto a las plantas sometidas a restricciones de radiación, agua y nutrientes. Se observó que las plantas sometidas a restricciones de radiación fueron las que tuvieron el mayor retraso en alcanzar el estado reproductivo, en comparación con las plantas sometidas a restricciones hídricas y nutricionales. Los resultados muestran que las plantas del Exp. 1, cuando se les aplicaron los tratamientos de sombra, requirieron en promedio 25 días más en alcanzar el estado reproductivo que las plantas en plena radiación, con la excepción del T1 que no difirió significativamente del tratamiento control. La reducción de la disponibilidad de agua produjo un retraso de 20 días en alcanzar BFV y la menor disponibilidad de nutrientes para las plantas produjo un retraso significativo ($P < 0,05$), aunque menor, de 7 días en alcanzar el BFV con respecto a los tratamientos control (Exp. 3).

2.3.2 Tasas de crecimiento

Al analizar los parámetros del modelo de regresión lineal para estimar la asociación entre el peso seco de las plantas y el tiempo, se observó que la tasa de crecimiento inicial (parámetro b) para las plantas de todos los tratamientos en los diferentes experimentos fue muy baja y no difirió significativamente entre sí (Figuras 2.3, 2.4 y 2.5; Cuadros 2.2 y 2.3).

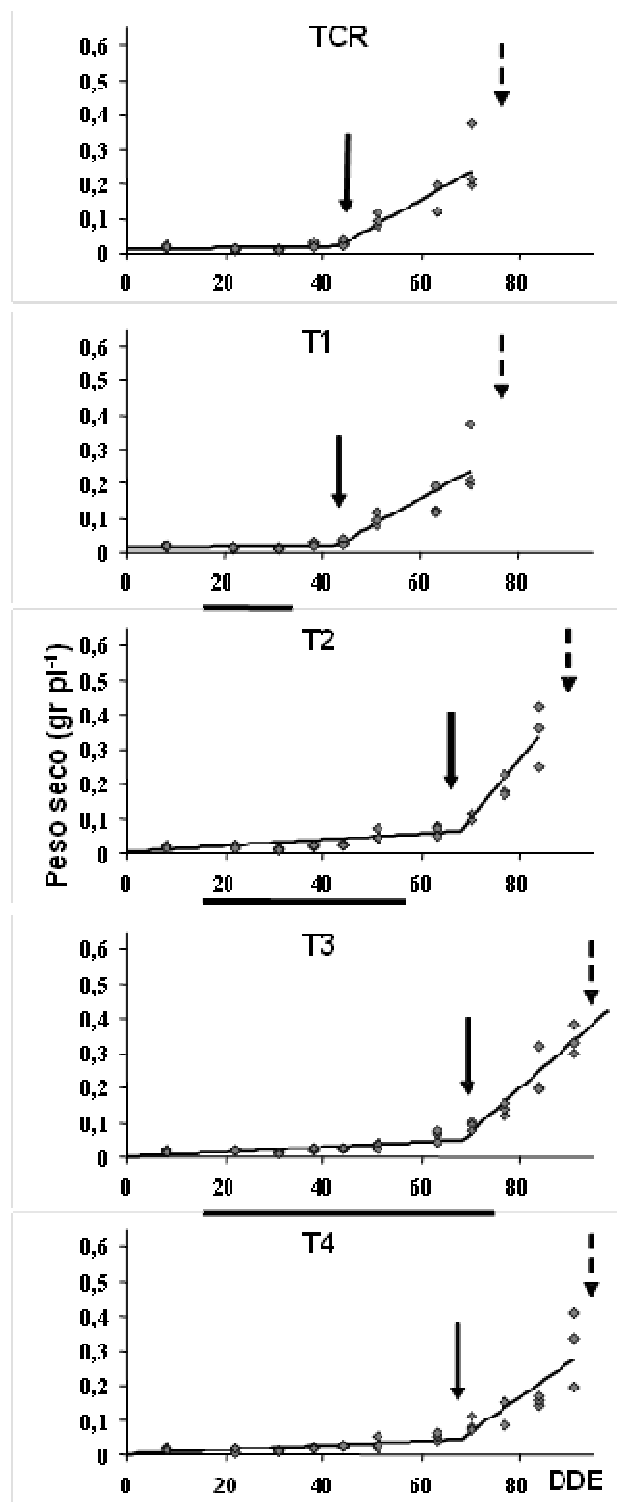


Figura 2.3: Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de radiación (Experimento 1). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el

botón floral visible (BFV). Las barras horizontales indican la duración de los tratamientos de sombreado.

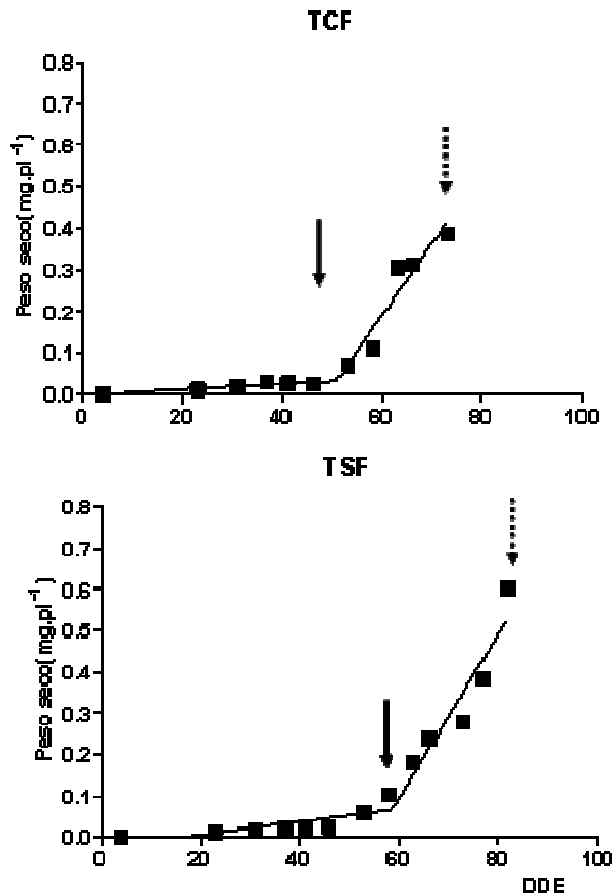


Figura 2.4: Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de disponibilidad de nutrientes (Experimento 2). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV).

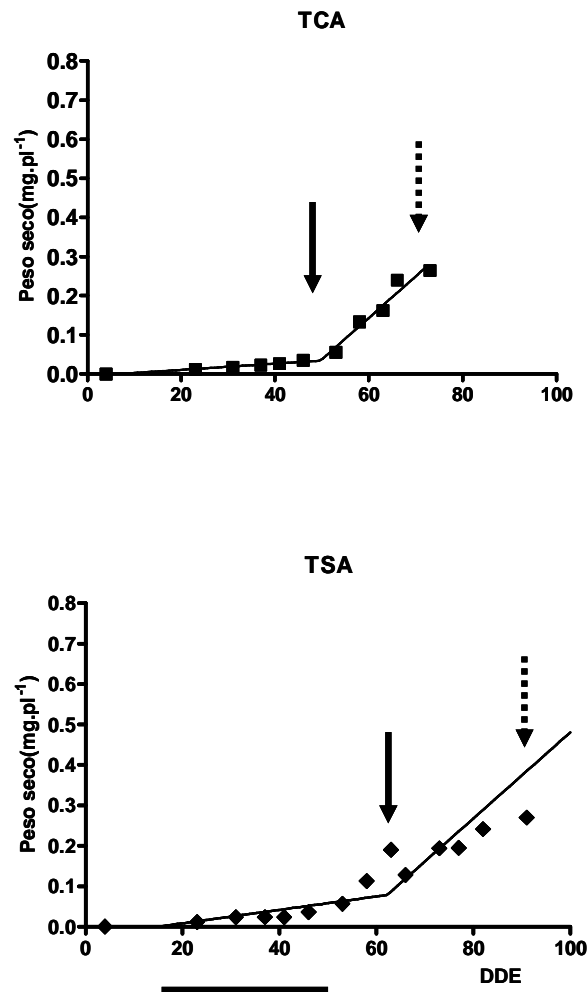


Figura 2.5: Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos de disponibilidad hídrica (Experimento 3). La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV). La barra horizontal indica la duración del tratamiento de restricción hídrica.

Cuadro 2.2. Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del experimento 1, de radiación mostrados en la en la figura 2.3. **TCR:** control, 100% de radiación incidente, T1: 21 días, T2: 42 días, T3: 64 días y T4: mantenido en baja radiación hasta BFV (tratamientos de sombreo).

Tratamientos	Parámetros			
	a	b	c	d
TCR	0.0124 NS (0.02202)*	0.0003 NS (0.00081)	42 b (2.64)	0.009 b (0.00150)
T1	0.0124 NS (0.02707)	0.0001 NS (0.00099)	43 b (3.63)	0.008 b (0.00148)
T2	-0.0026 NS (0.01565)	0.0008 NS (0.00038)	68 a (1.46)	0.015 a (0.00180)
T3	0.0006 NS (0.00067)	0.0007 NS (0.00033)	68 a (1.59)	0.011 ab (0.00191)
T4	0.0010 NS (0.01994)	0.0006 NS (0.00049)	68 a (2.91)	0.009 b (0.00150)

a: ordenada al origen; **b:** pendiente inicial (tasa de crecimiento); **c:** punto de quiebre de la función; **d:** pendiente final (tasa de crecimiento).

*Los números entre paréntesis muestran el error estándar para los parámetros estimados y las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada experimento ($p < 0,05$). NS: No significativo.

Cuadro 2.3. Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) de los experimentos de agua y nutrientes mostrados en la en la figura 2.4 y 2.5. **TCA:** control, capacidad de campo, **TCS:** estrés hídrico; **TCF:** control sin limitaciones nutritivas, **TSF:** con limitaciones nutritivas.

Tratamientos	Parámetros			
	a	b	c	d
TCA	-0.0052 NS (0.01610)*	0.00079 NS (0.0004)	50b (1.97)	0.01062 NS (0.00107)
TCS	0.002487 NS (0.05183)	0.00099 NS (0.0012)	63a (5.76)	0.01065 NS (0.00136)
TCF	-0.0023 NS (0.03180)	0.00068 NS (0.0009)	51 b (2.25)	0.0172 NS (0.00219)
TSF	-0.0024 NS (0.03818)	0.00091 NS (0.0009)	59 a (2.75)	0.0198 NS (0.002805)

a: ordenada al origen; **b:** pendiente inicial (tasa de crecimiento); **c:** punto de quiebre de la función; **d:** pendiente final (tasa de crecimiento).

*Los números entre paréntesis muestran el error estándar para los parámetros estimados y las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada experimento ($p < 0,05$). NS: No significativo.

Sin embargo, el momento de adquisición de la segunda tasa de crecimiento (parámetro c) se retrasó con la aplicación de los tratamientos de restricción, independientemente del factor limitante (radiación, agua o nutrientes). Para el Exp. 1, cuando la restricción de radiación superó los 21 días (T2, T3 y T4), lo que coincidiría con mantener las plantas debajo de la sombra mas allá del día 36 después de su emergencia, se atrasó sustancialmente tanto el momento de adquisición de la segunda tasa de crecimiento como el momento de BFV. Sin embargo, la aplicación de periodos de sombra mayores al tratamiento 2 (42 días), es decir los tratamientos 3 y 4 (64 días y hasta alcanzar BFV con sombreo, respectivamente) no modificaron ni la fenología ni el momento de adquisición de la segunda tasa de crecimiento con respecto al tratamiento 2 (Cuadro 2.2 y figura 2.3).

El retraso en la adquisición de la segunda tasa de crecimiento se tradujo también en retraso en la aparición del botón floral visible. En términos generales, el intervalo de tiempo entre el cambio de tasa (parámetro c del modelo de regresión lineal) y BFV fue

similar en todos los tratamientos, e independiente de la naturaleza del factor limitante (Cuadro 2.4): en promedio fue de 25 días. La constancia de este intervalo se vio reflejada en el hecho de que el ajuste entre BFV y “c” tuvo una pendiente similar a 1, con una ordenada al origen similar al promedio deducido del Cuadro 2.4 (Fig. 2.6).

Cuadro 2.4: Número de días entre el cambio en la tasa de crecimiento, parámetro **c** del modelo de ecuación lineal, hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de radiación (Exp. 1), disponibilidad nutricional (Exp.2) y hídrica (Exp. 3).

Experimento	Tratamientos	Días desde c a BFV
1. Radiación	TCR	26 ± 1
	T1	27 ± 2
	T2	23 ± 2
	T3	24 ± 3
	T4	29 ± 3
2. Nutrientes	TCF	23 ± 1
	TSF	23 ± 2
3. Agua	TCA	24 ± 1
	TSA	31 ± 4

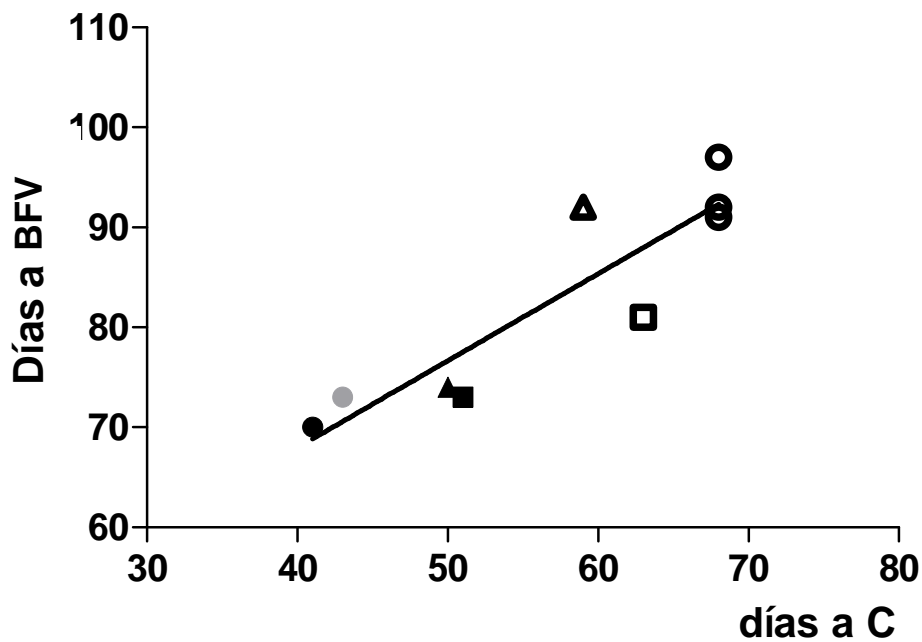


Figura 2.6: Número de días a botón floral visible (BFV) en función a los días a cambio de tasa de crecimiento (parámetro c , de la regresión lineal) en las plantas de los tratamientos de radiación (●), disponibilidad hídrica (▲) y nutricional (■). Los símbolos llenos pertenecen al tratamiento control; los símbolos vacíos a los tratamientos de restricción de cada uno de los factores de crecimiento. El símbolo gris indica el T1 del experimento de radiación (que no difirió estadísticamente del control)

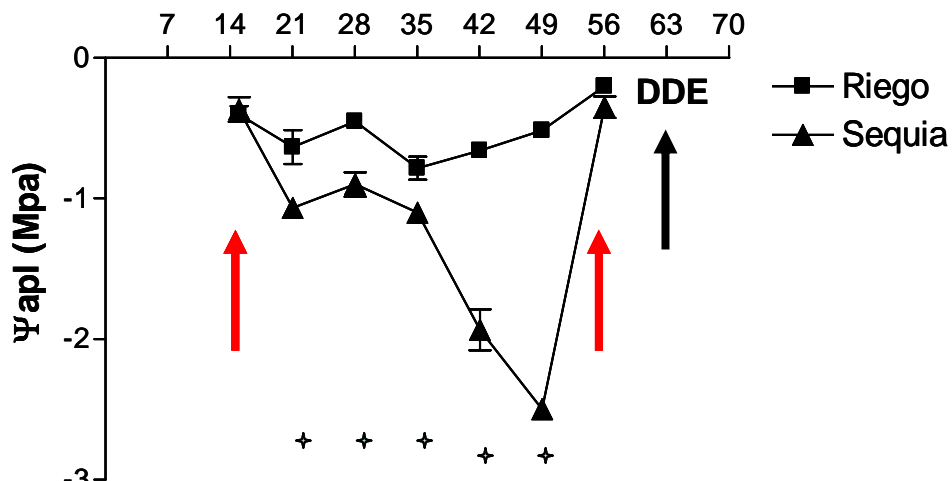


Figura 2.7: Potencial agua de las plantas (Ψ_{apl}) de *L. mendocina* en los tratamientos control (■) y con estrés hídrico (▲) medido a mediodía. Las flechas rojas indican el comienzo y la finalización del periodo con restricción en el riego en el tratamiento con estrés hídrico y la flecha negra indica el momento en que se produjo el cambio en la tasa de crecimiento (parámetro c). Los segmentos verticales indican el error estándar y sólo se muestran cuando son más grandes que el símbolo. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos para cada fecha.

En contraposición con lo observado en el Exp. 1 (radiación) en el que el parámetro “c” se detectó durante el período de exposición al tratamiento, en el Exp. 3 (disponibilidad hídrica) no se produjo el aumento de tasa de crecimiento hasta que la sequía efectiva fue finalizada por el resuministro de riego (Figs. 2.5 y 2.7).

En relación con la marcha del potencial agua de la planta (Exp. 3), se detectaron diferencias significativas entre tratamientos de disponibilidad hídrica a partir de los 21 DDE ($P < 0,05$). La diferencia significativa se mantuvo a lo largo del estrés hídrico, llegando a valores de -2.5 MPa en las plantas estresadas inmediatamente antes de la restauración del riego (Figura 2.5) a los 56 DDE. En ninguna fecha de medición se detectaron diferencias significativas en el Ψ_{apl} dentro de cada tratamiento.

Finalmente, se observó en todos los experimentos que las tasas de crecimiento posteriores al quiebre (parámetro d) de las plantas sometidas a restricciones de radiación, agua o nutrientes fueron similares para todos los tratamientos (Cuadro 2.2 y 2.3). En promedio, y considerando todos los tratamientos la tasa de crecimiento después del quiebre (parámetro c) tuvo un valor de $0.01 \text{ g d}^{-1} \text{ pl}^{-1}$. El valor de esta tasa podría ser tomada como valor de referencia (TCu, tasa de crecimiento umbral) para investigar si la adquisición de tal tasa de crecimiento es la causa o meramente la consecuencia de que la inducción floral se haya disparado.

2.4 Discusión

L. mendocina es una especie herbácea perenne en proceso de domesticación que parece comportarse como autónoma o independiente de la temperatura o el fotoperíodo para florecer, al menos durante un periodo de tiempo (Windauer et al., 2004; 2006; 2007). Resultados de algunos experimentos sugerían, sin embargo, la existencia de un factor ambiental desconocido (i.e. ni temperatura, ni fotoperíodo) cuya capacidad inductiva aumentaría cuando avanza la estación de crecimiento (Windauer et al., 2006). Se encontró, además, una asociación cuantitativa negativa entre el tiempo a floración y la cantidad de radiación acumulada y que las plantas de *L. mendocina* florecían aún cuando existían grandes diferencias en la cantidad de biomasa acumulada (Windauer, 2002) lo que estaría descartando para esta especie, a la adquisición de un tamaño de planta “umbral” como un disparador de la inducción floral y estaría apoyando la hipótesis que *L. mendocina* podría responder a señales internas, tales como la tasa de crecimiento. Además, Ploschuk (2005), mostró que el tiempo a floración es retrasado en esta especie en condiciones de restricción hídrica. Tomados en conjunto, estos trabajos permiten inferir en *L. mendocina* que factores del ambiente que afectan el crecimiento (i.e. radiación, agua y nutrientes) de la planta podrían estar modulando el momento en que la planta responde a factores universalmente conocidos como controladores del desarrollo, tales como la temperatura, el fotoperíodo o la vernalización.

Los resultados claramente demuestran que la limitación de los tres factores ambientales manejados en los distintos experimentos, influyeron en las dinámicas de ajuste bilineal de las marchas del peso seco de la planta. Así, el momento en que la tasa de crecimiento aumentó a valores de $0.01 \text{ g.d}^{-1} \text{ .pl}^{-1}$, se retrasó hasta 26 días en el Exp. 1 (Cuadro 2.2). Los resultados también revelaron que el retraso en el momento en que las plantas adquirieron el valor umbral de tasa de crecimiento (TCu), definida aquí como la tasa de crecimiento que una planta individual debe alcanzar o superar para ser capaz de

florecer, se dio por la limitación del agua y los nutrientes y fue de 13 y 8 días, respectivamente (Cuadro 2.3). Este retraso, a su vez, prorrogó en forma conservativa el tiempo transcurrido hasta el desencadenamiento de la floración para todos los experimentos, ya que el intervalo entre el momento de quiebre de la pendiente y la aparición del botón floral visible se mantuvo constante (en promedio fue de 25 días en todos los experimentos) (Cuadro 2.4, Fig.2.6). De esta forma, se corrobora la H₁ planteada en el Capítulo 1, que sostiene que el tiempo a floración en *L. mendocina* está asociado con la adquisición de una determinada tasa de crecimiento umbral por planta.

Los resultados de los experimentos permiten concluir que el tiempo a BFV, que en este sistema experimental fue la primera manifestación visible de la inducción floral, es modulado por factores que controlan el crecimiento como son la radiación, el agua y los nutrientes. A través de los experimentos se logró retardar el momento de aparición del botón floral en 30 ± 2 días (Experimento 1, Cuadro .1; Figura 2.2), 20 ± 2 días (Experimento 3, Cuadro 2.1; Figura 2.5) y 7 ± 2 días (Experimento 2, Cuadro 2.1; Figura 2.4). El impacto negativo de la limitación de radiación, agua y nutrientes sobre la tasa de crecimiento es ampliamente conocido desde hace muchos años (Taiz y Zaigler, 1998; Azcon Bieto y Talón, 2003). Sin embargo, las observaciones que se pueden encontrar en la literatura acerca de su efecto sobre el tiempo a floración para el caso del agua y los nutrientes, al menos, son contradictorios; algunos reportes demuestran que la escasez de nitrógeno o de agua adelanta o no modifican la floración (Yegappan et al, 1980; Dickens and van Staden 1988; Bernier et al. 1993, Castro Marín et al., 2011) y otros que la retrasan (Marschner 1995, Ploschuk, 2005; Gimenez, 2010). En este trabajo, si existiera un efecto del nitrógeno como señal para adelantar el cambio de los meristemas de vegetativos a reproductivos como se menciona mas arriba, estaría enmascarado por el contrabalance producido por la disminución sobre la tasa de crecimiento. Esto explicaría que la escasez de nutrientes produjo un menor retraso en alcanzar BFV con respecto a su control, si se lo compara con el retraso que produjo la menor disponibilidad de radiación (7 vs 29 días, respectivamente) (Cuadro 2.1 y 2.2; Figuras 2.3 y 2.4). Es decir, el efecto indirecto sobre la tasa de crecimiento, que retrasa el tiempo sobre la inducción floral, fue mayor que el efecto directo (señal), que adelantaría el tiempo sobre el la inducción floral.

Estos resultados concuerdan también con lo que ha sido demostrado en otras especies de roseta: *Cirsium vulgare* (Klinkamer et al., 1987); *Carlina vulgaris* (Klinkamer et al., 1991); *Cynoglossun officinales* (Wesselingh et al., 1997) y *Oenothera biennis* (Gimenez, 2010), donde la tasa de crecimiento se ha relacionado con la capacidad de florecer en estas especies.

Los resultados también descartan la presencia de biomasa mínima reportada en otras especies (Klinkamer et al., 1987; 1991; Wesselingh et al., 1997) pero el efecto sobre la tasa de crecimiento, si bien es concluyente sobre el retraso en la inducción floral, no sería suficiente para explicar un comportamiento bianual facultativo que presenta *L. mendocina* en algunas situaciones (Windauer et al., 2004). Sin embargo, la posibilidad de que la limitación de recursos actúe indirectamente retrasando el cambio de tasa (como condición necesaria para desencadenar la floración) y este efecto lleve a las plantas a explorar ambientes con temperaturas supraóptimas que inhiben la floración en esta especie (Windauer et al., 2004; 2006) ofrecería una explicación funcional a la determinación de esta bienalidad. Efectos similares se han encontrado en otras especies oleaginosas alternativas con comportamiento bianual facultativo (Gimenez, 2010).

Si bien la asociación entre la adquisición de una tasa de crecimiento umbral (TCu) y el momento de inducción floral es contundente, los resultados no permiten establecer una relación causal entre el cambio en la tasa de crecimiento y el desencadenamiento de la floración. En efecto, este cambio en la tasa de crecimiento podría ser una consecuencia del alargamiento de pedúnculos que generalmente se disparan en las especies de roseta (Werner, 1975). En el capítulo siguiente se pondrá a prueba la H₂ de esta tesis, que sostiene que la inducción a floración disparada a partir de la adquisición de una TC umbral está mediada por una síntesis de giberelinas. La utilización experimental de esta noción permitirá establecer si realmente la tasa de crecimiento es el factor causal (Objetivo 1b)

CAPÍTULO 3

EL CAMBIO DE LA TASA DE CRECIMIENTO COMO FACTOR DISPARADOR DE LA INDUCCIÓN FLORAL EN *Lesquerella mendocina*. REGULA LA EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA UNA GA2 OXIDAZA Y LA FLOWERING LOCUS T (FT).

3.1 Introducción

Como ya se ha enunciado en capítulos anteriores, el tiempo a floración de la mayoría de las plantas se establece en respuesta a los factores ambientales exógenos, tales como temperatura, fotoperíodo y vernalización. A su vez, la transición a la floración está mediada por una serie de señales endógenas, tales como la modificación en los niveles de fitohormonas y azúcares (Mouradov et al., 2002; Boss et al., 2004). Esto implica que, recién cuando las plantas alcanzan un determinado estado de desarrollo que permite la transición al estado reproductivo, las señales del ambiente pueden ser percibidas por distintos órganos de la planta. Como consecuencia, se generan nuevas señales endógenas hacia el meristema apical, determinando que el ápice permanezca vegetativo o se transforme en reproductivo (Bernier et al., 1993; Battey, 2000; Tan y Swain, 2006). Por otra parte, se ha demostrado recientemente en varias especies, incluso con requerimientos ambientales contrastantes en lo que al control de la floración se refiere, que la proteína codificada por el gen *FT* tendría un rol central en el proceso de inducción de la floración, siendo muy posiblemente un componente central del florígeno (Cobersier et al., 2007; Notaguchi et al., 2008; Hismatsu and King, 2008).

Por otra parte, del conocimiento actual se concluye que el proceso de floración es redundante, porque la inducción floral puede alcanzarse a través de diferentes vías (Tan and Swain, 2006; Erwin, 2007). En este sentido, hay evidencias de que existe una serie de vías (que pueden o no presentar tramos con cierto grado de superposición) que confluyen al final de la cadena, determinando de esa manera la integración de las señales ambientales y endógenas (fotoperíodo, vernalización, giberelinas y vía autónoma) y “decidiendo” disparar o no la iniciación floral (Fig. 3.1) (Battey, 2000; Mouradov et al., 2002; Simpson y Dean, 2002; Boss et al., 2004; Corbersier y Coupland, 2005; Tan y Swain, 2006; Mutasa- Göttgens and Hedden, 2009; Turnbull, 2011).

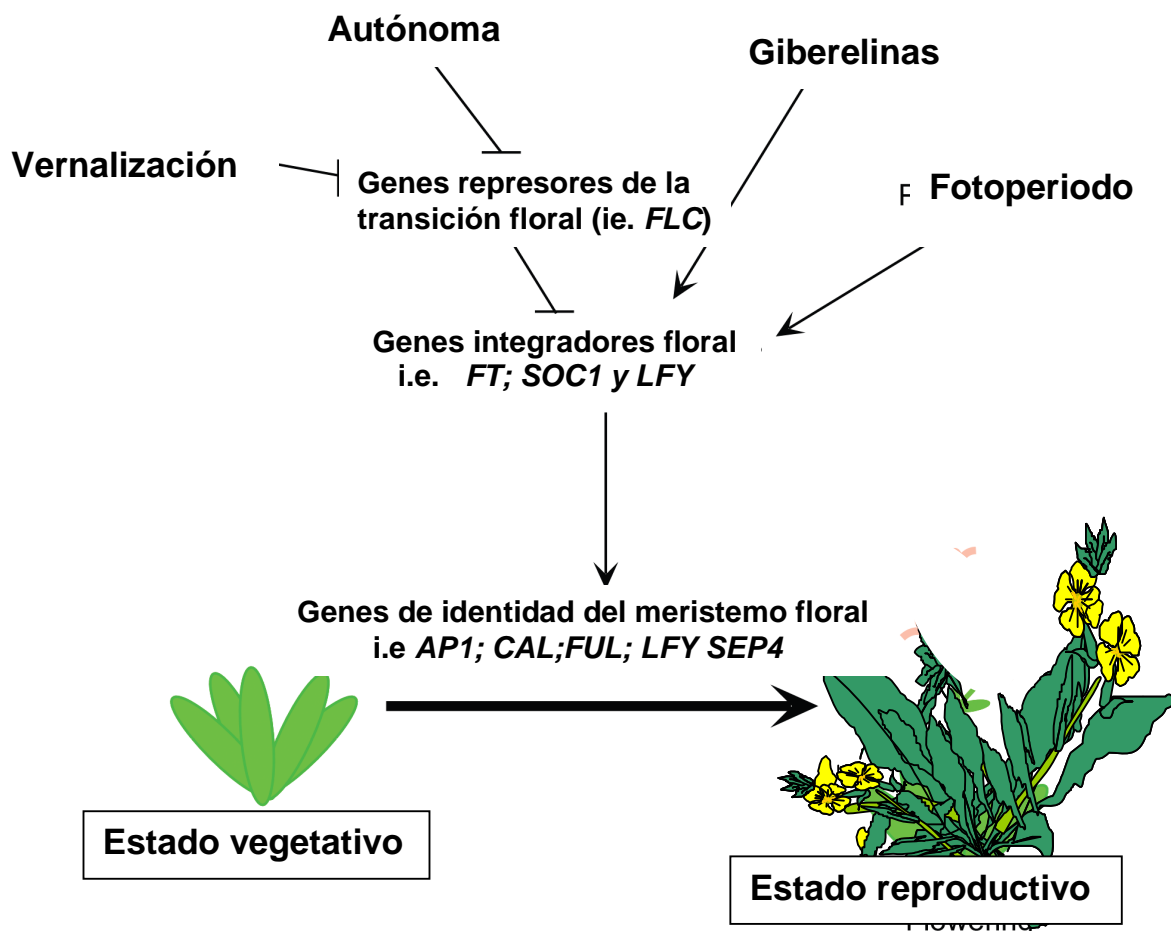


Figura 3.1: Múltiples señales o vías que regulan la transición al estado reproductivo de las plantas y determinan el tiempo a floración. Las diferentes vías promueven (\rightarrow) ó reprimen (\leftarrow) a los genes integradores de señales para la floración. Adaptado de Tan y Swain, 2006

Entre los factores que regulan el desarrollo, hay señales que tienen efectos promotores o inhibitorios de la inducción floral (Reeves y Coupland, 2000). El efecto de los factores exógenos y endógenos varía entre especies y hay fuertes interacciones entre ellos (Slafer y Rawson, 1994, Heide 1994; Erwin, 2007, Wilkie, 2008). En el caso

particular de la vía autónoma, como el desencadenamiento de la floración no está regulado por factores exógenos tradicionales (como temperatura, fotoperíodo y vernalización), se presume que otros factores que inciden sobre el crecimiento podrían estar ocupando este rol (Bernier, 1993). En este sentido, hay trabajos que informan que el crecimiento acelera la transición a la fase adulta, mientras que las condiciones que lo retardan prolongan la duración del estado juvenil en las plantas. (Melian, 1977; Poethig, 1990). También existen trabajos que informan que el incremento de la radiación incidente puede reducir la duración de la fase juvenil en varias especies (Adams, 1999, Erwin, 2007, King et al, 2008). Además, se ha observado en especies leñosas que la reducción de los niveles endógenos de carbohidratos alargan la duración de la fase juvenil (Melian, 1977).

En relación con lo anterior, en el Capítulo 2 se demostró que en *L. mendocina* el tiempo a floración está fuertemente asociado con el momento en que la planta adquiere una tasa de crecimiento umbral. Este momento a su vez se acelera cuanto menos limitantes son las condiciones para el crecimiento. Sin embargo, estos resultados no resultan suficientes para asegurar que la tasa de crecimiento es realmente el factor causal que desencadena la floración. Para abordar la pregunta de si “¿es realmente el cambio en la tasa de crecimiento el disparador de la inducción a floración y no meramente una consecuencia de que la inducción se haya disparado?”, resulta necesario manipular la acción de algún factor endógeno intermediario en este proceso, de modo de lograr desacoplar la dinámica del crecimiento con la expresión de la floración. En este capítulo, se abordará esta pregunta utilizando experimentalmente la noción de que las giberelinas median el proceso de inducción.

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas que actúan como reguladores endógenos del crecimiento y además están involucradas en la regulación del ciclo de vida de las plantas, jugando un rol importante en muchos procesos durante el desarrollo de la planta. Estos incluyen a la germinación de semillas, la elongación del tallo, la iniciación floral y el desarrollo y el crecimiento de frutos en muchas especies (Finkelstein and Zeevaart, 1994, Blázquez et al., 1998; Heeden and Phillips, 2000, Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009).

Desde el punto de vista químico, la biosíntesis de GAs ha sido muy estudiada: es una familia de diterpenos tetra cíclicos ácidos cuyo esqueleto básico está constituido por un anillo de *Ent-giberelano* que puede ser de 20 o de 19 átomos de carbono (giberelinas C₂₀ o C₁₉, respectivamente; Fig 3. 2). Las GAs C₂₀ se metabolizan mediante oxidación continua del C-20 que inicialmente existe como grupo metilo (CH₃) y se transforma sucesivamente en hidroximetilo, aldehído y finalmente carboxilo. Es conocido que las GAs C₂₀ que portan un grupo aldehído en el C-20 pierden ese carbono al convertirse en GAs C₁₉ y que la inserción de grupos hidroxilos en las posiciones C-3 y C-2 determina la actividad biológica de las GAs (Azcón-Bieto y Talon, 2000). Algunos estudios demostraron que las GAs C₁₉ que tienen el grupo hidroxilo en la posición 3 β como las GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ tienen la actividad biológica más elevada. Las giberelinas activas pueden ser desactivadas en forma irreversible y el mecanismo más común de desactivación es la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición 2 β . Las GAs 2 β -hidroxiladas son, por lo tanto, productos finales de la ruta sintética sin actividad biológica.

Estudios fisiológicos han revelado que las GAs consistentemente promueven la elongación del tallo. Sin embargo, no hay evidencias contundentes que sostengan su efecto promotor sobre la floración. Mientras algunos trabajos revelan que las GAs efectivamente pueden promoverla, otros muestran un efecto inhibitorio contrapuesto

(Metzger, 1995; Cobersier et al, 2004). Se conoce que en plantas que requieren frío y/o días largos, la floración esta mediada por GAs (Hedden and Phillips, 2000). No obstante, la floración de estas plantas en condiciones no inductivas puede ser disparada por la aplicación de giberelinas exógenas (Wilson et al., 1992). Por otra parte, hay evidencias que muestran que la aplicación de giberelinas promueve la floración en plantas de roseta, igual que la especie en estudio *L. mendocina*, que crecen en condiciones desfavorables para la inducción floral (Wilson et al., 1992; Bernier et al., 1993; Blázquez et al., 1998; Gocal et al., 2001; Eriksson et al., 2006; Zeevaart, 2006). De hecho, en algunas especies de roseta con respuesta de día largo se encontraron efectos positivos de las GAs tanto sobre el alargamiento como sobre la floración. Tal es el caso de *Arabidopsis thaliana*, *Lolium temulentum* y también en algunas plantas caulescentes con variada respuesta al fotoperíodo como *Impatiens balsamina* (especie de día corto) y la ambifotoperiódica *Bryophyllum daigremontianum* (Zeevaart, 1982; Pharis and King, 1985; King and Evans, 2003; Corbesier et al, 2004).

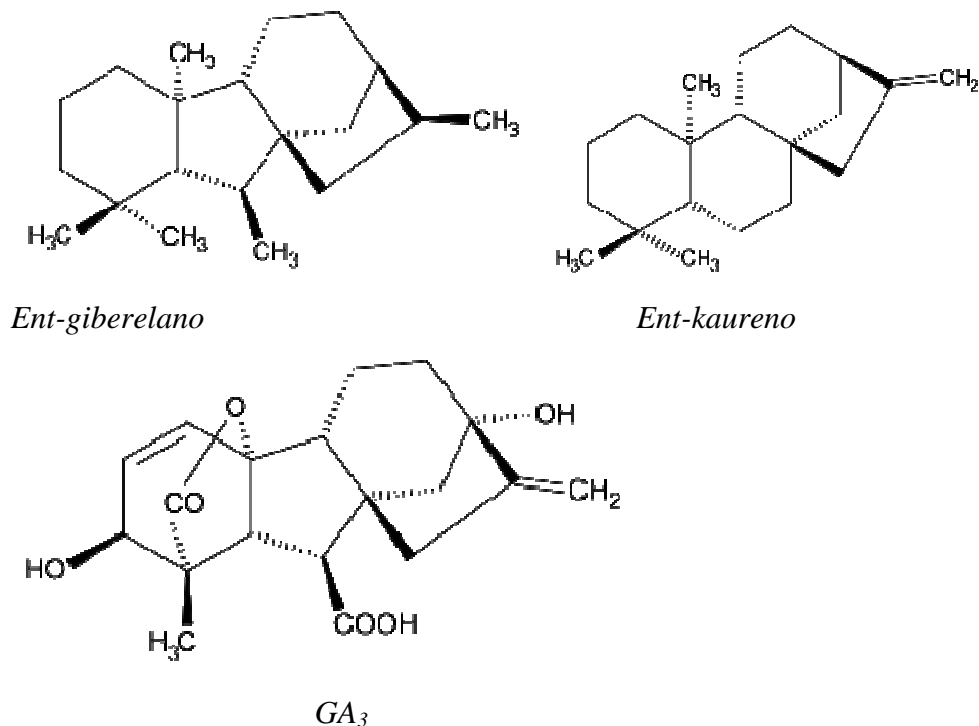


Figura 3.2: Estructura básica del *ent-giberelano*, *ent-kaureno* y de la Giberelina 3 (*GA₃*)

Por el contrario, en otras especies de roseta con respuesta de día largo, tales como *Silene armenia*, *Spinacia oleracea* (espinaca) y *Sinapis alba* (Metzger, 1995; Cobersier et al, 2004) se encontraron efectos positivos de las GAs sobre el alargamiento pero no sobre la floración. En la mayoría de las especies leñosas, por otro lado, las GAs se comportan como inhibidoras de la floración (Boss and Thomas, 2002; Wilkie et al,

2008; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009) mientras que solamente en gimnospermas parecen desempeñar un papel inductor (Wilkie et al, 2008). De lo anteriormente expuesto se deduce que resulta relevante abordar el estudio acerca del rol de las giberelinas en especies de roseta con respuesta de vía autónoma para la floración, como es el caso de *L. mendocina*.

Por otra parte, a los estudios fisiológicos se le sumaron en los últimos años estudios genético-moleculares (fundamentalmente en *A. thaliana*) que permitieron descubrir numerosos genes que controlan el tiempo a floración (revisiones en Boss et al, 2004; Searle and Coupland, 2004; Bernier and Périlleux, 2005; Corbesier and Coupland, 2005; Hisamatsu and King, 2008; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009). Se deduce que si el control de la floración fuera multifactorial, los genes involucrados en el control del tiempo a floración deberían ser múltiples. Es así que se han identificado diversos genes que actúan promoviendo o inhibiendo la floración en estas especies que interactúan con factores ambientales o en forma autónoma (Levy and Dean, 2002; Simpson and Dean, 2002; Casal et.al, 2003; Tan y Swain, 2006; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009).

Así, la transición del estado vegetativo a reproductivo en *A. thaliana* involucra una acción secuencial de tres grupos de genes que han sido identificados (Amasino, 1996; Simpson and Dean, 2002; Levy and Dean, 2002). Estos grupos son:

- Genes que perciben y traducen las señales
- Genes integradores de señales (*FT*, *SOC1* y *AGL 20*) tanto del ambiente como de señales endógenas.
- Genes específicos del desarrollo floral; dentro de estos se puede hacer una nueva agrupación en:
 - i) genes de identidad del meristema (*LFY*, *API*, *Cal*, *AP2* y *UFO*) son reguladores positivos de los genes de identidad de órganos florales. Provocan que el meristema cambie de vegetativo a reproductivo.
 - ii) genes catastrales, que son los reguladores espaciales de los genes de identidad de órganos florales. Son los genes que le indican a los genes de identidad donde se tienen que expresar.
 - iii) genes de identidad de órganos florales (*AP1*, *AP2*, *AP3*, *Pi*, *AG*), que son los factores de transcripción que controlan las funciones y características de los órganos que forman la flor.

Para la identificación de estos genes que controlan el tiempo a floración, son utilizados mutantes que revelan cómo la floración se puede acelerar o retardar bajo diferentes condiciones ambientales. Estos mutantes pueden ser agrupados de acuerdo a su respuesta a variaciones de las condiciones ambientales e integradas dentro de las vías genéticas que explican el control del tiempo a floración (Figura 3.1). Las cuatro principales vías que regulan el tiempo a floración como se muestra en la Figura 3.1 son vernalización, fotoperiodo, giberelinas y la vía autónoma. Estas interactúan en forma compleja y convergen en regular los genes integradores de señales ambientales y endógenas (i.e. *FT*, *SOC1*) que actúan “aguas arriba” de los genes que regulan la morfogénesis como i.e *API*, *LFY* (Moon et al., 2003; Pineiro et al., 2003; Takada and Goto, 2003, Cobersier and Coupland, 2005, 2006).

En relación con lo anterior, estudios recientes en *Arabidopsis* indican que las GAs pueden actuar vía el *FT* como también en forma independiente en la inducción floral (Moon et al 2003; Hisamatsu and King, 2008). En *Lolium temulentum* ha sido mostrado que GAs y *FT* actúan en forma independiente (King et al, 2006), lo mismo que en Tomate; el tiempo a floración es regulado en esencia por la vía autónoma y controlada

por el movimiento sistémico de proteínas FT (Lischitz et al., 2006; Shalit et al., 2009). También hay estudios que muestran un incremento en la biosíntesis de GAs cuando las plantas que tienen una respuesta al fotoperíodo de días largo son transferidas de días cortos a días largos, por la regulación de la expresión del gen que codifica para *GA20 oxidasa* (una enzima que convierte GAs de C-20 en compuestos de C-19, condición necesaria para la síntesis GAs con actividad biológica) que transduce la señal ambiental (Wu et al, 1996, Xu et al, 1997; Hisamatsu et al., 2005; King et al, 2006; Lee and Zeevaart, 2007).

Las GAs como una señal móvil para la inducción floral han sido investigadas por Eriksson et al. (2006), quienes mostraron que en plantas de *Arabidopsis* creciendo en condiciones no inductivas (días cortos) la GA_4 se acumula en el ápice previo a la transición floral. Esta acumulación no estuvo correlacionada con cambios en la expresión de genes de la biosíntesis de GAs en el ápice, indicando que las GAs fueron originadas en otros órganos y se movilizaron hasta el meristema. Algunos trabajos muestran que la expresión de genes que codifican para enzimas comprometidas con la inactivación de giberelinas activas (i.e. GA 2-oxidasa) que inhiben la acumulación de las mismas en el ápice, disminuye con la inducción floral permitiendo entonces la acumulación de GA_5 activas (Sakamoto et. al., 2001; Jasinski et al., 2005; King et al., 2008). El modelo genético de *Arabidopsis* resulta interesante para estudiar la inducción floral porque han sido caracterizado numerosos mutantes. Teniendo en cuenta que la especie *L. mendocina* pertenece a la misma familia que la del género *Arabidopsis* (Brassicaceae), se presume que podrían existir diversas analogías genéticas y que muchos de los genes involucrados en esta última especie podrían estar presentes en la primera.

En esta tesis se hipotetizó que el incremento en la tasa de crecimiento determina el envío de una señal (i.e. carbohidratos, ver Capítulo 4) que actúa activando o desactivando la expresión de genes que permiten esa transición. Algunos de ellos están relacionados con el metabolismo de la GAs (GA2-oxidasa, que inactiva las GAs con actividad biológica, i.e. la inducción floral suprimiría la expresión de este gen) y otros como el (*FT*) que codifican una proteína que tendría un rol central en la proceso de inducción, siendo posiblemente un componente central del florígeno (Zeevaart, 2006).

Sobre la base de lo anterior, en este capítulo se propone abordar el objetivo 1b presentado en el Capítulo 1, que es si el aumento de tasa de crecimiento es el factor causal que dispara la inducción determinar floral, o si es meramente una consecuencia de que la inducción floral se haya disparado. Para ello, es necesario a su vez abordar:

- i) El objetivo específico 2: Determinar si la síntesis de novo de giberelinas forma parte de la secuencia de eventos que desencadena la inducción a floración en *L. mendocina*. La hipótesis 2 (H_2) que subyace a este objetivo, sostiene que la inducción a floración disparada a partir de la adquisición de una TC umbral está mediada por una síntesis de giberelinas.
- ii) El objetivo específico 3: Identificar en *L. mendocina* la instancia genética reguladora de la síntesis de giberelinas y otros como el Flowering locus T (FT) que codifican una proteína que tendría un rol central en la proceso de inducción. La hipótesis 3 (H_3) sostiene que la expresión de la inducción floral en *L. mendocina* está regulada a nivel de la expresión de genes que codifican para la enzima GA 2-oxidasa (que inactivan a las GAs con actividad biológica) y/o la proteína FT.

3.2 Materiales y métodos

Las condiciones generales de todos los experimentos fueron las mismas que las explicadas para los experimentos presentados en el Capítulo 2.

3.2.1 Experimento 1

3.2.1.1 Generales

Para cumplir con el objetivo específico 2 y a su vez explorar el efecto causal del cambio de tasa de crecimiento sobre el desencadenamiento de la floración (objetivo 1b), se diseñó un experimento en 2006 en macetas rectangulares. Previo a la siembra, se pusieron a germinar a 20°C semillas de *L. mendocina* en cajas de Petri con papel de filtro, agregándoles 5 ml de agua por caja. Las semillas pregerminadas fueron sembradas el 17 de julio en macetas de 0.35x 0.12x 0.20 m que contenían una mezcla de tierra y arena (1:1). Las plantas emergieron a los 10 días después de la siembra en las macetas. Los tratamientos se dispusieron con un diseño completamente aleatorizado (DCA), con tres repeticiones por tratamiento. Cada repetición constaba de 16 macetas, con 4 plantas por macetas (Fig. 3.3).



Figura 3.3: Vista parcial del armado del Experimento 1. Cada repetición constó de 16 macetas rectangulares. En la foto se puede observar la disposición de las macetas y la estructura que sostenía las mallas que interceptaban la radiación.

3.2.1.2 *Tratamientos*

Se realizaron tratamientos con 2 niveles de radiación con 3 repeticiones por tratamiento:

C: Control con plena radiación o 100% de radiación incidente (macetas blancas y negras).

S: Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación impuestas con mallas que interceptaban el 80% de la radiación incidente (i.e. solo el 20% de la radiación incidente alcanzada a las plantas, macetas verdes y rojas) y no modificaban la calidad de luz (i.e. la relación rojo/rojo lejano) (Fig. 3.4).

Las restricciones de luz comenzaron a partir de los 15 días de emergencia de las plantas, con individuos de 3-4 hojas (V3-V4). El registro de la intercepción de la radiación fue realizado con un sensor puntual de radiación PAR Li-190 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska), conectado con un registrador de datos Li-1000 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska) durante un día totalmente despejado. La temperatura del aire fue registrada con un sensor conectado a un registrador (LI- 1000, Lincoln, Nebraska) ubicado dentro de los tratamientos para testear el efecto del sombreado sobre la temperatura, encontrándose que las mallas no modificaban la temperatura del aire significativamente. Dentro de cada nivel de radiación se realizaron tratamientos con reguladores de crecimiento de efectos contrastantes para modificar el nivel de giberelinas endógeno de las plantas:



Figura 3.4: Vista parcial de los tratamientos con restricciones de radiación impuestas por las mallas que interceptaban el 80 % de la radiación.

Los tratamientos con plena radiación:

C: Control sin reguladores de crecimiento (macetas negras).

CP: Con paclobutrazol, inhibidor de la síntesis de giberelinas (macetas blancas). La idea que subyace es que, aunque aumentara la tasa de crecimiento, la floración se vería inhibida y/o demorada debido a la ausencia de giberelinas.

Los tratamientos sombreados:

S: Sombreado sin reguladores de crecimiento (macetas verdes).

SG: Con giberelinas (macetas rojas).

La idea que subyace es que, aunque la tasa de crecimiento permanezca muy baja por la fuerte restricción de radiación, el suministro exógeno de giberelinas desencadenaría igualmente la floración.

Las plantas del tratamiento SG fueron tratadas con GAs exógenas (GA₄, GA₇, ProVide, Laboratorios Abbott, Chicago, USA) mientras que las plantas en plena radiación (CP) fueron tratadas con paclobutrazol (Crestar, ICI, Buenos Aires, Argentina), un inhibidor de la biosíntesis de GAs. Los tratamientos químicos fueron asperjados directamente sobre la parte aérea de las plantas como una solución acuosa 100 µM de GAs y 4ppm de una solución acuosa de Paclobutrazol. Estos tratamientos fueron impuestos tres semanas después de la emergencia, cuando las plantas constaban con 3-4 hojas (V3-V4) desde el 23 de agosto hasta el 10 de octubre, mientras que los tratamientos C y S fueron asperjados durante el mismo lapso de tiempo con agua destilada.

De esta forma se logró un experimento con un DCA con 3 repeticiones por cada combinación de tratamientos (Fig. 3.5).

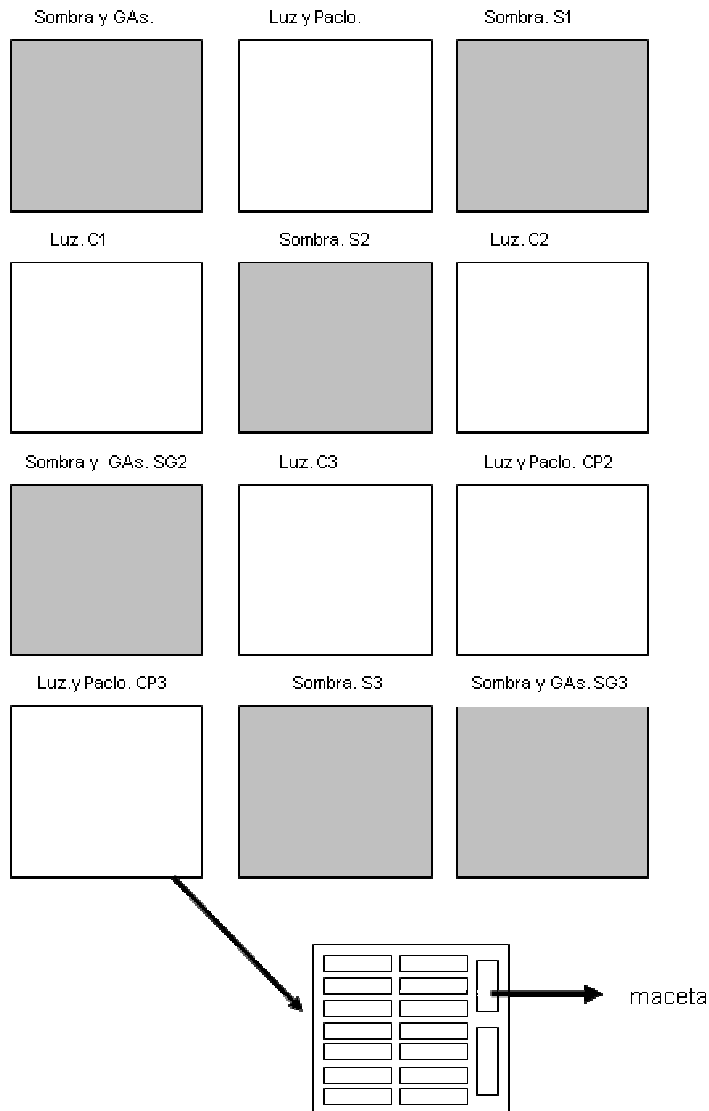


Figura 3.5: Diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por combinación de tratamientos.

3.2.2. Experimento 2

3.2.2.1 General

Para cumplir con el objetivo específico 3, se llevó a cabo un experimento en condiciones de campo durante el año 2009. El suelo era un Argiudol típico, con alto contenido de fósforo y bajo de nitrógeno, cuyo pH era de 6.5. Los tratamientos en el campo se dispusieron con un diseño completamente aleatorizado (DCA) con tres repeticiones. Las parcelas correspondientes estuvieron constituidas por 6 surcos de 5 m de largo, distanciados a 0,20 m.

La siembra con semilla pregerminada de *L. mendocina* fue realizada el 23 de julio y efectuada en forma manual, a chorrillo (ver Capítulo 2, experimento 1 para más detalles). Para obtener la densidad buscada de 50 pl/m² se raleó en el momento en que las plantas presentaban dos hojas (V2), aproximadamente a los 10 días de emergidas. Las malezas fueron controladas manualmente.

3.2.2.2 Tratamientos

Se realizaron tratamientos con 2 niveles de radiación: plena radiación (**C**) y con restricciones impuestas con telas mediasombra con un porcentaje de transmitancia PAR igual a 37% de la radiación incidente (**S**). El tratamiento de restricción de la radiación se impuso dos semanas después de la emergencia en todas las parcelas y se mantuvo hasta la detección del botón floral. El objetivo del tratamiento sombreado fue el de demorar el momento en el que se produce el aumento de la tasa de crecimiento, tal como fue demostrado en el Capítulo 2 (Fig.2.3.).

3.2.2.3 Análisis de expresión de genes

3.2.2.3.1 Generales

El análisis de expresión de genes se llevó a cabo a partir de ápices de plantas ya inducidas y no inducidas a la floración por los diferentes tratamientos (**C** y **S**), para permitir y no permitir respectivamente la inducción floral. Las plantas fueron cosechadas en dos momentos idénticos en el tiempo para ambos tratamientos de radiación (20 y 50 días después de la emergencia (DDE, por la tarde aproximadamente a las 15 h), que coincidieron con distintos momentos fenológicos (ver Fig. 3.8). Para el tratamiento de plena radiación (**C**): 1) Etapa temprana, plantas con 4 hojas aparecidas (V4) anterior al cambio de tasa de crecimiento en el tratamiento, y 2) Etapa tardía, plantas con 10-12 hojas aparecidas (V10-12) e inicio de crecimientos de ramificaciones axilares, posterior al cambio de tasa de crecimiento. Para el tratamiento de sombra (**S**): 1) Etapa temprana, plantas con 2 hojas aparecidas (V2) y 2) Etapa tardía plantas con 7 hojas aparecidas (V7), en este caso anterior al cambio en la tasa de crecimiento en ambos momentos de muestreo.

Los genes candidatos utilizados para el análisis de expresión fueron i) *Lm-GA2-oxidasa*, que codifica para una proteína que inactiva giberelinas biológicamente activas (esta debería bajar como resultado del cambio de tasa de crecimiento si es que este es el factor causal de la inducción floral) (Blazquez *et al.*, 1998, Sakamoto *et al.*, 2001, Rieu *et al.*, 2008) y ii) el *Flowering locus T (Lm-FT)*, que posiblemente codifique para una

proteína que tenga un rol central en el proceso de iniciación floral y se sugiere que es un componente central de florigeno (esta debería aumentar como resultado de la inducción floral) (Cobersier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007). Para explorar una posible regulación a nivel transcripcional, se analizó mediante RT-QPCR la expresión de estos dos genes. Se utilizaron secuencias existentes de otras familias cercanas a *Lesquerella* (*At*, *B. Napus*) con el objetivo de diseñar los primers en las secuencias mas conservadas del genoma.

Aislación de ARN y producción de cDNA

Se realizaron muestreos para la extracción de ARN en los dos momentos arriba mencionados (20 y 50 DDE). La muestra consistió en 40-50 ápices y dos repeticiones biológicas fueron hechas en los dos momentos y tres repeticiones técnicas. Los ápices fueron aislados del resto de la planta e inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido. Una vez congelados, fueron molidos en un mortero transformándolo en polvo. El ARN total fue extraído con un KIT Macherey – Nagel Nucleo Spin (siguiendo las instrucciones del fabricante). PVP-40 (sigma) fue agregado al RA1 buffer a una concentración final de el 1% (wv). Después de 5 minutos de centrifugación, el sobrenadante fue utilizado en el protocolo de la extracción según lo descrito en el manual del kit. La calidad del ARN fue determinada en gel de agarosa al 1% con tinción con EtBr. El ARN fue convertido en cDNA para cada muestra: 5 µl del ARN, 0.625 µl de dNTP (Invitrogen), 0.625 µl de oligoDT (biodinámica) fue agregado y después transferido a un baño térmico a 65°C e incubado por 5 minutos. La reacción fue continuada con el agregado de 2.5 µl de M-MLV 5X (Promega), 1.25 de DTT (Invitrogen) y M-MLV Transcriptase reverse (Promega). Finalmente, las muestras fueron incubadas por 1 h a 37°C. Después de la incubación, 50 µl de la ARNasa del agua libre fue agregada.

3.2.2 3.2 Análisis de la expresión de genes

Las búsqueda de secuencias de *L. mendocina* con alta identidad a los genes de referencia fue realizada en las bases de datos Plant GDB (Plant genome database <http://www.plantgdb.org>), NCBI (National Center of Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y <http://www.arabidopsis.org>.

Las secuencias de los primers utilizados para las PCRs en tiempo real fueron las siguientes:

	Fw	Rev
PP2A (AT1G5983 0)	5'AAACTGGCCATGGATATCGCC-3'	5'- ACAGCTAATGGAGTGTAAGCCG-3'
GA2oxidase (T4G21200)	5'-AAATTTTCCGCCGGGAGTTACC- 3'	5'- AGCTTCTGACCAAGAAAGCTGC-3'
FT (AT1G6548 0)	5'- GCTACAACCTGGAACAACCTTTGGCA AT-3'	5'- TATAGGCATCATCACCGTTCGTTAC TC-3'

Las PCRs en tiempo real fueron realizadas en un equipo Applied Biosystems, modelo 7500, en volúmenes de reacción de 10 μ l, con 5 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.08 μ l de cada set de primers (25 nmol), 3.84 μ l de agua milliQ y 1 μ l de cDNA como templado. La expresión de genes se expresó en forma relativa a Fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A). Los diferentes set de primers fueron diseñados con el programa Primer Express 2.0. Se construyeron curvas standards para la cuantificación absoluta de cada uno de los set de primers. Las condiciones utilizadas para las corridas de PCR en tiempo real fueron: 10 minutos a 95°C, 1 min. a 60°C 40 ciclos seguidos para la construcción de la curva de melting.

3.2.3 Mediciones y análisis estadístico

Para ambos experimentos se realizaron observaciones fenológicas diarias para detectar estado reproductivo visible (BFV) y se cosecharon semanalmente 2-3 plantas por tratamiento, se secaron en estufa a 65°C por 72 h hasta peso contante. Posteriormente las plantas enteras fueron pesadas. Para estimar las tasas de crecimiento, se utilizó el mismo modelo condicional de regresión lineal utilizado en los Capítulos 2 y 3, que asociaba la marcha del peso seco con el tiempo:

$$\text{Peso seco} = a + b * \text{DDE si } (\text{DDE} \leq c) + d (\text{DDE} - c) \text{ si } (\text{DDE} \geq c); \quad (\text{Eq. 1})$$

donde DDE son los días después de la emergencia; a es la ordenada al origen, b y d son diferentes pendientes de la regresión lineal equivalentes a tasas de crecimiento y c es el punto de quiebre de la función que indica los días a cambio de tasa de crecimiento. Todos los parámetros se compararon usando un ANOVA. Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) se compararon las medias mediante un test de Tukey.

3.3 Resultados

3.3.1 Experimento 1

3.3.1.1 Fenología de plantas

Los resultados de este experimento mostraron que, en ausencia de tratamientos hormonales, las plantas del tratamiento C alcanzaron el estado de botón floral visible (BFV) a los 65 días de emergidas, pero cuando les fue aplicado paclobutrazol (CP), retrasaron sensiblemente el momento de floración, ya que requirieron 28 días más en alcanzar el estado reproductivo (Cuadro 3.1). Por otra parte, las plantas que fueron sometidas a los tratamientos de sombreado extremo del 80% de la radiación modificaron sensiblemente su fenología, en especial en ausencia de tratamientos hormonales (S), ya que estas plantas permanecieron en estado vegetativo hasta que finalizó el tratamiento de sombreado. Sin embargo, cuando a las plantas sombreadas les fue aplicada las giberelinas (tratamiento SG) éstas lograron alcanzar el estado reproductivo, aunque 20 días más tarde que las del tratamiento C.

Por otra parte, no todas las plantas de los diferentes tratamientos aplicados cuya población alcanzó el estado reproductivo pasaron a dicho estado. Sólo en el tratamiento C se produjo la floración en el 100% de las plantas, mientras que el porcentaje fue 30%

menor en las plantas tratadas con los reguladores de crecimiento (CP y SG) y nulo en el tratamiento S.

Cuadro 3.1. Número de días desde emergencia (E) a botón floral visible (BFV) y porcentaje de plantas reproductivas para cada uno de los tratamientos. C: control plena radiación; CP: radiación + paclobutrazol; S: control sombra, SG: Sombra + giberelinas.

Tratamientos	Días a BFV**	Plantas reproductivas (%)
C	65 ± 2 a	100
CP	93 ± 4 c	72
S	*	0
SG	85 ± 4 b	73

* No alcanzaron el estado reproductivo

** Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05)

3.3.1.2 Tasas de crecimiento

Al analizar los parámetros del modelo de regresión lineal para estimar la asociación entre el peso seco y el tiempo, se observó que la tasa de crecimiento inicial (parámetro **b**) fue muy baja y similar en todos los tratamientos (Cuadro 3.2, Fig. 3.6). Por otra parte, las tasas de crecimiento finales (parámetro **d**) de ambos tratamientos bajo radiación plena (C y CP) fueron superiores al valor de 0.01 g pl⁻¹, postulado como umbral de floración en el Capítulo 2 de esta tesis, aunque en CP fue significativamente menor que en C. Por el contrario, el parámetro “d” de los tratamientos sombreados S y SG se mantuvo bajo, con órdenes de magnitud similares a los observados al de todos los parámetros b, no alcanzando el valor umbral

Respecto al momento en que se produjo el cambio de tasa de crecimiento (parámetro c), las plantas de los tratamientos de radiación plena C y CP tuvieron valores similares aunque, como se mencionó anteriormente, el estado de BFV fue sensiblemente retrasado en el segundo tratamiento. Así, se logró desacoplar el intervalo de tiempo entre el cambio de tasa y botón floral visible (ver Fig. 2.5 y Cuadro 2.4 del capítulo anterior (48 días vs 12 días, respectivamente). El desacople se reiteró en los tratamientos bajo sombra, ya que el atraso de 13 días en el parámetro c observado en el tratamiento S, respecto al C no tuvo ningún tipo de asociación cuantitativa con la ausencia total de floración observada en ese tratamiento (Cuadro 3.2, Fig. 3.6). Aunque con el tratamiento SG el parámetro c se adelantó 9 días con respecto al tratamiento S, estas plantas tampoco superaron la tasa de crecimiento de 0.01 g pl⁻¹ que podría ser considerada como un umbral de floración.

Cuadro 3.2: Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) en la Figura 3.4. C: control plena radiación; CP: radiación + paclobutrazol S: control sombra,

Tratamientos	Parámetros			
	a	b	c	D
C	-0.0373 NS (0.0297)*	0.0019 NS (0.00078)	55 c (1.69)	0.029 a (0.00525)
CP	-0.0242 NS (0.03622)	0.00146 NS (0.00095)	54 c (2.77)	0.015 b (0.00234)
S	-0.0105 NS (0.0254)	0.0008 NS (0.00046)	68 a (3.57)	0.007 c (0.00206)
SG	-0.00185 NS (0.0291)	0.0006 NS (0.00049)	59 b (4.00)	0.002 c (0.00096)

* Números entre paréntesis muestran el error standard estimados para cada parámetro.

** Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). NS = no significativo.

Por otra parte, las plantas que permanecieron en la sombra (S y SG) y a las que se le aplicaron los diferentes tratamientos hormonales, manifestaron cambios morfológicos visualmente perceptibles (Fig. 3.7). Las plantas de los tratamientos de sombra a las cuales se le aplicó GAs presentaron entrenudos de mayor longitud que los entrenudos de plantas sometidas a plena radiación. Los entrenudos de la plantas CP fueron de longitud extremadamente menor que las de las plantas de los otros tratamientos, formando una roseta muy compacta que tornó muy dificultoso contar el número de hojas y la determinación del estado reproductivo.

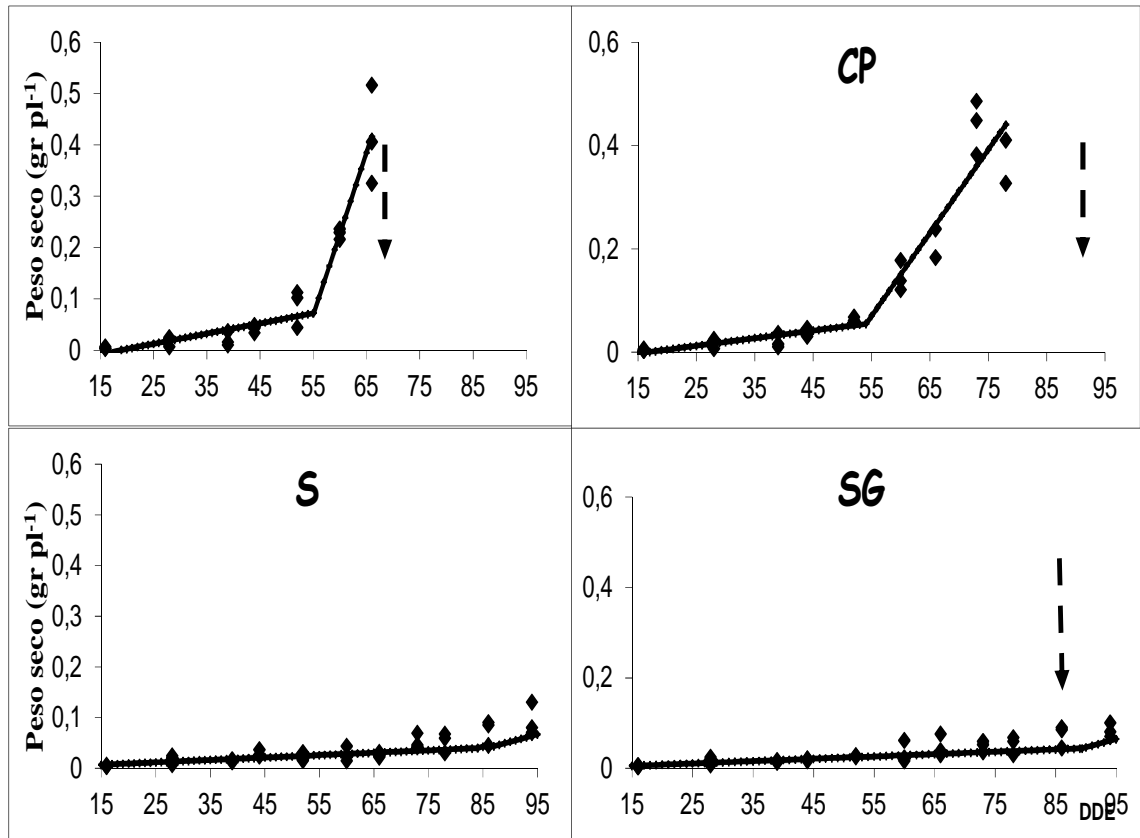


Figura 3.6: Peso seco por planta en función a los días desde la emergencia (DDE) para diferentes tratamientos (C: radiación plena; CP: radiación plena con paclobutrazol; S: sombreado; SG: sombreado con giberelinas). Experimento 1. La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas indican estado reproductivo visible (BFV).



Figura 3.7. Plantas representativas de los diferentes tratamientos del Experimento 1: **C** plena radiación o 100% de radiación incidente (macetas negra); **CP:** plena radiación con el asperjado de Paclobutrazol (macetas blancas); **S** con restricciones de radiación Macetas verdes); **SG** con restricciones de radiación con el asperjado de giberelinas (GA_4 y GA_7 , macetas rojas). La foto fue tomada a los 85 días después de la emergencia. Las plantas de los tratamientos **C** y **SG** se encuentran en estado reproductivo y las plantas de los **CP** y **S** se encuentran en estado vegetativo.

3.3.2 Experimento 2

3.3.2.1 Tasas de crecimiento

En términos generales, el efecto del tratamiento de sombreado (63% de la radiación interceptada y sensiblemente menor al 80% que producía el sombreado en el Exp. 1) sobre la dinámica de aumento de peso seco de la planta resultó en un patrón similar al observado en los experimentos del Capítulo 2 de esta tesis (con un tratamiento de intercepción de radiación similar, ver Fig. 2.2). Tanto en plantas de C y S, las tasas de crecimiento al momento del primer muestreo, que se realizó a los 20 días de la emergencia, fueron muy bajas (Fig. 3.8). Cuando se realizó el segundo muestreo, 50 días después de la emergencia, la tasa de crecimiento de las plantas control fue significativamente más alta que la tasa de las plantas sombreadas, debido a que en las primeras ya había ocurrido el cambio en la su tasa de crecimiento (parámetro c). Por su parte, las plantas sombreadas siguieron con una tasa de crecimiento muy baja, sin cambio significativo con respecto a la tasa de crecimiento de las plantas que habían sido muestreadas a los 20 días.

Concomitantemente, la expresión de genes *Lm-GA2-ox* y *Lm-FT* fue regulada hacia abajo y hacia arriba respectivamente, cuando se los midió a los 50 días de la emergencia, en comparación con la expresión de estos genes a los 20 días de la emergencia de las plantas de los tratamientos en plena radiación (Fig. 3.9). En contraste, la expresión de estos genes durante el segundo muestreo (50 días DAE) permaneció sin cambios en las plantas que permanecieron en la sombra con respecto a su expresión cuando se los midió en el primer muestreo (20 días DAE).

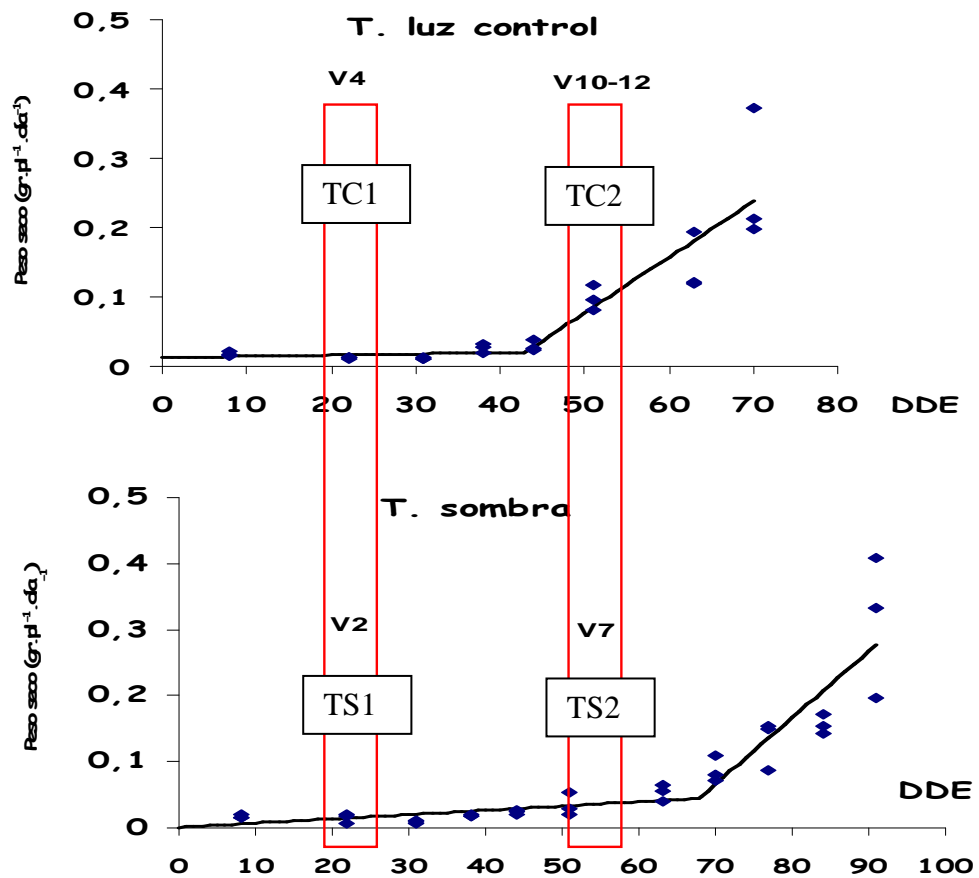


Figura 3.8: Representación esquemática de los momentos de muestreo para la expresión del análisis de genes en los tratamientos de plena radiación (TC1, TC2) y sombra (TS1, TS2) en el Experimento 2. Los muestreos expresados en días después de la emergencia (DDE) están referidos al peso seco de las plantas en esos momentos. Las barras verticales indican el momento de primer muestreo (20 DDE) y del segundo muestreo (50 DDE). Las letras V seguidas de un número indican la cantidad de hojas aparecidas que tenían las plantas en el momento de la toma de muestras.

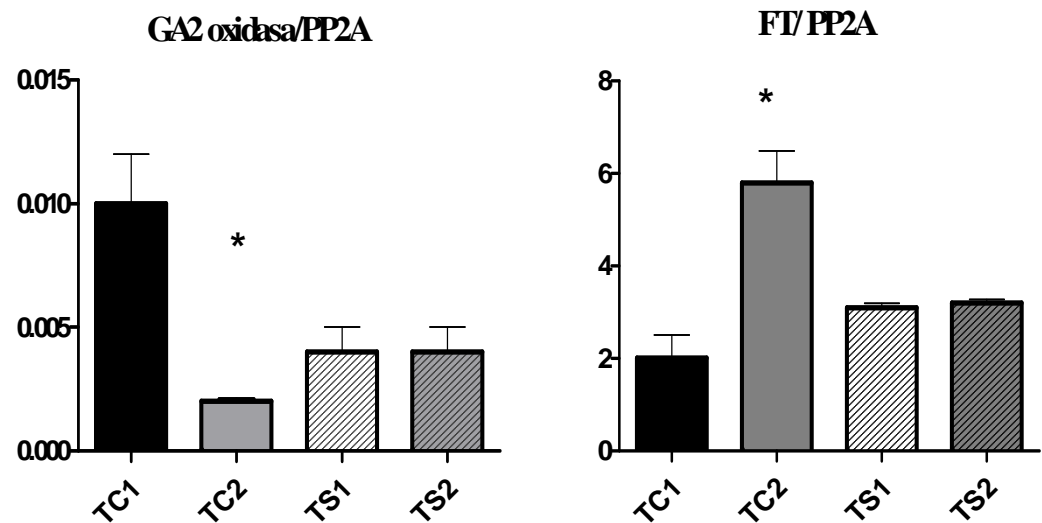


Figura 3.9: Efecto de la radiación sobre la expresión de *Lm GA2 oxidasa* y *Lm FT* creciendo bajo dos condiciones de radiación (control, TC, y sombra, TS) en los dos momentos de muestreo 20 DDE (TC1; TS1) y 50 DDE (TC2; TS2) como se muestra en la Figura 3.6. Experimento 2. Los asteriscos sobre el segundo momento de muestreo (50 DDE) indican diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto a los niveles de la expresión de genes observados en el primer muestreo.

3.4 Discusión

Los resultados del Exp. 1 demuestran claramente que las giberelinas tienen un efecto promotor sobre el desencadenamiento de la floración, ya que la misma fue estimulada con su suministro exógeno en condiciones de sombreado (tratamiento SG) y retardada con la inhibición de su síntesis endógena en condiciones de radiación plena (tratamiento CP). De esta forma, se corrobora que efectivamente la síntesis *de novo* de giberelinas forma parte de la secuencia de eventos que desencadena la inducción a floración, en concordancia con lo postulado por la H₂ propuesta en el Capítulo 1.

Los resultados también sugieren que el momento de adquisición de una tasa de crecimiento superior al umbral de 0.01 g pl^{-1} sería el disparador de la inducción floral, y no una mera consecuencia de que la inducción floral se haya disparado. Esta afirmación se relaciona con el hecho de que se logró desacoplar el intervalo de tiempo entre la adquisición de una determinada tasa de crecimiento por planta y la aparición del botón floral visible (ver Cuadro 2.4 del Capítulo 2).

Que la tasa de crecimiento es la causa de la inducción floral, esta apoyado por los resultados que muestran que plantas mantenidas en sombra y que fueron asperjadas

con GAs, (que mediaría la señal enviada a los meristemas para el pasaje al estado reproductivo) florecieron sin que se hubiera alcanzado, por lo menos durante el tiempo que duró el experimento, la TC considerada umbral. Así, con el agregado de la GAs en forma exógena se logra “puentear” la señal enviada por la adquisición de una determinada tasa de crecimiento. Esto sucedió en contraposición con lo que ocurrió cuando las plantas fueron mantenidas en la sombra durante todo el experimento y sin el agregado de reguladores de crecimiento, que no habiendo alcanzado la tasa de crecimiento “umbral” nunca florecieron. Por otro lado, cuando se logró inhibir la síntesis de GAs de las plantas en condiciones inductivas, estas plantas florecieron 29 días más tarde, a pesar de que no hubo diferencias con respecto al tratamiento control (C), en el momento en que se adquirió una tasa de crecimiento por arriba del umbral. De esta forma, se corrobora la H₂ planteada en el Capítulo 1, que sostiene que la inducción a floración, disparada a partir de la adquisición de una tasa de crecimiento umbral, está mediada por una síntesis de giberelinas.

Los resultados obtenidos concuerdan en parte con otros estudios en otras especies como *Cirsium vulgare* (Klinkamer et al., 1987), *Carlina vulgaris* (Klinkamer et al., 1991) y *Cynoglossum officinales* (Wesselingh et al., 1997). No obstante, es el tamaño de planta y no su tasa de crecimiento el que ha tenido una mayor asociación con el desencadenamiento de la floración en estos estudios, presumiblemente debido a un efecto asociado (aunque no necesariamente causal) que es discutido en el Capítulo 5 de esta tesis. Sin embargo, no ocurre lo mismo en *Oenothera biennis* donde el tamaño de planta no es un buen predictor de la floración y sí lo es la tasa de crecimiento previo a la inducción floral (Gimenez, 2010), en concordancia total con los resultados encontrados en *L. mendocina*.

Los resultados coinciden también con lo que ha sido demostrado en otras especies de roseta, en las que la síntesis de novo de giberelinas ocurre en plantas que perciben fotoperíodos inductivos o son expuestas a bajas temperaturas (vernalización). Las giberelinas han sido específicamente implicadas en la vía autónoma para la floración (Blázquez et al., 1998, Sakamoto et al., 2001). La función de las GAs como una señal móvil para la inducción floral ha sido investigada por Eriksson et al. (2006) (ver revisión de Mutasa- Göttgens and Hedden, 2009) que mostraron que en *Arabidopsis* creciendo en condiciones no inductivas (días cortos) la GA₄ se acumula en el ápice previo a la transición floral; esta acumulación no estuvo correlacionada con cambios en la expresión de genes de la biosíntesis de GAs en el ápice, sugiriendo que las GAs fueron originadas en otros órganos y se movilizaron hasta el meristema. El rol de las GAs en la inducción floral también ha sido establecido en especies bianuales que responden al fotoperíodo, en las cuales la floración en condiciones no inductivas puede producirse por la aplicación de GAs en forma exógena (Zeevaart, 1983; King et al., 2001). Por otro lado, ha sido sugerido en numerosos trabajos en varias especies que las GAs disparan una serie de eventos que conducen a la inducción floral y posterior floración en condiciones que pueden ser o no ser las inductivas para las diferentes especies (Wilson et al., 1992; Bernier et al., 1993; Blázquez et al., 1998; Hedden and Philips, 2000; Gocal et al., 2001; Simpson and Dean, 2002 ; Eriksson et al., 2006; Zeevaart, 2006; Tan and Swain, 2006, Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009)

Por otra parte, los resultados del Experimento 2 sugieren que las señales que estarían involucradas en la inducción floral en esta especie serían las GAs y la proteína FT, en concordancia con la H₃ planteada en el Capítulo 1. Basados en los resultados de este experimento, la exposición de las plantas a la alta intensidad lumínica suprimiría la expresión del gen que codifica para la enzima GA2-oxidasa lo que conduciría a la acumulación de giberelinas activas (Figura 3.9) permitiendo entonces la inducción

floral. Estos resultados, conjuntamente con los obtenidos en el experimento 1 (en el cual por el asperjado de GAs activas a plantas de sombra, con una muy baja tasa de crecimiento permiten la floración), confirman el rol de las GAs en la inducción floral de *L. mendocina*. Los resultados de este experimento también coinciden con los obtenidos por Gocal et al., (2001) y Hisamatsu and King (2008), que sugieren que las giberelinas forman parte de una serie de eventos conducentes a la inducción floral. y con los resultados de algunos trabajos reciente sobre señales florales en *Arabidopsis* que han indicado que el *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Turck et al, 2008) y/o GAs (King and Evans, 2003) sería una señal involucrada en la floración de esta planta.

Los resultados de este experimento sugieren entonces que las giberelinas forman parte “aguas abajo” de una serie de eventos conducentes a la inducción floral iniciados por una tasa de crecimiento mínima o umbral por planta en esta especie. La hipótesis detrás de esto es que la señal enviada a los meristemas, resultado de una mayor tasa de crecimiento por planta sería la sacarosa, será puesta a prueba en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 4

EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE HIDRATOS DE CARBONO EN LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO HASTA INICIACIÓN FLORAL EN PLANTAS DE *L. mendocina*.

4.1 Introducción

En especies perennes y bianuales facultativas, algunos estudios muestran que la inducción floral presenta cierta independencia de los factores ambientales que normalmente controlan el tiempo a su desencadenamiento en especies anuales, tales como temperatura, fotoperíodo y vernalización (Bernier et al., 1993, Reekie 1997; Tan y Swain, 2006) De hecho, *L. mendocina* se ha comportado como especie cortamente perenne que puede florecer durante su primer año de vida o posponer la floración hasta el año siguiente (Windauer et al., 2006). Sin embargo, el estado actual del conocimiento de los procesos que regulan la floración en este tipo de especies de comportamiento floral facultativo es escaso, por lo que se desconocen muchos de los mecanismos involucrados con el desencadenamiento de la floración.

No obstante, existe información ecofisiológica básica para esclarecer la factibilidad de predecir la floración de *L. mendocina* a partir del entendimiento del papel de algunos factores del ambiente sobre el control de la iniciación floral desde la siembra del cultivo (Windauer et al., 2004, 2006a, 2007). En estos estudios, *L. mendocina* mostró una respuesta cualitativa del tiempo a iniciación floral en relación a la temperatura (i.e. las plantas no florecían cuando crecían a temperaturas iguales o superiores a 24°C), e insensibilidad al fotoperíodo, a la vernalización y a las temperaturas inferiores a 24 °C, además de una asociación cuantitativa negativa entre el tiempo a floración y la cantidad de radiación acumulada.

Por otro lado, algunos estudios mostraron que las plantas florecían aún cuando existían grandes diferencias en la cantidad de biomasa acumulada (Windauer et al., 2007), sugiriendo que la inducción floral no se asociaba con el tamaño de la planta sino con la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por planta, determinada por el ambiente en el que las plantas crecían (Windauer et al., 2006). De hecho, en esta tesis se corroboró que el factor de crecimiento que determina el desencadenamiento de la floración es efectivamente la tasa de crecimiento por planta, independientemente del tamaño de la misma, y que este proceso está mediado por la expresión de genes que regulan el contenido endógeno de giberelinas activas y la expresión de otro gen involucrado en la transición del estado vegetativo a reproductivo: el *FT* (Capítulos 2 y 3). Sin embargo, la naturaleza de la señal que, una vez percibido el estímulo (i.e. aumento en la tasa de crecimiento), inicia la cadena de eventos que lleva a la expresión de estos genes, es aún desconocida.

En este marco, el efecto de los carbohidratos sobre la transición floral fue estudiado en detalle y parece ser un mecanismo muy complejo (Rolland et al., 2002). Se cree que los fotoasimilados cumplen un papel importante en la iniciación floral de la plantas, no sólo como parte de una señal endógena compleja asociada a la respuesta a algún factor ambiental, sino además como principales reguladores del transporte de solutos (entre ellas posibles moléculas promotoras de la floración) hacia el ápice vía floemática (Havelange et al., 2000; Perilleux y Bernier, 2002, citado en Thomas, 2006, Bernier y Perilleux, 2005). En numerosos trabajos se ha sugerido que los carbohidratos podrían funcionar como una señalización a distancia durante la inducción

floral (Bernier et al., 1993; Roldan et al., 1997; Levy and Dean, 1998; Ohto et al., 2001; Heyer et al., 2004; King et al., 2008).

Los carbohidratos juegan un rol importante como moléculas que regulan la expresión de una gran variedad de genes y es probable que afecten varios aspectos del desarrollo en las plantas (Krapp et al., 1993; Graham et al., 1994; Jang and Sheen, 1994; Martin et al., 1997; Klein and Stitt, 1998; Roitsch, 1999; Sheen et al., 1999; Brouquisse et al., 2001; Fernie et al., 2001; Ohto et al., 2001). Su disponibilidad puede controlar la transición floral por la regulación positiva y negativa de la expresión de genes de identidad de la floración (Ohto et al., 2001) y de genes integradores de las señales ambientales (King et al., 2008). En *Arabidopsis*, Araki and Komeda (1993) y Roldán et al. (1999), demostraron que la sacarosa participa en la activación de algunos genes, cumpliendo un rol positivo en la transición floral. En contraste, Zhou et al. (1998) observaron que con altos niveles de azúcar en el medio se retrasó significativamente la floración en esta misma especie. De este modo, bajas y altas concentraciones de carbohidratos en el medio podrían actuar de maneras opuestas, adelantando o retrasando el pasaje del estado vegetativo al reproductivo.

Lo anteriormente expuesto revela que el estado actual del entendimiento del rol de los carbohidratos en el desencadenamiento de la floración es difuso, tanto para especies anuales como perennes, y presenta resultados contrastantes. Como en *L. mendocina* el tiempo a floración se encuentra asociado con la adquisición de una tasa de crecimiento umbral (Capítulo 2) y este cambio parecería ser el factor causal de su desencadenamiento (mediado por la acción de las giberelinas cuya acumulación estaría regulada a nivel de la expresión de genes de su biosíntesis y catabolismo, ver Capítulo 3), se hipotetiza que la cadena de eventos que culmina con la inducción floral, se dispararía a partir de un aumento en la concentración de carbohidratos que actuarían como señal.

Sobre la base de lo anterior, el objetivo de este capítulo es establecer si el cambio en la tasa de crecimiento de las plantas de *L. mendocina* conlleva un aumento en la concentración endógena de hidratos de carbono, que sería instrumental para disparar la cadena de eventos conducentes a la inducción floral (objetivo específico 4 mencionado en el Capítulo 1). Para ello, se llevó a cabo un experimento en el que se combinaron distintas disponibilidades de radiación y carbohidratos. De este modo, se pone a prueba la H₄ propuesta en el Capítulo 1, que sostiene que la mayor disponibilidad de hidratos de carbono, que resulta de la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por parte de la planta, es una señal que participa en el desencadenamiento de los eventos que conducen a la inducción floral.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Condiciones generales y preparación del sistema experimental

La base de las condiciones generales son las mismas que las presentadas en el Capítulo 2 de esta tesis. Se diseñó un sistema para controlar la nutrición del sustrato de las macetas mediante la aplicación de soluciones líquidas con concentraciones controladas de nutrientes (solución Hoagland) y sacarosa. Se prepararon macetas

plásticas (8,5 cm. x 7,5 cm) previamente desfondadas; dentro de cada una se colocó una malla (tul) sujeta con una banda elástica, de forma tal de mantener el sustrato dentro de la maceta (Fig. 4.1). Las macetas se llenaron con vermiculita de granulometría media-gruesa y se colocaron dentro de cubetas plásticas (30 cm. de largo x 25 cm. de ancho x 7 cm. de alto) que contenían esponjas florales (448 Secure-Firm density/Instant soaking, Floralife, Inc., Walterboro, SC, USA) con el fin de controlar el ascenso capilar de la solución, manteniendo así la capacidad de campo en el sustrato de cada maceta. Sobre cada cubeta se ubicaron 10 macetas (Fig. 4.2).



Figura 4.1: Vista y detalle de una maceta plástica con malla (tul) en su interior.

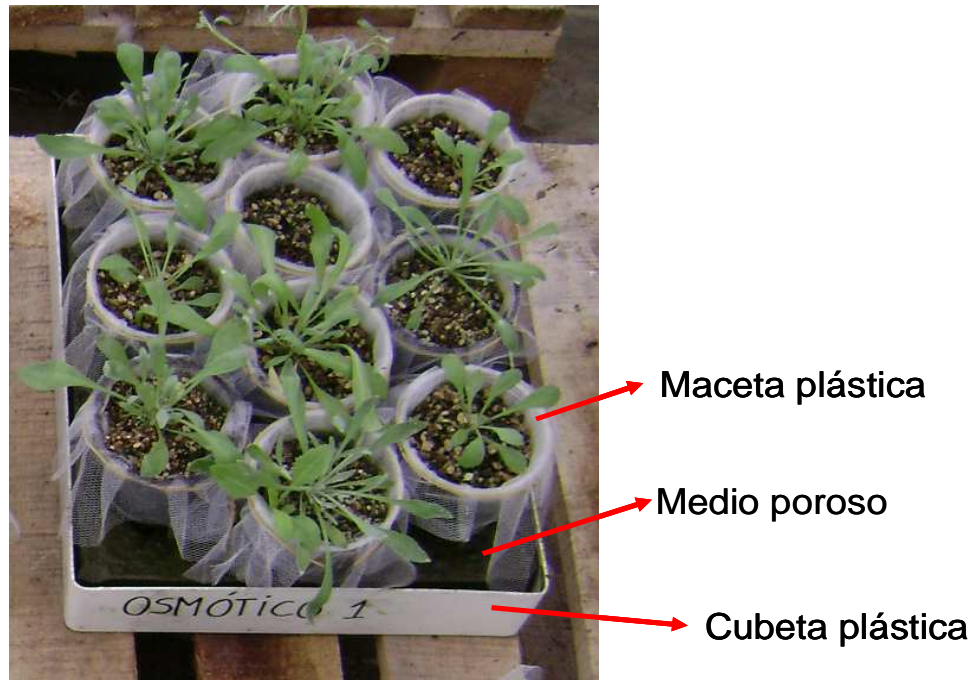


Figura 4.2: Vista y detalle de una cubeta con macetas y plantas en estado vegetativo, medio porosos y plantas en estado vegetativo

Previo a la siembra, se pusieron a germinar a 20° C semillas de *L. mendocina* en cajas de Petri y con papel de filtro, agregándoles 5 ml. de agua por caja. Las semillas pre-germinadas (radícula visible) fueron sembradas en las macetas con vermiculita en número de 2 -3 por maceta, para ralear a una planta por maceta luego de 2 semanas de realizada la siembra (en estado V2). Se agregó agua a cada cubeta hasta cubrir totalmente las esponjas (manteniendo así la capacidad de campo en el sustrato de cada maceta) y se las dejó en un invernáculo abierto con media sombra para evitar elevados niveles de estrés en las primeras etapas del cultivo. Durante la emergencia se pulverizó a las plantas con sulfato de oxiciquinolenia (Almacigol) 0,4 gr/l con pulverizador manual para prevenir el ataque de hongos, fundamentalmente del complejo damping off. Una vez raleadas las plantas en el estado V2, las macetas se pasaron del invernáculo a la intemperie, colocando las cubetas sobre tarimas de madera (1m x 1.2 m; 6 cubetas por tarima, Figura 4.3). Luego de un primer regado inicial con agua pura sobre las esponjas de las cubetas hasta cubrirlas totalmente, las plantas de cada maceta fueron regadas diariamente con solución nutritiva Hoagland y agua alternativamente (50 ml. / maceta).

4.2.2 Tratamientos

Cuando las plantas alcanzaron 3 hojas (V3) se aplicaron aleatoriamente los tratamientos de radiación. Se realizaron tratamientos con 2 niveles de radiación y con 4 repeticiones por tratamiento:

Luz (L): Control con plena radiación o 100% de radiación incidente.

Sombra (S): Tratamiento sombreado mediante restricciones de radiación impuestas con mallas que interceptaban el 65% de la radiación incidente (Fig. 4.3).

El registro de la intercepción de radiación fue realizado con un sensor puntual de radiación PAR Li-190 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska), conectado con un registrador de datos Li-1000 (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska) durante un día totalmente despejado. Estos tratamientos se mantuvieron hasta la aparición del botón floral (BFV).



Figura 4.3: Vista del experimento al aire libre una vez aplicados los tratamientos de sombra.

Dentro de cada unidad experimental de radiación se aplicaron aleatoriamente los tratamientos con sacarosa y control osmótico (con un producto inerte: polietilenglicol (PEG 6000)) en el medio de cultivo, con 4 repeticiones (cubetas) por tratamiento:

- **Control (C):** solo con solución Hoagland (LC y LS).
- **Azúcar 1 (A₁):** solución Hoagland + 0,4% p/v sacarosa (L A₁ y S A₁)
- **Azúcar 2 (A₂):** solución Hoagland + 0,7% p/v sacarosa (L A₂ y S A₂)
- **Osmótico 1 (O₁):** solución Hoagland + osmótico 1 (L O₁ y S O₁)
- **Osmótico 2 (O₂):** solución Hoagland + osmótico 2 (L O₂ y S O₂)

Estos tratamientos comenzaron a aplicarse cuando las plantas se encontraban en 5 hojas (V5). Para ello se regaba cada maceta con aproximadamente 50 ml. de solución, manteniendo la vermiculita a capacidad de campo. Los tratamientos de sacarosa y osmótico fueron aplicados durante 15 días y a partir de allí se las siguió regando con solución Hoagland hasta terminar el experimento. De esta forma se logró un experimento con un diseño en parcelas divididas, con 2 factores (“radiación”: factor mayor y “azúcar y osmóticos”: factor menor) y con 4 repeticiones por tratamiento (Fig. 4.4). Una de las repeticiones de todos los tratamientos del factor menor fue hecha con el fin de hacer las cosechas semanales de plantas para la determinación de la evolución del peso seco de las plantas.

Para lograr en los tratamientos O_1 y O_2 el mismo potencial agua que en los tratamientos A_1 y A_2 , (para poder distinguir el efecto osmótico que pudiera producir el agregado de sacarosa a la solución de riego del efecto señal) se utilizó polietilenglicol (PEG 6000), un osmolito no metabólico. Las dosis de los tratamientos de azúcar y osmóticos se establecieron tomando como base un estudio reciente cuyo objetivo fue establecer un rango de aplicación de dosis apropiadas (Portatadino, 2007).

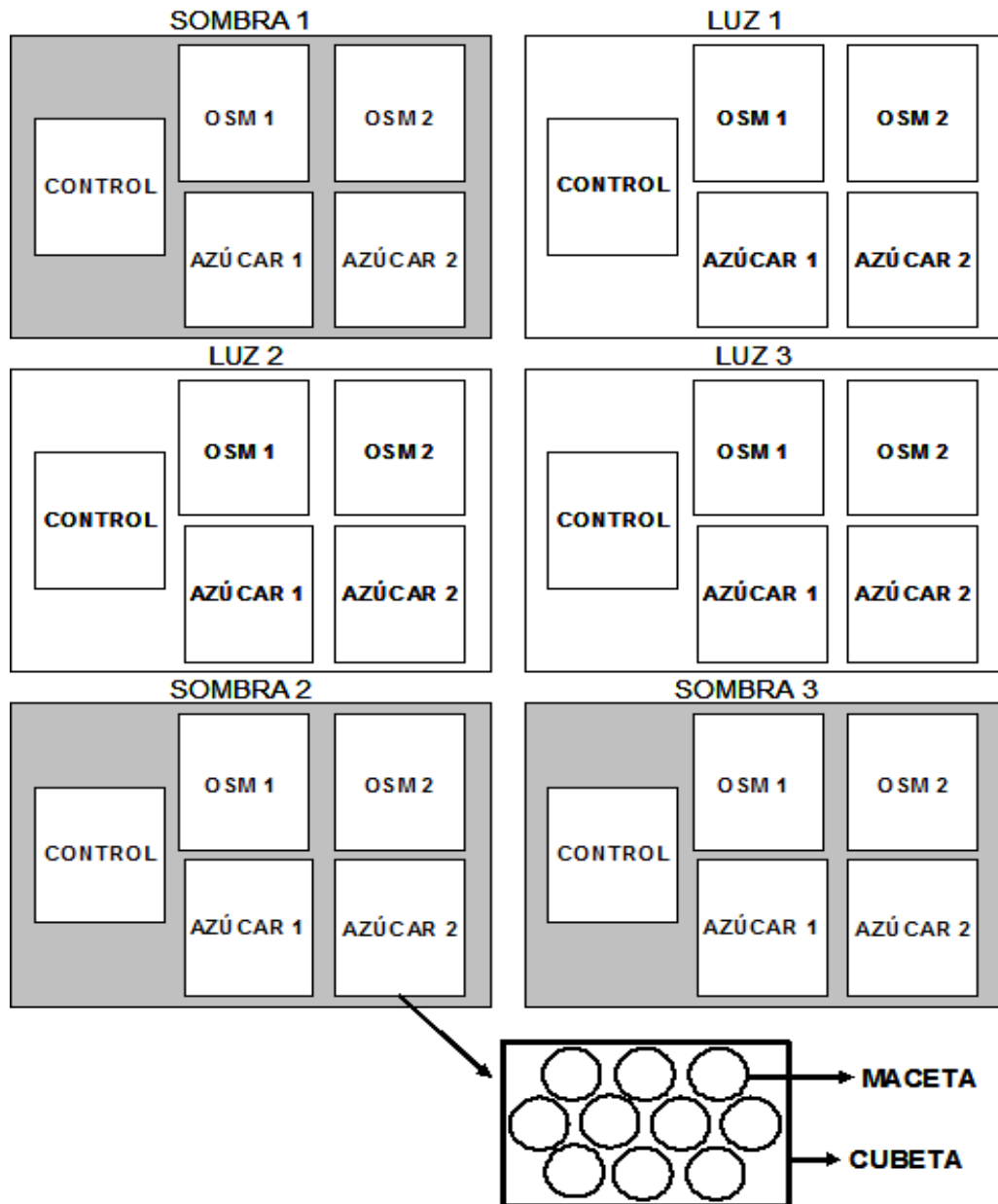


Figura 4.4: Diseño experimental. Cada repetición consto de 5 cubetas que contenían 10 macetas por cubeta.

Durante todo el experimento, cada vez que se pronosticaron lluvias, las plantas fueron cubiertas transitoriamente con techos plásticos corredizos, para protegerlas y para evitar que se modifique la concentración de los solutos (Fig 4. 5).



Figura 4.5: Vista de los techos corredizos cubriendo el ensayo.

4.2.3 Mediciones y análisis estadístico

Se realizaron observaciones fenológicas diarias en cada planta en todas las macetas para detectar estado reproductivo visible (BFV). El análisis estadístico realizado para el momento de BFV de todos los tratamientos fue un análisis de variancia (ANOVA). Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) se compararon las medias mediante un test de Bonferroni. Además, se realizaron cosechas periódicas de 2 plantas por tratamiento para analizar la marcha del peso seco del cultivo y así poder obtener las tasas de crecimiento de cada tratamiento. Se usó el mismo modelo de regresión lineal utilizado en los Capítulos 2 y 3 para estimar la asociación entre el peso seco y el tiempo:

$$\text{Peso seco} = a + b * \text{DDE si } (\text{DAE} \leq c) + d (\text{DDE} - c) \text{ si } (\text{DDE} \geq c); \quad (\text{Eq. 1})$$

donde DDE son los días después de la emergencia; a es la ordenada al origen, b y d son diferentes pendientes de la regresión lineal equivalentes a tasas de crecimiento y c es el punto de quiebre de la función que indica los días a cambio de tasa de crecimiento.

A diferencia del análisis estadístico realizado para el momento de BFV, en el caso de los parámetros del modelo, no se pudo realizar análisis de varianza debido a que no se cumplía el supuesto de homogeneidad de las varianzas. Por esta razón se optó por evaluar la existencia de diferencias significativas utilizando los intervalos de confianza (IC) a los 90 % proporcionados por el modelo. De esta forma, se consideraba la diferencia entre medias como significativa cuando no existía superposición alguna entre los intervalos.

4.3 Resultados

El tiempo desde la emergencia hasta BFV en las plantas de *L. mendocina* fue afectado por el nivel de radiación disponible (Cuadro 4.1). Se evidenció que la reducción del nivel de radiación disponible para las plantas produjo un retraso significativo de alrededor de 14 días ($p < 0,05$, promedio de los cinco tratamientos de disponibilidad de carbohidratos) en la aparición del botón floral, independientemente del tratamiento en la solución nutritiva. También resultó significativo el impacto de los tratamientos de disponibilidad de hidratos de carbono (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1: Análisis de variancia para el tiempo entre siembra y botón floral visible (BFV).

Fuente de variación	% de la variación total	P
Interacción	1.93	0.7100 NS
Tratamientos de disponibilidad de HC	32.97	0.0002
Tratamientos de radiación	47.18	<0.0001

NS = no significativo

En relación con esto último, no se observaron diferencias significativas en el tiempo en que las plantas alcanzan BFV entre las plantas del tratamiento control y A1 o O1 tanto en los tratamientos de plena radiación como en los de sombra, mientras que los tratamientos A2 y O2 retrasaron significativamente ($P < 0.05$) la aparición de BFV respecto a C (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2: Días desde siembra (DDS) hasta botón floral visible (BFV) en las plantas de los tratamientos de plena radiación y en los de sombra. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de disponibilidad de carbohidratos para cada tratamiento de radiación ($P < 0.05$).

Tratamiento de disponibilidad de carbohidratos	Luz	Sombra
Control (C)	96 ± 4.16 c	114 ± 5.5 b
Azúcar1 (A1)	104 ± 4.16 bc	118 ± 1.73 ab
Osmótico 1 (O1)	102 ± 7.64 bc	114 ± 4.04 b
Azúcar 2 (A2)	116 ± 7.16 a	126 ± 1.53 a
Osmótico 2 (O2)	109 ± 8.89 ab	125 ± 2.0 a

* *Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).*

Por otra parte, en algunos tratamientos el estado BFV no fue alcanzado por la totalidad de las plantas (Figura 4.6). En ambas condiciones de radiación, la proporción de plantas florecidas fue máxima en los tratamientos C y A1, mientras que hubo una disminución de alrededor del 20% en plantas que alcanzaron el estado reproductivo cuando se aplicaron los tratamientos A2, O 1 y O2.

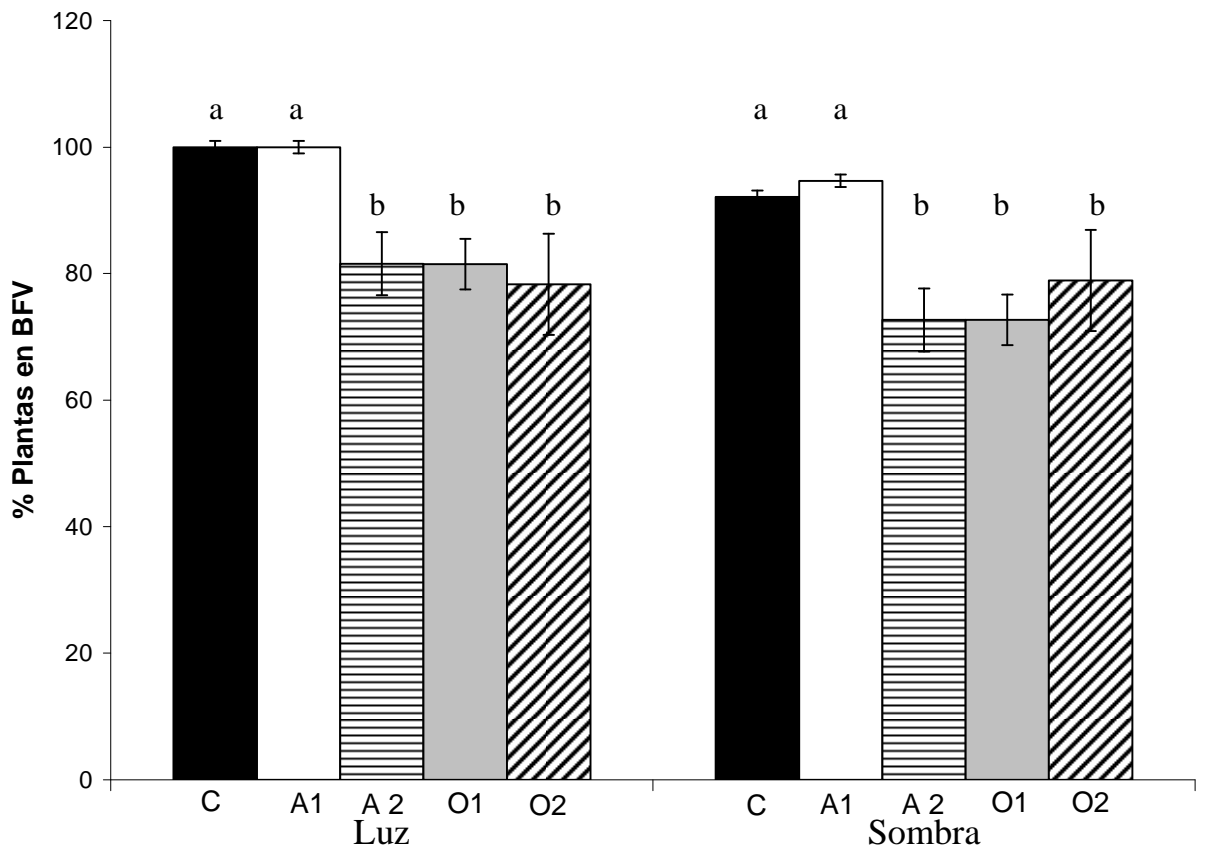


Figura 4.6: Porcentaje final de plantas en estado reproductivo (BFV) de los tratamientos de disponibilidad de HC bajo tratamientos de luz y de sombra. Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Los segmentos verticales indican el error estándar. ($n=10$)

La supervivencia de las plantas no fue afectada significativamente por la disponibilidad de radiación, aunque se observó un efecto significativo del nivel de sacarosa y osmótico aplicados. Los porcentajes de mortandad se mantuvieron en valores bajos en las plantas de los tratamientos de Control y Azúcar 1, y aumentaron considerablemente en las plantas de los tratamientos Azúcar 2 y osmóticos (Cuadro 4.3)

Cuadro 4.3: Porcentaje de Mortandad de plantas de los diferentes tratamientos de sacarosa y osmóticas bajo las dos condiciones de radiación

Tratamientos	MORTANDAD (%)	
	Luz	Sombra
Control	6,67 bc*	13,33 b
Azúcar 1	10,00 b	10,00 b
Azúcar 2	23,33 a	13,33 b
Osmótico 1	26,67 a	26,67 a
Osmótico 2	23,33a	23,33 a

**Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).*

Al analizar los parámetros del modelo de regresión lineal para ajustar la asociación entre el peso seco y el tiempo, se observó que la tasa de crecimiento inicial (parámetro b) fue muy baja y similar en todos los tratamientos (Cuadros 4.4 y 4.5; Figura 4.7). Por otra parte, en las plantas correspondientes al tratamiento S, al aplicarle la sacarosa (SA₁ y SA₂) el tiempo en días transcurrido hasta alcanzar el cambio de tasa de crecimiento (parámetro c) se acortó significativamente (IC: 90 %) con respecto a las plantas de los tratamientos control y osmóticos, lo que indicaría un adelantamiento del momento de la iniciación floral (Cuadro 4.4). Aunque se observó la misma tendencia en los tratamientos homólogos bajo plena radiación (L), esta no revistió significancia estadística, con la excepción del retraso de 9 días observado en O1, respecto al control (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.4: Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del Experimento de Sombra.

Sombra	Parámetros			
	a	b	c	d
Control	-0.0176 NS (-0.046a 0.025)*	0.0004742 NS (0.0001 a 0.001)	92a (83 a 101)	0.005914ab (0.0039a 0.078)
Azúcar1	0.001515S (-0.028 a 0.031)	0.0001082 NS (0.0006a 0.0008)	66 b (41 a 80)	0.001276 c (0.0007a 0.0017)
Azúcar2	0.001253 (-0.011 a 0.014)	0.000103NS (-0.0001a 0.0003)	67 b (55 a 79)	0.001271 c (0.0006a 0.0017)
Osmótico1	-0.002633 NS (-0 .031 a 0.026)	0.0002346 NS (-0.0002 a 0.0072)	80 ab (71 a 90)	0.004132 b (0.002a 0.0059)
Osmótico2	-0.005882 NS (-0.017 a 0.005)	0.0003491 (-0.0001 ^a 0.0005)	93a (90 a 94)	0.01104 a (0.0089a 0.013)

a: ordenada al origen; **b:** pendiente inicial (tasa de crecimiento); **c:** punto de quiebre de la función; **d:** pendiente final (tasa de crecimiento).

* Números entre paréntesis muestran el intervalo de confianza (IC; 90%). estimados para cada parámetro. ** Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.1). NS = no significativo.

Cuadro 4.5: Parámetros del modelo de regresión (Eq. 1) usados para estimar la asociación entre el peso seco por planta (días después de la emergencia) del Experimento de Luz

LUZ	Parámetros			
	a	b	c	d
Control	-0.0153 NS (-0.091 a 0.06)*	0.0007163 NS (0.0006 a 0.002)	83b (76 a 88)	0.0165 b (0.0104a 0.0225)
Azúcar1	0.001065NS (-0.029 a 0.031)	0.0002025 NS (0.0004a 0.0008)	69 b (58 a 79)	0.003326 c (0.0023a 0.0043)
Azúcar2	0.003486 (-0.044 a 0.05)	0.000057 NS (-0.001a 0.0012)	63 b (34 a 91)	0.001991 c (0.0005a 0.0028)
Osmótico1	-0.0162 NS (-0 .047 a 0.014)	0.0007087 NS (0.0001 ^a 0.0012)	92 a (90 a 94)	0.02853 a (0.0231a 0.0339)
Osmótico2	-0.00697 NS (-0.044 a 0.035)	0.0004304 (-0.0003a 0.001)	71b (60 a 83)	0.00382c (0.0021a 0.0055)

a: ordenada al origen; **b:** pendiente inicial (tasa de crecimiento); **c:** punto de quiebre de la función; **d:** pendiente final (tasa de crecimiento).

* Números entre paréntesis muestran el intervalo de confianza (IC;90%).
estimados para cada parámetro.

** Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05). NS = no significativo.

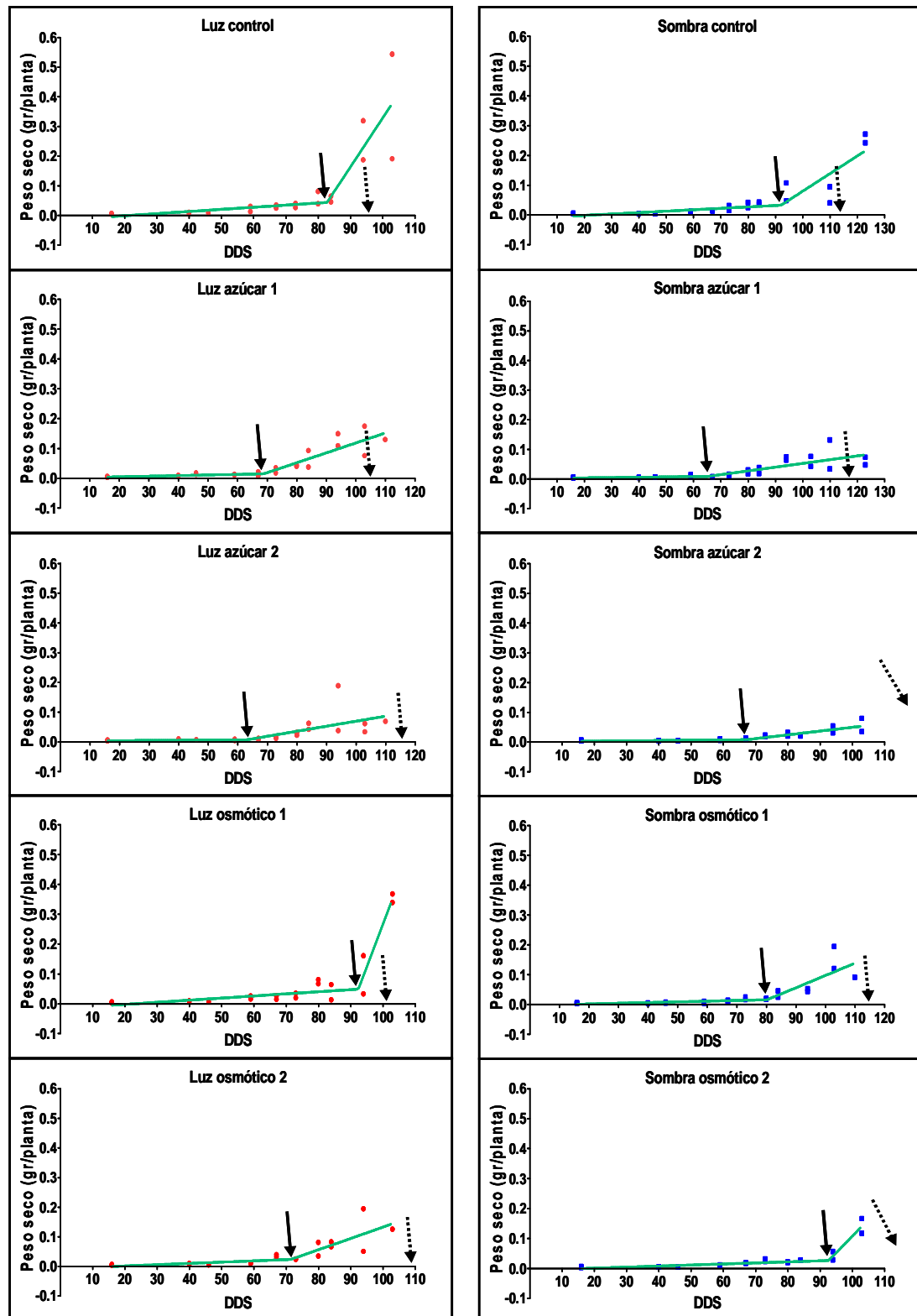


Figura 4.7: Peso seco por planta en función de los días desde la siembra (DDS) para todas las combinaciones de tratamientos de Luz y de Sombra. La línea sólida fue ajustada usando un modelo condicional de regresión lineal. Las flechas llenas indican el parámetro “c” del modelo de regresión lineal y las flechas punteadas indican el botón floral visible (BFV).

Durante el período efectivo de aplicación de tratamientos, tanto de sacarosa como de osmóticos, no se detectaron cambios en la tasa de crecimiento, por lo que el parámetro “c” siempre se detectó posteriormente a este período efectivo. A pesar de ello, en todos los tratamientos con carbohidratos la tasa de crecimiento posterior (parámetro d) no alcanzó el valor de 0.01 gr pl^{-1} postulado como umbral en el Capítulo 2 de esta tesis (Cuadro 4.4 y 4.5; Figura 4.7). En cambio, esta tasa fue sólo alcanzada en el tratamiento O2 bajo sombra y O1 bajo irradiación plena, aunque en estos casos su adquisición estuvo asociada con los máximos retrasos cronológicos, respecto al resto de los tratamientos. Aunque en ningún tratamiento donde la tasa de crecimiento “d” fue inferior al umbral se impidió totalmente que las plantas alcanzaran el estado reproductivo (BFV), el impacto resultó parcial sobre una fracción de las poblaciones de todos los tratamientos A2 y osmóticos, donde alrededor del 20% de las plantas permanecieron en estado vegetativo (Fig. 4.6). La excepción a esta respuesta se produjo en los tratamientos A1 con un 100% de su población florecida, a pesar de haber también registrado bajos valores de este parámetro.

4.4 Discusión

Los resultados revelan claramente que los tratamientos de carbohidratos tuvieron dos efectos que resultaron contrapuestos en su respuesta: por un lado, los carbohidratos actuaron como señal, pero también se observaron efectos osmóticos. Esta función dual que tuvieron los carbohidratos como osmolito y como señal molecular dificultaron la interpretación de los resultados de estos experimentos y el análisis de los mecanismos involucrados en la floración, en concordancia con algunos trabajos relacionados con este tema (Rolland et al., 2001). Los efectos osmóticos resultaron más marcados en los tratamientos con máximas dosis (A2 y O2), que se reflejaron en disminuciones en el porcentaje de plantas que alcanzaron BVF y aumentos en la mortalidad de plantas. Resultados contrapuestos pueden encontrarse en la bibliografía sobre el efecto de la disponibilidad de carbohidratos sobre la transición floral. Así, en *Arabidopsis*, Roldán et al. (1999), demostraron que la sacarosa cumple un rol positivo en la transición floral, mientras que Zhou et al. (1998) observaron que con altos niveles de azúcar en el medio se retrasó significativamente la floración en esta misma especie. De este modo, bajas y altas concentraciones de carbohidratos en el medio podrían actuar de maneras opuestas, adelantando o retrasando el pasaje del estado vegetativo según prevalezcan los efectos señal u osmóticos respectivamente, como sucede en estos experimentos.

No obstante, aunque también hubo efectos osmóticos en los tratamientos de dosis baja (A1 y O1), los mismos no fueron suficientes como para enmascarar sus efectos como señal molecular que se relacionan con el abordaje del objetivo propuesto en este capítulo. Relacionado con esta dosis, los resultados muestran un comportamiento diferencial en el momento de cambio de tasa de crecimiento (parámetro c) de las plantas que recibieron sacarosa, ya que se produjo un adelanto de este momento en las plantas del tratamiento A1 pero no en las plantas del tratamiento O1, en comparación con los controles. La tendencia se observó tanto en condiciones de radiación plena como en sombreado, aunque solo resultó significativa en la segunda, posiblemente debido a la mayor limitación de carbohidratos de las plantas control mantenidas en sombra respecto a las que recibieron irradiación plena. Resultados semejantes fueron encontrados en *Arabidopsis*, en que la mayoría de los ecotipos ensayados florecieron más temprano en

oscuridad con el agregado de sacarosa que en luz con sacarosa (Roldan et al., 1999). Estos resultados sugieren un primer indicio de un impacto positivo de los carbohidratos actuando como señal (en concordancia con la H₄ planteada en el Capítulo 1), ya que evidencian un rol involucrado en un adelantamiento del momento de inducción floral.

En adición con lo anterior, la tasa de crecimiento de las plantas posterior al quiebre (parámetro *d* del modelo de ajuste) en la mayoría de los tratamientos no superó el valor de 0.01gr pl⁻¹ postulado como umbral en el Capítulo 2 de esta tesis. Sin embargo, en estas situaciones sólo un cuarto de la población de plantas permaneció en estado vegetativo, mientras que el resto alcanzó el estado reproductivo (ver Figura 4.6). Dos posibles causas podrían estar involucradas en esta respuesta parcial: i) una alta dispersión en los ajustes de este parámetro, en algunos casos provocada por la poca cantidad de valores observados que resultaron posteriores a la detección del parámetro “*c*” y ii) que en algunos tratamientos el valor promedio del momento en el que ocurre el botón floral visible se produjo posteriormente a la ventana de tiempo analizada durante la marcha del peso seco. En consecuencia, (y a diferencia de lo mostrado en los capítulos anteriores de la tesis), las estimaciones del parámetro *d* de este experimento no resultan suficientemente robustas como para asociarlas con un umbral de floración.

Sin embargo, la asociación anteriormente planteada resulta valiosa para interpretarla como otro indicio contundente de que los carbohidratos en las dosis bajas utilizadas en estos experimentos estarían actuando como señal, en este caso “puenteando” el efecto negativo causado sobre la tasa de crecimiento. De hecho, sólo en los tratamientos LA1 y SA1 el porcentaje de plantas inducidas a floración fue de 100% como en sus respectivos controles. En cambio, se observó que hubo un 20% de la población que no floreció cuando se registraron las mismas condiciones osmóticas pero sin la presencia de sacarosa (LO1 y SO1), tal como ocurrió en los tratamientos de alta dosis de carbohidratos (LA2 y SA2 y sus respectivos osmóticos). Lo anteriormente expuesto corrobora en forma concluyente la H₄ planteada en esta tesis, que sostiene que la mayor disponibilidad de hidratos de carbono que resulta de la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por parte de la planta, es una señal que participa en el desencadenamiento de los eventos que conducen a la inducción floral.

Los resultados coinciden con muchos trabajos que señalan que los carbohidratos en dosis adecuadas podrían funcionar como una señalización a distancia durante la inducción floral (Bernier et al., 1993; Roldan et al., 1997; Levy and Dean, 1998; Ohto et al., 2001; Heyer et al., 2004; Erikson et al., 2006; King et al., 2008; ver revisión Turnbull, 2011). Tomando en conjunto los resultados de estos experimentos con los obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis (que indican que en *L. mendocina* creciendo con limitaciones de radiación las GAs son requeridas para promover la floración), el análisis integrado sugiere la existencia de interacciones entre las GAs y la sacarosa. El efecto promotor de la sacarosa y las GAs sobre el tiempo a floración son consistentes con su efecto sinérgico sobre la regulación de la expresión del gen *FT* en condiciones inductivas encontrado en otras especies (Blazquez et al., 1998; Samach et al., 2000; Ohto et al., 2001) y los resultados del Capítulo 3 de esta tesis. Trabajos en *Arabidopsis* acuerdan con estos resultados. Mientras algunos proponen a la sacarosa como promotor de la floración por la regulación de la expresión de genes represor de la floración (*FLC*) permitiendo entonces la expresión aguas debajo del gen *FT* (Michaels y Amasino, 1999; Sheldon et al., 1999, Ohto et al., 2001), otros trabajos sugieren al *gen FT* como la señal mediante la cual el azúcar directamente promueve la transición floral en condiciones inductivas (Araki, 2001, Ohto et al., 2001, Seo et al., 2011). Estas hipótesis

deberían abordarse en futuros experimentos en especies bienales facultativas como la estudiada en esta tesis.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Síntesis y aportes en relación a lo anteriormente conocido

El momento de transición entre el estado vegetativo a reproductivo en las plantas es de gran importancia, siendo determinante para asegurar que la floración y fructificación ocurran en condiciones favorables y permitir la persistencia de las especies. Un sin número de trabajos, tanto a nivel bioquímico-fisiológico y genético-molecular, han aportado evidencias de que la floración en las plantas involucra la coordinación de muchos procesos, donde factores externos e internos condicionan el control de la inducción floral (Bernier et al., 1981; Bernier, 1993; Kinet, 1993; Koornneef et al., 1998; Levy and Dean, 1998; Simpson et al., 1999; Blazquez and Weigel, 2000; Gibson, 2000; Mouradov et al., 2002; Boss et al., 2004; Austin, 2005; Wigge et al., 2005; Cobersier and Coupland, 2006; Tan y Swain, 2006; King et al., 2008; Mutasa-Gottgens and Hedden, 2009; Amasino, 2010; Turnbull, 2011). Para maximizar el éxito reproductivo, este proceso es determinado por complejas interacciones entre factores ambientales (por ejemplo fotoperíodo), mediada por una serie de señales endógenas, como por ejemplo, giberelinas (King et al., 2001; 2006; 2008; Lee and Zeevaart, 2005) y también por el programa genético interno de la planta (Mouradov et al., 2002; Boss et al., 2004). En este sentido, se han identificado muchos genes que actúan promoviendo o inhibiendo la floración de algunas especies que interactúan con factores ambientales o en forma autónoma (Martínez-García et al., 2002; Boss et al., 2004; King et al., 2006; Mathieu et al., 2007; Meng et al., 2011). Así, hay evidencias de que existe una serie de vías que se solapan o son redundantes y confluyen al final de la cadena, determinando de esa manera la integración de las señales ambientales y endógenas o actuando en forma autónoma, modificando la expresión de genes que promueven o inhiben la floración de algunas especies (ver Figura 3.1). La mayor parte de esta información deriva de estudios que fueron llevados a cabo con plantas anuales.

En relación con lo anterior, existen especies anuales que florecen y completan su desarrollo todos los años y también especies que viven más de un año, tales como las bianuales o perennes (Ausin, 2005). Así, dentro de éstas últimas, hay especies que florecen todos los años en forma recurrente, llamadas policárpicas (dentro de las cuales se encuentra la especie objeto de estudio de esta tesis *L. mendocina*), y otras florecen una sola vez durante su ciclo de vida (monocárpicas). Las especies perennes policárpicas pueden presentar una gran variabilidad en el momento de su floración y pueden florecer durante la primera estación de crecimiento, en la segunda o aún en años posteriores (Bloom et al., 2003). Este comportamiento puede ser una limitante para la explotación comercial de cultivos, como el caso de *L. mendocina*, donde la situación es lograr la floración de todos sus individuos durante el primer año de vida. Sin embargo, en especies perennes el control de la floración es un aspecto de la biología vegetal que, aunque recibió considerable atención, resulta en la actualidad poco conocido debido a la complejidad de factores involucrados y a la diversidad de respuesta entre especies y en diferentes ambientes (Heide 1994; Tan y Swain, 2006; Erwin, 2007).

En *L. mendocina*, se han llevado a cabo estudios fisiológicos que permiten clasificarla como insensible al fotoperíodo, a la vernalización y a las temperaturas cuando las mismas están por debajo de 24 °C (Windauer et al., 2004; Windauer et al., 2006; Windauer et al., 2007). Además, estos estudios indican que la tasa de desarrollo se acelera conforme se atrasa la fecha de siembra. Se observó también, que las plantas de *L. mendocina* florecían aún cuando existían grandes diferencias en la cantidad de biomasa acumulada (Windauer, 2002) lo que estaría descartando para esta especie, a la adquisición de un tamaño de planta “umbral” como un disparador de la inducción floral, como ha sido indicado para otras especies perennes facultativas (Hirose y Kachi, 1982; Lacey, 1986; Klinkhamer et al., 1987; Bazzaz, 1997; Reekie, 1997; Wesselingh et al., 1997). Se encontró también una respuesta cualitativa en relación a la temperatura con respecto a tiempo de floración ya que las plantas no florecían durante el primer año cuando crecían a temperaturas medias iguales o superiores a 24°C (Windauer, 2002; Windauer et al., 2004).

En conjunto, los resultados de estudios anteriores permiten clasificar a *L. mendocina* como una especie autónoma, y sugieren que las señales endógenas requeridas para desencadenar la floración son promovidas por factores ambientales involucrados en el crecimiento, tales como la intensidad de radiación (Bernier 1993). Por lo tanto, esta especie constituyó una excelente herramienta de trabajo para poder ampliar la frontera del conocimiento relacionada con la línea de estudio del momento de la primera floración en especies con comportamiento perenne facultativo, ya que en forma obligada estaría sujeto a la acción de un factor desencadenante no conocido.

Así, en la presente tesis, se presentaron estudios que permiten profundizar el conocimiento de los mecanismos involucrados en la regulación de la inducción de la floración y posterior floración de *L. mendocina*, consolidando el marco teórico presentado en el Capítulo 1. Se caracterizó el rol de factores que controlan el crecimiento como la radiación, el agua y los nutrientes, en la regulación del tiempo a floración, encontrándose una asociación entre la adquisición de una tasa de crecimiento Umbral (TC_u) y el momento de inducción floral contundente a través de modificaciones en la tasa de crecimiento por planta (Capítulos 2 y 3). Estos resultados permitieron aceptar la H_1 derivada del objetivo específico 1a, corroborando que los factores del ambiente que afectan el crecimiento modulan el momento de adquisición de una tasa de crecimiento (TC_u : $0.01 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{pl}^{-1}$) considerada como umbral (ver Cuadros 2.2 y 2.3). Este momento estuvo a su vez asociado en forma contundente con la inducción floral (ver Figura 2. 6).

Para establecer la causalidad de la asociación anteriormente mencionada, se investigó si la síntesis de giberelinas forma parte de la cascada de eventos que, iniciada por la adquisición de la TC_u , desemboca en la inducción de la floración. Los resultados obtenidos permiten aceptar la H_2 derivada del objetivo 2 y demuestran claramente que las giberelinas tienen un efecto promotor sobre el desencadenamiento de la floración, ya que la misma fue estimulada con suministro exógeno en condiciones de sombreado y retardada con la inhibición de su síntesis endógena en condiciones de radiación plena (ver Cuadro 3.2 y figura 3.6). De esta forma, se corroboró que el momento de adquisición de una tasa de crecimiento superior al umbral de 0.01 g pl^{-1} es el factor causal que dispara la inducción floral, y no una consecuencia de que la inducción floral se haya disparado, en concordancia con el objetivo 1b propuesto en esta tesis. Esto se debe a que se logró desacoplar el intervalo entre la adquisición de una determinada tasa de crecimiento por planta y la aparición del botón floral visible (ver Cuadro 2.4).

En relación con las bases genéticas involucradas en la respuesta a la floración, se confirmó que la exposición de la planta a la alta intensidad lumínica suprimiría la

expresión del gen que codifica para la enzima GA2-oxidasa lo que conduciría a la acumulación de giberelinas activas (ver Figuras 3.6 y 3.9). Por otra parte, se detectó un aumento de la proteína codificada por el gen Flowering locus T en condiciones inductivas para la floración. Estos resultados corroboran la H₃ propuesta en esta tesis.

En este contexto, los resultados del Capítulo 4 dan un primer indicio de un impacto positivo de los carbohidratos actuando como señal, en concordancia con la H₄, ya que evidencian un rol de los azúcares involucrados en un adelantamiento del momento de inducción floral (ver Figura 4.7). Los tratamientos que inducen la floración (por ejemplo radiación) incrementarían en *L. mendocina* el transporte de carbohidratos desde las hojas hasta el meristema apical como sucede en *Arabidopsis* (Corbesier et al., 1998; Rolland et al., 2006; King et al., 2008).

Basado en lo anteriormente expuesto, la originalidad de esta tesis resultó en importantes aportes para el entendimiento de los procesos involucrados en el desencadenamiento de la floración en especies perennes herbáceas con comportamiento facultativo. El hecho de que la disponibilidad de radiación, agua y nutrientes modifiquen o intervengan en la regulación del momento de inducción floral y floración a través de la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por planta (TCu) de *L. mendocina* es un avance significativo para cumplir con ese propósito. Concretamente, se demostró una asociación causal entre la adquisición de una tasa de crecimiento umbral por planta (TCu) y el momento de inducción floral que resultó contundente. Además, resulta novedoso el contraste entre estos resultados y algunas líneas previas de investigaciones ecológicas en comunidades naturales, que sugieren que es el tamaño o la adquisición de un tamaño de planta “umbral” (o biomasa mínima) de las especies perennes, el disparador de la inducción floral (Hirose y Kachi, 1982; Lacey, 1986; Klinkhamer et al., 1987; Bazzaz, 1997; Reekie, 1997; Wesselingh et al., 1993; Wesselingh et al., 1997).

Así, se sugiere entonces que el crecimiento en plantas herbáceas perennes a través de la adquisición de la TC modula el momento en que la planta pueden responder a factores universalmente conocidos tales como la temperatura, el fotoperíodo o la vernalización o a los factores clasificados como primarios por Bernier and Prérilleux (2005). Esto se contradice con los paradigmas básicos de la ecofisiología vegetal donde sólo los factores ambientales clásicos (temperatura, vernalización y fotoperíodo) modulan directamente el desarrollo en las plantas anuales.

A su vez, para detectar la causalidad entre la TC y la floración, se recurrió al abordaje del rol de las GA, una línea de estudio que tiene antecedentes pero que nunca se había aplicado en este contexto de escala de observación superior a nivel de planta, relacionada con la adquisición de una TC umbral. En consecuencia, este aporte no solo resulta original para el entendimiento del rol de los reguladores de crecimiento en la floración, sino también para reforzar más categóricamente el descarte de la hipótesis de biomasa mínima, tan sugerida en líneas de investigaciones ecológicas llevada a cabo en poblaciones naturales.

Por otra parte, se recurrió a identificar genes candidatos involucrados en la floración. Uno de ellos está directamente relacionado con las GA y esto constituye un eslabón importante para integrar los mecanismos involucrados. Este aporte es muy relevante, porque son pocos los trabajos que relacionan procesos que se producen en diferentes escalas de observación, y este es uno de ellos. En adición con lo anterior, también se identificó al FT como gen candidato y lo novedoso de este aporte (comparado con estudios anteriores) es que la acción de este gen no se había estudiado en especies autónomas que no responden al fotoperíodo, como es el caso de *L. mendocina*.

En relación con esto último, hasta el momento de la realización de esta tesis la mayoría de los trabajos genéticos relacionaban la expresión del gen FT a través de la “vía fotoperiodica” (Muradov et al., 2002; Cobersier et al., 2007; Jaeger and Wigge, 2007; Mathieu et al., 2007). Los resultados sugieren que en *L. mendocina* el gen FT (regulador del proceso de inducción floral en otras especies tales como *Arabidopsis*, tomate, tabaco, arroz, etc) mantuvo su rol regulatorio del desarrollo, pero adquirió un control de su expresión novedoso, de modo de responder en esta especie a estímulos endógenos como carbohidratos, o ambientales particulares (adquisición de una tasa de crecimiento modulada por acción de factores tales como agua, nutrientes o radiación).

No obstante, esta línea de investigación requiere más estudios en el futuro. Hasta el momento, numerosos trabajos sobre señales florales han indicado que el (FT) y/o GAs serían señales involucradas en estas respuestas (Kania et al., 1997; Bernier et al., 1993; Muradov et al., 2002; Boss et al., 2004; Bernier and Périlleux, 2005; Jasinki et al., 2005, Cobersier et al., 2007. Hisamatsu and King, 2008; Turnbull, 2011). Sin embargo, en *Arabidopsis* existen resultados contradictorios, que indican que las GAs pueden actuar vía FT (Hisamatsu and King, 2008), mientras otros trabajos sugieren que actúan en forma independiente para inducir la floración en condiciones fotoperiodicas inductivas (Jasinki et al., 2005). En este contexto, resta aún por investigar si GAs y FT actúan en forma independiente (en paralelo) o en forma conjunta (en serie) para provocar la transición del estado vegetativo a reproductivo en *L. mendocina*.

Por último, el hecho de que los carbohidratos (por ej. sacarosa) estén involucrados positivamente como una señal a distancia durante la inducción floral resulta también un hecho relevante. Sin embargo, se concluye que se requieren futuras investigaciones para profundizar el entendimiento acerca de su eventual conexión con la activación de genes (GAs y FT) o si tiene un efecto directo sobre el meristema.

5.2 Modelo conceptual

Sobre la base de lo anterior, surge la proposición de un modelo conceptual para explicar los mecanismos que regulan la transición del estado vegetativo a reproductivo en la especie perenne *L. mendocina*. Esta información se integra, además, con conocimientos previos acerca del efecto de la temperatura sobre el desencadenamiento de la floración en esta especie (Windauer et al., 2004).

Así, la información surgida de la tesis que revela que los factores de crecimiento (radiación, agua y nutrientes) condicionan su tiempo a floración, representa un avance significativo clave para proponer el modelo. El mismo asume que para inducirse la floración, las plantas de *L. mendocina* deben adquirir una tasa de crecimiento umbral (TC_u) estipulada para esta especie como 0.01 g.d⁻¹.pl⁻¹, la que está condicionada por los factores del crecimiento (Fig. 5.1). Una vez adquirida, esta TC_u conlleva un aumento en la concentración endógena de carbohidratos en la planta. Estos carbohidratos actuarían como una señal endógena a distancia (se originarían en las hojas) que, mediadas o no por giberelinas y la proteína del gen FT, desencadenaría la transición del estado vegetativo a reproductivo. A su vez, esta cadena de eventos estaría controlada por la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la giberelinas (GA 2-oxidasa, que inactiva las GAs con actividad biológica) y otros como el Flowering locus T (FT) que codifican una proteína que tiene un rol central en la proceso de inducción.

De acuerdo con este modelo, la transición floral ocurriría en respuesta a la llegada a los meristemas de estas señales (sacarosa, GAS, y FT), aunque la información actual no es suficientemente clara para asegurar si lo hacen en forma independiente o no (Figura 5.1 parte a). En el mismo modelo, la limitación de recursos actuaría indirectamente, retrasando la adquisición de la tasa crecimiento umbral (como condición necesaria para desencadenar la floración), lo que conduce a las plantas a explorar ambientes con temperaturas supraóptimas en el momento en el que se tiene que definir la transición floral, impidiendo la floración en esa temporada (Fig. 5.1 parte b). Este modelo contribuye a entender el comportamiento bianual facultativo que presenta la especie en siembras tardías, lo que descartaría cualquier impacto directo tanto de la tasa de crecimiento como de un umbral de biomasa.

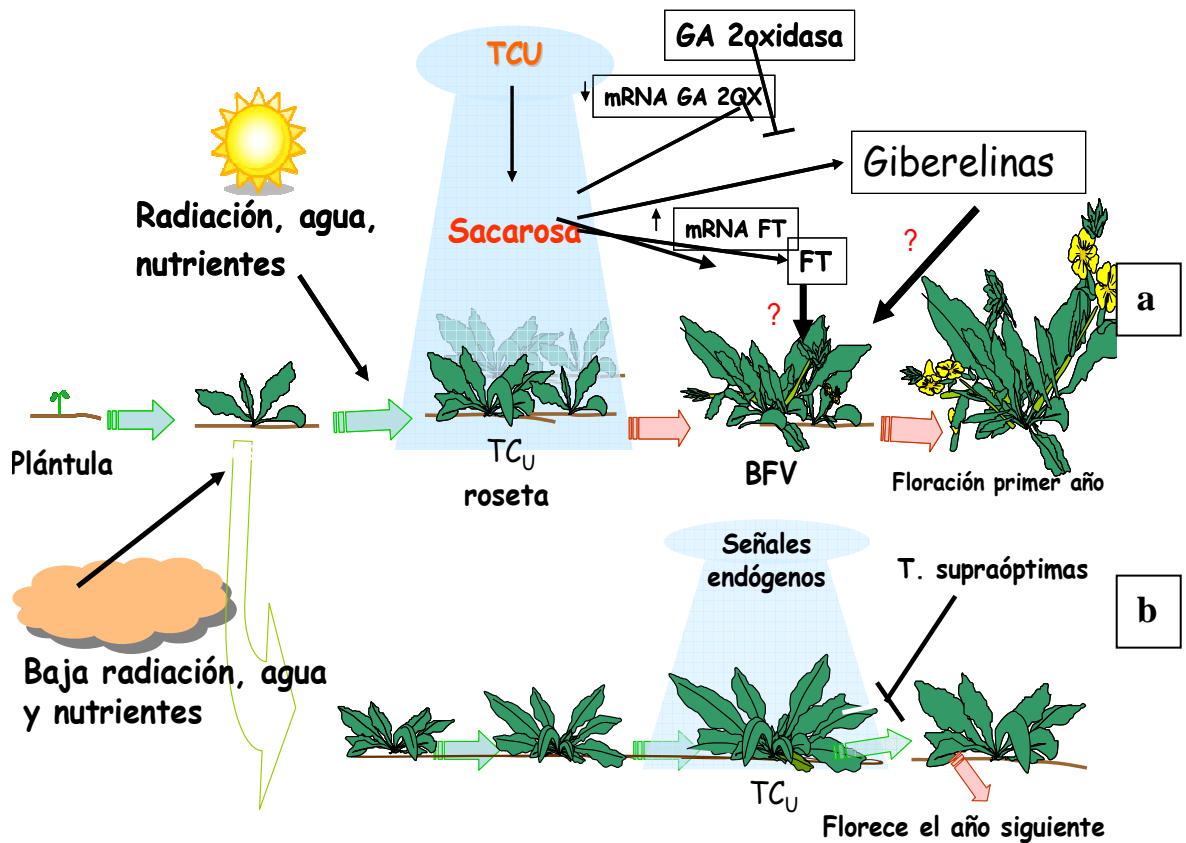


Figura 5.1: Modelo conceptual para explicar el control del desarrollo a floración en *L. mendocina*. El esquema incorpora el efecto de los factores de crecimiento (radiación, agua y nutrientes) sobre la tasa de crecimiento umbral (TC_U), sin limitaciones de estos factores (parte a). La flecha vacía indica el camino a seguir por la planta cuando los factores de crecimiento son escasos (parte b del esquema). Las flechas negras (→) indican el efecto promotor de factores del crecimiento y endógenos sobre la determinación del pasaje al estado reproductivo de las plantas durante el primer año de vida. Las flechas truncadas (—|) indican el efecto inhibitorio de temperaturas supraóptimas y de factores endógenos, ya sea por la acción sobre la proteína codificada por el gen FT o por genes de la vía de GAs. Los signos de interrogación indican la necesidad de seguir investigando si la sacarosa actúa independientemente y directamente o vía GAS y FT durante la transición floral.

5.3 Impacto de la tesis sobre potenciales aplicaciones y futuras líneas de investigación

La información obtenida en esta tesis constituye un paso trascendente para generar un modelo matemático que permita predecir el momento de floración en diferentes ambientes o en distintas fechas de siembra para este tipo de especies. Este podría no solo predecir cuantitativamente las fechas de floración dentro de una misma estación, sino también pronosticar si su comportamiento será anual o bianual. Esta herramienta contribuiría a la disminución de la incertidumbre para un sistema de cultivo de especies con estas características. No obstante, se requieren futuras investigaciones para i) determinar con más precisión la tasa de crecimiento umbral en diferentes cultivos y ii) cuantificar el impacto de los distintos factores de crecimiento y sus posibles interacciones sobre la tasa de crecimiento.

La identificación del rol en esta especie de algunos genes implicados en la transición al estado reproductivo constituye una herramienta importante en la búsqueda de alternativas de mejoramiento para introducir o eliminar la capacidad facultativa de florecer en algunos cultivos. En la medida en que el proceso se encuentre regulado por pocos genes y se conozcan las vías de acción, esto se podría lograr mediante la supresión o sobreexpresión de estos genes. No obstante, resulta trascendente continuar con esta línea de estudio. En este sentido, determinar si genes como GA oxidasa y FT actúan en serie o independientemente en paralelo, parece relevante.

La acción de la sacarosa resultó en una señal positiva para el desencadenamiento de la floración. Aunque parece formar parte de la cadena de transducción originada por la tasa de crecimiento que, en combinación con la acción de las giberelinas, inician el estado reproductivo, resta establecer si efectivamente tienen una conexión directa con la expresión de los genes analizados en esta tesis, o si existen pasos intermedios en los que están involucrados otros genes no analizados. Se requieren nuevas investigaciones para poner a prueba esta hipótesis.

Bibliografía

- Adams, S.R., Pearson, S., Hadley, P. y Patefield W.M. 1999. The effects of temperature and light integral on the phases of photoperiod sensitivity in *Petunia x hybrida*. *Annals of Botany* 83: 263-269.
- Ahrens, J. y Loomis, W. 1963. Floral induction and development in winter wheat. *Crop Science* 3:463-466.
- Amasino, R.M. 1996. Control of flowering time in plants. *Current opinion in Genetic and Development*. 6:480-487.
- Amasino, R.M. 2005. Vernalization and flowering time. *Current opinion in biotechnology* 16: 154-158.
- An, H.L, Roussot, C., Suarez-Lopez P, et al. 2004. CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis*. *Development* 131: 3615–3626.
- Andrade F. H. y Sadras, V. O. 2000. Efectos de la sequía sobre el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Pp 173-206. En: F. H. Andrade y V. O. Sadras, (eds.) Bases para el manejo del maíz, el girasol y la Soja. INTA
- Araki, T. y Komeda, Y. 1993. Flowering in darkness in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 4:201-811.
- Aspinall, D. 1966. Effects of day length and light intensity on growth of barley. IV. Genetically controlled variation in response to daylength. *Australian Journal Biology Science* 19:517-525.
- Aspinall, D. y Husain, I. 1970. The inhibition of flowering by water stress. *Australian Journal of Biological Sciences* 23 (9) : 25-36.
- Ausín, I, C. Alonso-Blanco, y Martínez Zapater, J.M. 2005. Environmental regulation of flowering. *International Journal of Developmental Biology* 49:689-705.
- Azcón-Bieto, J. y Talón M. 2003. Fundamentos de fisiología vegetal. 3ª reimpresión. McGraw-Hill Interamericana. 450 p.
- Bathey, N.H. 2000. Aspects of seasonality. *Journal of Experimental Botany* 52:1769-1780.
- Bazzaz, F.A. 1997. Allocation of resources in plants: State of the science and critical questions., p. 1-37, En F. A. Bazzaz and J. Grace, eds. *Plant resource allocation*, San Diego, California.
- Bernier, G. 1988. The control of floration evocation and morphogenesis. *Biology* 39:175-219.
- Bernier, G. y Perilleux, C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 31:3-16.
- Bernier, G., A. Havelange, C. Houssa, A. Petitjean, y Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5:1147–1155.
- Baskin, J.M. y Baskin, C.C. 1979. Studies on the autoecology and population biology of the monocarpic perennial *Grindelia lanceolata*. *American Midland Naturalist*. 102, 290-299.
- Bertero, H.D. 2001. Effects of photoperiod, temperature and radiation on the rate of leaf appearance in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under field conditions. *Ann. Bot.* 87, 495–502.
- Blázquez, M.A., G.R.O. Nilsson, M.R. Sussman y Weigel, D. 1998. Gibberellins Promote Flowering of *Arabidopsis* by Activating. The LEAFY Promoter. *Plant Cell* 10: 791-800.
- Blázquez, M. y Weigel D. 2000. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 889-892.

- Bloom, T.C., Baskin, J.M. y Baskin, C.C. 2003. Scientific note: Physiological determinants of bolting/flowering in the facultative woodland biennial *Arabis laevigata* var. *laevigata* (Brassicaceae). *Castanea*. Journal of the Southern Appalachian Botanica Society. Mar, 2003.
- Bodson, M., King, R.W., Evans, L.T. y Bernier, G. 1977. The role of photosynthesis in flowering of the long day plant *Sinapsis alba*. *Aust. J. Plant Physiol.* 4, 467-478.
- Boss, P.K. y Thomas, M.R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416: 847-850
- Boss, P.K, Bastow, R.M, Mylne, J.S, y Dean C. 2004. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. *The Plant Cell* 16: 18-31.
- Brouquisse, R., Evrard, A., Rolin, D., Raymond, P. y Roby, C. 2001. Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maize root tips: Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties. *Plant Physiol.* 125: 1485-1498.
- Burd, M., Read, J., Sanson, G.D. y Jaffré T. 2006. Age-size plasticity for reproduction in monocarpic plants. *Ecology* 87(11): 2755-2764.
- Casal, J.J., L.G. Luccioni, K.A. Oliverio, H.E. y Boccalandro, H. 2003. Light, phytochrome signalling and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Photochemistry and Photobiology Science* 2:625-636.
- Castro Marín, I., Loef, I., Bartetzko, L., Searle, I., Coupland, G., Stitt, M y Osuna, D. Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* 233: 539-552
- Colasanti, J. y Sundaresan, V. 2000. Florigen enters the Molecular Age: Long Distance Signals that cause Plants to Flower. *Trends in Biochemical Sciences* 25:236-240.
- Corbesier L, Kustermans G, Perilleux C, Melzer S, Moritz T, Havelange A y Bernier G. 2004. Gibberellins and the floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 122: 152-158.
- Corbesier, L. y Coupland, G. 2005. Photoperiodic flowering of *Arabidopsis*: integrating genetic and physiological approaches to characterization of the floral stimulus. *Plant, Cell and Environment* 28:54-66.
- Corbesier, L. y Coupland, G. 2006. The quest for florigen: a review of recent progress. *Journal of Experimental Botany* 57:3395-3403.
- Corbesier, L., P. Lejeune y Bernier, G. 1998. The role of carbohydrates in the induction of Flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206:131-137.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C. y Coupland G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signalling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030-1033
- Correa, M. 1984. Flora patagónica IV - Dicotiledóneas dialipétalas "Salicaceae a Cruciferae" Colección Científica INTA, Buenos Aires, pp. 469-470.
- Chailakhyan, M.K. 1936. New facts supporting the hormonal theory of plant development. *Dokl. Akad. Nauk SSSR (C. R. Acad. Sci. USSR)* 4:77-81.
- Chouard, P. 1960. Vernalization and its relation to dormancy. *Annual review of Plant Physiology.* 11:191-238.
- Davey, A.J. 1987. Measurement and prediction of flowering in clonal plants. In: Atherton, J.G. (Ed.). *Manipulation of flowering. Proceeding of the 45th Easter School in Agricultural Science* Butterworth, London, pp. 50-55.

- De Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L. y Prins, A.H., 1986. Flowering behaviour of the monocarpic perennial *Cynoglossum officinale* L. *New Phytol.*, 103, 219-229.
- Dennis, E.S., Finnegan, E.J., Bilodeau, P., Chaudhury, A., Genger, R., Helliwell, C.A., Sheldon, C.C., Bagnall, D.J., y Peacock, W.J. 1996. Vernalization and the initiation of flowering. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7:441-448.
- Dickens, C.W. y van Staden, J. 1988. The in vitro flowering of *Kalanchoë blossfeldiana* Poellniz. I. Role of culture conditions and nutrients. *Journal of Experimental Botany* 39:461– 471.
- Dierig, D.A., Adam, N.R., Mackey, B.E., Dahlquist, G.H., Coffelt, T.A. 2006. Temperature and elevation effects on plant growth, development, and seed production of two *Lesquerella* species. *Industrial Crops and Product* 24: 17–25.
- Eriksson, S., Bohlenius, H., Moritz, T. y Nilsson, O. 2006. GA4 is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and Arabidopsis floral initiation. *The plant Cell* 18: 2172-2181.
- Erwin, J. 2007. Chapter 1: Factors Affecting Flowering in Ornamental Plants Pp. 7-48. en Anderson, N.O. (ed). 'Flower Breeding and Genetics Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century'. (Springer Netherlands..
- Fernie, A.R., Roessner, U. y Geigenberger, P. 2001 . The sucrose analog alatinose leads to a stimulation of sucrose degradation and starch synthesis when supplied to discs of growing potato tubers. *Plant Physiology* 125:1967–1977.
- Finkelstein, R.R. y Zeevaart, J.A.D. 1994. Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. Pp. 523–553. En: Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R., (Eds.), *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Garner, H. y Allard. 1923. Further studies in photoperiodism: response of the plant to relative length of day. *Journal of Agricultural Research* 23:871-920.
- Gimenez , R. 2010. Bases el control del comportamiento anual o bienal en el cultivo oleaginoso *Oenothera biennis*. Magister de la Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires
- Gocal, G.F., C.C. Sheldon, F. Gubler, T. Moritz, D.J. Bagnall, C.P. MacMillan, S.F. Li, R.W., Parish, E.S. Dennis, D. Weigel, y R.W. King. 2001. GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* 127:1682–1693.
- Graham, I.A., Denby, K.J., y Leaver, C.J. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* 6: 761–772.
- Gross, K.L. 1981. Prediction of fate from rosette size in 4 biennial plant species: *Verbascum thapsus*, *Oenothera biennis*, *Daucus carota* and *Tragopogon dubius*. *Oecologia*, 20, 197-201.
- Harper, J.L. y Ogden, J. 1970. The Reproductive Strategy of Higher Plants: I. The Concept of Strategy with Special Reference to *Senecio Vulgaris* L. *Journal of Ecology* 58(3): 681-698.
- Havelange, A., Lejeune, P. y Bernier G. 2000. Sucrose/cytokinin interaction in *Sinapis alba* at floral induction: a shoot-to-root-to-shoot physiological loop. *Physiologia Plantarum* 109:343-350.
- Hedden, P. y Phillips, A.L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Science* 5: 523–530
- Heide, O.M. 1994. Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist* 128: 347-362.

- Heyer, A.G., Raap, M., Schroeer, B., Marty, B. y Willmitzer, L. 2004. Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 39:161-169.
- Hirose, T. y Kachi, N. 1982. Critical plant size for flowering in biennials with special reference to their distribution in a sand dune system. *Oecologia* 55:281-284.
- Hisamatsu, T. y King, R. W. 2008. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of Experimental Botany* 59 (14): 3821–3829.
- Hisamatsu, T., King, R.W., Helliwell, C.A. y Koshioka, M. 2005. The involvement of gibberellin 20-oxidase genes in phytochrome regulated petiole elongation of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 1106–1116.
- Hodges, T. y Dorainswamy P. 1979. Crop phenology Literature Review for Corn, Soybean, Wheat, Barley, Sorghum, Rice and Sunflower. Tech. Memo. LEC-13722,JSC-16088.
- Hodges, T. 1982. Second Generation Yield Models Literature Review. Ag RISTARS Tech. Rep., YM-12-04306, JSC- 18245.
- Huang, T., Böhlenius, H., Eriksson, S., Parcy, F., y Nilsson, O. 2005. The mRNA of the *Arabidopsis* gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309: 1694–1696
- Jaeger, K.E. y Wigge, P.A. 2007. FT protein acts as a long range signal in *Arabidopsis*. *Current biology* 17, 1050-1054.
- Jang, J.-C., y Sheen, J. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craff, J., Hay, A., Wolley, L., Rieu, L., Phillips, A., Hedden, P. y Tsiantis, M. 2005. KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and giberellin activities. *Current Biology* 15: 1560- 1565.
- Kelly, D. 1985. On strict and facultative biennials. *Oecologia* 67: 292-294.
- Kinet, J.M. 1993. Chapter 7: Environmental, chemical, and genetic control of flowering. *Horticultural Reviews* 15: 279-305.
- King, R.W. y Zeevaart, J.A.D. 1973. Floral stimulus movement in *Perilla* and flower inhibition caused by noninduced leaves. *Plant Physiology* 51:727–738.
- King, R.W. y Evans, L.T. 1977. Inhibition of Flowering in *Lolium temulentum* L. by water stress: A role of Abscisic acid. *Australian journal of Plant Physiology* 4(2): 225-233.
- King, R.W. y Evans, L.T. 2003. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the “florigen” black box. *Annuals Reviews of Plant Biology* 54: 307–328
- King, R.W., Moritz, T., Evans, L.T., Martin, J., Andersen, C.H., Blundell. C., Kardailsky I. y Chandler, P.M. 2006. Regulation of flowering in the long-day grass, *Lolium temulentum* L., by gibberellins and the gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *Plant Physiology* 141, 498-507.
- King, R.W., Hisamatsu, T., Goldschmidt, E.E. y Blundell, C. 2008a. The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and far- red photoresponse independently regulate flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. *Journal of Experimental Botany* 59:3811-3820.
- Klein, D. y Stitt, M. 1998. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of RBCS and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell cultures. *Planta* 205: 223–234.
- Klinkhamer, P.G.L., de Jong, T.J. y Meelis, E. 1987. Life-history variation and the control of flowering in short-lived monocarps. *Oikos* 49:309-314.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:509-540.

- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J. y Soppe, W. 1998. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 345-370.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C., y Stitt, M. 1993. Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the sink regulation of photosynthesis. *Plant Journal* 3: 817-828.
- Lacey, E.P. 1986. Onset of reproduction in plants: size versus age-dependency. *Trends Ecol. Evol.* 1:72-75. *Trends in Ecology & Evolution*
- Lang, A. 1965. Physiology of flower initiation, p. 1380-1536. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. XV. Springer, Berlin.
- Lee, D.J. y Zeevaart, J.A.D. 2007. Regulation of gibberellin 20-oxidase1 expression in spinach by photoperiod. *Planta* 226:35-44.
- Lee, D.J. y Zeevaart, J.A.D. 2005. Molecular cloning of GA 2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 138:243-254
- Levy, Y.Y. y Dean, C. 1998. The transition to flowering. *Plant cell* 10:1973-1989.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J.P. y Eshed, Y. 2006. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103:6398-6403.
- Major, D. 1980. Photoperiod response characteristics controlling flowering of nine crop species. *Canadian Journal of Plant Science* 60:777-784.
- Major, D., y Kiniry, J. 1991. Predicting daylength effects on phenological processes. *Predicting Phenology* CRC Press, Boca Raton, USA.
- Major, D., y Johnson, D. 1977. A review of the effect of daylength and temperature on development of soybeans (*Glycine max* (L) Merrill). Agriculture Canada Research Station, Lethbridge, Alberta.
- Major, D., Johnson, D., Tanner, J. y Anderson, L. 1975. Effects of daylength and temperature on soybean development. *Crop Science* 15:174-185.
- Marschner, M. 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. Academic Press, London, UK
- Martin, T., Hellman, H., Schmidt, R., Willmitzer, L. y Frommer, W.B. 1997. Identification of mutants in metabolically regulated gene expression. *Plant Journal* 11: 53-62.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F., y Schmid, M., 2007. Export of Ft protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* 17, 1055-1060.
- Meilan, R. 1997. Floral induction in woody angiosperms. *New Forests* 14: 179-202.
- Meng, X., Muszynski, M.G. y Danilevskaya, O.N. 2011. The FT-like ZCN8 gene functions as a floral activator and is involved in photoperiod sensitivity in maize. *The Plant Cell* 23:942-960.
- Metzger, J.D. 1995. Hormones and reproductive development. Pp 617-648. en Davies, P.J. (ed.) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Michaels, S. y Amasino, R. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11: 949-956
- Miller, G., Suzuki, N., Rizhsky, L., Hegie, A., Koussevitzky, S. y Mittler, R. 2007. Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 144:1777-1785

- Monteith, J.L. 1981. Climatic variation and the growth of crops. Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society 107:749-774.
- Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G. y Lee I. 2003. The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. The Plant Journal 35:613-623.
- Morris, D.A. y Arthur, E.D. 1985. Effects of gibberellic acid on patterns of carbohydrate distribution and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris*. Physiologia Plantarum 65:257-262.
- Morrison, M.J., McVetty, P.B.E. y Shaykewich, C.F. 1989. The determination and verification of a baseline temperature for the growth of Westar summer rape. Canadian Journal Plant Science 69:455-464.
- Mouradov, A., Cremer, F. y Coupland, G. 2002. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. Plant Cell, S111-S130.
- Mutasa-Göttgens, E. y Hedden, P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. Journal of Experimental Botany 60, 1979-1989.
- Myers, L., Chistian, K.R. y Kirchner, R.J. 1982. Flowering responses of 48 lines of oilseed rape (*Brassica* spp.) to vernalization and daylength. Australian Journal Agricultural Research 33:927-936.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M. y Araki, T. 2008. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. Plant Cell Physiology 49: 1645–1658.
- Ohto, M.-A., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T. y Nakamura, K. 2001. Effects of Sugar on Vegetative Development and Floral Transition in *Arabidopsis*. Plant Physiology 127:252-261.
- Périlleux, C., y Bernier, G. 2002. The control of flowering: Do genetical and physiological approaches converge? Pp. 1–32 en O'Neill, S.D. y Roberts, J.A.(eds.) Plant Reproduction, Annual Plant Reviews, Vol. 6, Sheffield, UK: Sheffield Academic Press.
- Pfeifer, M., Heinrich, W. y Jetschke, G. 2006. Climate, size and flowering history determine flowering pattern of an orchid. Bot. J. Linn Soc 151, 511–526.
- Pharis, R.P. y King, R.W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants Annual Reviews of Plant Physiology, 36: 517-568.
- Pharis, R.P., L.T. Evans, R.W. King, y Mander L.N. 1987. Gibberellins, endogenous and applied, in relation to flower induction in the long-day plant *Lolium temulentum*. Plant Physiology 84:1132-138.
- Pineiro, M., Gomez-Mena, C., Schaffer, R., Martinez-Zapater, J.M. y Coupland G. 2003. EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodelling factors and regulates flowering in *Arabidopsis* by repressing FT. The Plant Cell 15:1552-1562.
- Ploschuk, E.L., Windauer, L. y Ravetta, D. 2001. Potential value of traits associated with perennial habit in the development of new oil-seed crops for arid lands. A comparison of *Lesquerella fendleri* and *L. mendocina* subjected to water stress. Journal of Arid Environmental 47, 373-386.
- Ploschuk, E. L. 2005. Influencia de la perennidad y la dinámica floral sobre el costo reproductivo en *Lesquerella* sp. - Potencial cultivo oleaginoso para zonas áridas de secano. Escuela para Graduados de la Facultad de Agronomía. Argentina. 85 pp., Escuela para Graduados de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

- Ploschuk, E.L., G.A. Slafer y Ravetta, D. 2005 Reproductive allocation of biomass and nitrogen in annual and perennial *Lesquerella* crops. *Annals of Botany* 96: 127-135.
- Ploschuk, E. y Windauer L.B. 2010. Development of New Perennial Oil-Crops for Marginal Environments: Productivity of *Lesquerella mendocina* under Different Nitrogen Availability. *Argentinean Plant Science and Biotechnology I. The Americas Journal of Plant Science & Biotechnology* 3:93-98.
- Poethig, R.S. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923-930.
- Prins, A.H, Vrieling, K, Klinkhamer, P.G.L. y de Jong T.J. 1990. Flowering behaviour of *Senecio jacobaea*: effects of nutrient availability and size-dependent vernalization. *Oikos* 59: 284-252.
- Rawson, H.M. 1993. Radiation effects on rate of development in wheat grown under different photoperiods and high and low temperatures. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 719-727.
- Reekie, E. 1997. Trade-off between reproduction and growth. Influence time of reproduction., Pp. 191-209, en Bazzaz, F. A y. Grace, J. (eds.) *Plant resources allocation*. Academic Press, San Diego, CA.
- Reekie, E., Parmiter, D., Zebian, K. y Reekie, J. 1997 Trade-offs between reproduction and growth influence time of reproduction in *Oenothera biennis*. *Canadian Journal of Botany* 75, 1897-1902.
- Reeves, P.H. y Coupland, G. 2000. Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 37-42.
- Richards R. A. 1991. Crop improvement for temperate Australia: future opportunities. *Field Crops Research* 26: 141-169.
- Rieu, I., Eriksson, S., Powers, S., et al. 2008. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* 20: 2420-2436.
- Ritchie, J.T. y NeSmith, D.S. 1991. Temperature of crop development., p. 5-29, En J. Hanks and J. T. Ritchie, eds. *Modeling plant and soil systems*. , Vol. 31, Madison, WI
- Roberts, E.H., Summerfield, R., Ellis, R. y Stewart, K. 1988. Photothermal time for flowering in lentils and the analysis of potential vernalization responses. *Annals of Botany* 61:29-39.
- Roetheli, J.C., Carlson, K.D., Kleiman, R., Thompson, A.E., Dierig, D.A., Glaser, L.K., Blase, M.G. y Goodel J. . 1991. *Lesquerella* as a source of hydroxy fatty acids for industrial products. *Growing industrial material series*. USDA/CSRS, Washington, DC.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion of Plant Biology* 2: 198–206.
- Roldan, M., y Martinez Zapater, . J.M. 2000. Floración y su control ambiental., Pp. 403-417 en Azcon-Bieto. J.y Talón,M. (eds.) *Fundamentos de la Fisiología Vegetal*. Mc Graw-Hill. Interamericana, Madrid
- Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz-García,L., Salinas,J., Martinez-Zapater, J.M. y Martín-Trillo, M. 1997. Effect of darkness and sugar availability to the apex on morphogenesis and flowering time of Arabidopsis. *Flowering Newsletter* 24:18–24.

- Roldan, M., C. Gomez-Mena, L. Ruiz-Garcia, J. Salinas, y Martinez-Zapater J.M. 1999. Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes dark-morphogenesis and flowering in Arabidopsis. *Plant Journal* 20:581–590.
- Rolland, F., Moore, B. y Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* 14 Suppl:S185-S205.
- Rolland, F., E. Baena-Gonzalez, y Sheen, J. 2006. Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *The Annual Review of Plant Biology* 57:675-709.
- Russell, G. y Ellis, R. 1988. The relationship between leaf canopy development and yield of barley. *Annals of applied Biology* 113:357-374.
- Sachs, R.M. y Hackett, W.P. 1983. Sucrose-sink relationship in flowering, p. 263-272, En W. J. Meudt, ed. *Strategies of Plant Reproduction*. Granada, Allenheld, Osmun.
- Sakamoto, T., Kobayashi, M., Itoh, H., Tagiri, A. Kayano, T., Tanaka, H., Iwahori, S. y Matsuoka, M. 2001. Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiology* 125:1508-1516.
- Salisbury, F.B. y Ross, C. 1994. *Growth Responses to temperature*. 4a Edition ed. Wadsworth Publishing Company, California.
- Samach, A., Onouchi, H., Gold, S., Ditta, G.S., Schwarz-Sommer, Z., Yanofsky, M.F. y Coupland, G. 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of Arabidopsis. *Science* 288: 1613–1616
- Scholander, P., Hammel, H., Bradstreet, E. y Hemmingsen, E. 1965. Sap pressure in vascular plants. Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339-346.
- Shalit, A., Rozman, A., Goldshmidt, A., Alvarez, J.P., Bowman, J.L., Eshed. Y. y Lifschitz, E. 2009. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 8392-8397.
- Searle, I. y Coupland, G. 2004. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO Journal* 23:1217-1222.
- Seo, P.J., Ryu, J., Kang, S.K. y Park CM. 2011. Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal* 65:418-429.
- Sheen, J., Zhou, L. y Jang, J.C. 1999. Sugars as signalling molecules. *Current Opinion of Plant Biology* 2: 410–418.
- Sheldon, C.C., Burn, J.E., Perez, P.P., Metzger, J., Edwards, J.A., Peacock, W.J. y Dennis, E.S. 1999. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell* 11:445-458.
- Simpson, G.G. y Dean, C. 2002. Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296:285-289.
- Slafer, G. y Rawson, H.M. 1995. Base and optimum temperatures vary with genotype and stage of development in wheat. *Plant Cell Environmental* 18:671-679.
- Slafer, G.A. y Rawson, H.M. 1994. Does Temperature Affect Final Numbers of Primordia in Wheat. *Field Crops Research* 39:111-117.
- Summerfield, R., E. Roberts, R.H. Ellis y Law, R.J. 1991. Towards in reliable prediction of time to flowering in six annual crops. I. The development of simple models for fluctuating field environments. *Experiment agriculture* 27:11-37.

- Syvertsen, J. P. y Lloyd, J. J. 1994. Citrus, in Handbook of Environmental Physiology of Fruit Crops. . Pp. 691-724 en Schaff erB. Y .Andersen, P.C.(eds.) Vol. II. Subtropical and Tropical Crops.
- Takada, S. y Goto, K. 2003. TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. The Plant Cell 15:2856-2865.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 1998. Chapter 24: The control of flowering. En `Plant physiology 2nd edition´.Sinauer Associated, Inc. Sunderland,Massachusetts.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong , H.L., Yokoi, S y Shimamoto K. 2007.Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. Science 316:1033–1036.
- Tan, F.-C. y Swain, S.M. 2006. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants. Physiologia Plantarum 128: 8-17.
- Teper-Bamnlker, P. y Samach, A. 2005 The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves. Plant Cell 17: 2661–2675.
- Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G. y Colot, V. 2007. Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. PLoS Genetics 3: 855–866.
- Turck F, Fornara F, y Coupland G. 2008. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. Annual Review of Plant Biology 59, 573–594
- Turnbull, C. 2011. Long- distanceregulation of flowering time. Journal of Experimental Botany 62: 4399-4413.
- Wallace, D.H. 1985. Physiological genetics of plant maturity, adaptation, and yield. Plant breeding Reviews 3:21-67.
- Weigel, D. 1995. The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis. Annual Review of Genetics 438:1172-1175.
- Weller, J.L., Murfet, I.C. y Reid, J.B. 1997. Pea mutants with reduced sensitivity to far-red light define an important role for phytochrome A in day-length detection. Plant Physiology 114: 1225-1236.
- Wesselingh, R.A., Klinkhamer, P.G.L., de Jong T.J., y Boorman, L.A. 1997. Threshold size for flowering in different habitats: Effects of size-dependent growth and survival. Ecology 7:2118-2132.
- Wesselingh, R.A. y De Jong, T.J. 1995. Bidirectional selection on threshold size for flowering in *Cynoglossum officianale* (hound´s tongue). Heredity 74: 415-424.
- Wilkie, J.D, Sedgley, M. y Olesen, T . 2008. Regulation of floral initiation in horticultural trees. Journal of Experimental Botany 59(12): 3215-3228.
- Wilson, R.N., Gage, D.A. y Zeevaart, J.A.D. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. Plant Physiology 100: 403-406.
- Windauer, L. 2002. Puesta en cultivo de especies del género Lesquerella: Influencia de factores ambientales sobre el desarrollo. Magister Scientiae Thesis, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Windauer, L., Slafer, G.A. y Ravetta, D. 2004. Phenological responses to temperature of an annual and a perennial Lesquerella species. Annals of Botany 94:139-144.
- Windauer, L., Slafer, G.A., Ravetta,D. y Benech-Arnold, R.L.. 2006. Environmental control of phenological development in two Lesquerella species. Field Crops Research 96:320-327.

- Windauer, L.B., Ploschuk, E.L. y Benech Arnold, R.L. 2007. ¿Es el cambio de tasa de crecimiento el factor determinante de la inducción floral en *Lesquerella mendocina*? Workshop Internacional: "Eco Fisiología Vegetal Aplicada al Estudio de la Determinación del Rendimiento y la Calidad de los Cultivos de Granos" Primer Encuentro Red Raíces de Ecofisiología SECyT. 6 y 7 de septiembre de 2007. Mar del Plata. Argentina.
- Wright, D. y L. Hedges. 1987. Relationships between time, temperature, daylength and development in spring barley. *Journal of agricultural Science* 109:365-373.
- Wu, K., Li, L., Gage, D.A. y Zeevaart, J.A.D. 1996. Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiology* 110: 547–554.
- Xu, Y.L., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D. 1997. Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana*. Effects of photoperiod on the GA4 and GA5 loci. *Plant Physiology* 114: 1471–1476.
- Yegappan, T. M., Paton, D. M., Gates, C. T. y Müller, W. J. 1980. Water Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.): I. Effect on Plant Development. *Annals of Botany* Volume 46: 63-68
- Zeevaart, J.A.D. 1982. Transmission of the floral stimulus from a long-short-day plant, *Bryophyllum daigremontianum*, to the short-long-day plant *Echeveria harmsii*. *Annals of Botany* 49: 549–552.
- Zeevaart, J.A.D. y Gage D.A. . 1993. Ent-kaurene biosynthesis is enhanced by long-day plants *Spinacia oleracea* L. and *Agrostemma githago* L. *Plant Physiology* 101:25-29.
- Zeevaart, J.A.D. 2006. Florigen coming of age after 70 years. *The Plant Cell* 18:1783-1789.
- Zhou, L., Jang, J.-C., Jones, T.L. y Sheen J.,. 1998. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10294–10299.