



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio del papel de factores de transcripción de las
familias WRKY y MYB en la longevidad de semillas de
Arabidopsis

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Olmos Alonso, Alicia

Tutor/a: Niñosles Rodenes, Regina

Cotutor/a: Gadea Vacas, José

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Estudio del papel de factores de transcripción de las familias WRKY y MYB en la longevidad de semillas de *Arabidopsis*

Trabajo Final de Grado

Universitat Politècnica de València – ETSEAMN – Biotecnología

2023-2024

Realizado por: Alicia Olmos Alonso

Dirigido por: Regina Niños Rodenes y José Gadea Vacas

Valencia, abril de 2024

Título: Estudio del papel de factores de transcripción de las familias WRKY y MYB en la longevidad de semillas de Arabidopsis.

Resumen:

Las semillas constituyen el principal modo de propagación de las plantas y suponen por sí mismas una esencial fuente de alimento, por lo que el estudio de factores que determinen su calidad tiene no sólo importancia para el mantenimiento de la biodiversidad sino también interés agronómico. Las semillas van perdiendo gradualmente viabilidad durante el almacenamiento y ese “envejecimiento” depende tanto de los factores ambientales como genéticos. En los últimos años, en este grupo hemos identificado varios mutantes de Arabidopsis que presentan una longevidad de semilla alterada. Por ejemplo, el mutante *tt7*, afectado en una enzima de biosíntesis de flavonoides, acumula Kaempferol-3-rhamnósido (K-3R) en la cubierta de la semilla, compuesto que altera su desarrollo y, consecuentemente reduce su longevidad. Para tratar de determinar los mecanismos moleculares por lo que el K-3R condiciona el correcto desarrollo de la cubierta de la semilla, se hizo un RNAseq comparando el transcriptoma de semillas de plantas control y semillas mutantes que acumulaban dicho compuesto. Los resultados del análisis transcriptómico muestran una expresión mayor en el mutante de varios factores de transcripción de tipo WRKY, mientras que factores de tipo MYB se expresan en menor medida. Este TFG es una primera aproximación para estudiar la implicación de los factores de transcripción (FT) pertenecientes a estas familias génicas en el desarrollo de la cubierta de la semilla y en su longevidad.

Abstract:

Seeds are the main way in which plants propagate and are an essential source of food. The study of factors that determine their quality is not only important for the maintenance of biodiversity, but also of agronomic interest. Seeds gradually lose viability during storage and this “ageing” depends on both environmental and genetic factors. In recent years, in this group we have identified several Arabidopsis mutants with altered seed longevity. For example, the *tt7* mutant, affected in a flavonoid biosynthesis enzyme accumulates Kaempferol-3-rhamnoside (K-3R) in the seed coat, a compound that alters its development and, consequently, reduces its longevity. To try to determine the molecular mechanisms by which K-3R conditions the correct development of the seed coat, an RNAseq was performed comparing the transcriptome of seeds from control plants and mutant seeds that accumulate this compound. The results of the transcriptomic analysis show a higher expression in the mutant of several WRKY-type transcription factors (TF), while MYB-factors are expressed to a lesser extent. This TFG is a first approach to study the involvement of TFs belonging to these gene families in seed coat development and longevity.

Palabras clave:

Longevidad de semillas, cubierta de la semilla o testa, permeabilidad, envejecimiento acelerado, WRKY, MYB.

Keywords:

Seed longevity, seed coat or testa, permeability, accelerated ageing, WRKY, MYB.

Autora del TFG: Alicia Olmos Alonso

Localidad y fecha: Valencia, 15 abril 2024

Tutora Académica: Dra. Regina Niños Rodenes

Cotutor: Dr. José Gadea Vacas

Debido a la importancia de las semillas en la alimentación, este TFG, se ajusta al objetivo de desarrollo sostenible (ODS) 2: Hambre cero, que tiene como objetivo principal crear un mundo libre de hambre para 2030, mediante metas como mantener la diversidad genética de las semillas. Se relaciona también en menor medida con el ODS15: Vida de ecosistemas terrestres, colaborando para detener la pérdida de biodiversidad.

| Objetivos de Desarrollo Sostenibles | Alto | Medio | Bajo | No procede |
|---|-------------|--------------|-------------|-------------------|
| ODS 1. Fin de la pobreza. | | | | ✓ |
| ODS 2. Hambre cero. | ✓ | | | |
| ODS 3. Salud y bienestar. | | | | ✓ |
| ODS 4. Educación de calidad. | | | | ✓ |
| ODS 5. Igualdad de género. | | | | ✓ |
| ODS 6. Agua limpia y saneamiento. | | | | ✓ |
| ODS 7. Energía asequible y no contaminante. | | | | ✓ |
| ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico. | | | | ✓ |
| ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras. | | | | ✓ |
| ODS 10. Reducción de las desigualdades. | | | | ✓ |
| ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles. | | | | ✓ |
| ODS 12. Producción y consumo responsables. | | | | ✓ |
| ODS 13. Acción por el clima. | | | | ✓ |
| ODS 14. Vida submarina. | | | | ✓ |
| ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres. | | ✓ | | |
| ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas. | | | | ✓ |
| ODS 17. Alianzas para lograr objetivos. | | | | ✓ |

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, quiero agradecer a todas las personas del laboratorio con las que he compartido estos últimos meses. Siempre he dicho que soy una persona afortunada... pero “caer” en este laboratorio ha sido más que suerte: un regalo especial.

A mis tutores: Pepe, Regina, por poder contar siempre con su ayuda y consejo... Por tenerme siempre paciencia ante las dudas de una pequeña ignorante. Por no asustarse de mis ideas de terremoto, y por hacer del laboratorio un ambiente agradable, cercano y amistoso.

A Susana, por ayudarme tantísimo cada día, por hacerme reír cada vez que salía algo bien o algo mal, por “arriesgar su mano” en los momentos más críticos, por enseñarme todos los trucos del laboratorio... Te deseo como siempre: “zuerte, maeztra”.

A Sepideh, por su habitual amabilidad, trato cariñoso, paciencia y por hacernos sentir como en casa.

A Eugenia (y a su mate inseparable), por su alegría contagiosa, por enseñarme durante los primeros momentos y tener paciencia conmigo... Y por ser la persona más bromista que he conocido en mi vida... ¡te devolveré alguna!

En segundo lugar, quiero agradecer a mis compañeras de piso y amigas, que me han ayudado muchísimo estos años. Han sido para mí un apoyo muy grande para no tirar nunca la toalla y seguir adelante.

Por último, quiero agradecer a mis hermanas y mis padres, por ayudarme a aprender que lo importante en la vida es no rendirse, y que, si algo no sale, siempre hay una nueva oportunidad para empezar de nuevo.

Muchísimas gracias por todo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. Importancia de las semillas en agricultura y alimentación..... | 1 |
| 2. La semilla de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 1 |
| 2.1. Estructura y capas de la cubierta..... | 2 |
| 2.2. Etapas de desarrollo de la semilla..... | 3 |
| 3. Longevidad de semillas..... | 4 |
| 3.1. Concepto e importancia..... | 4 |
| 3.2. Métodos de estudio..... | 4 |
| 3.3. Importancia de la cubierta de la semilla para su longevidad..... | 5 |
| 3.3.1. Papel de los poliésteres lipídicos en la longevidad de semilla..... | 5 |
| 3.3.2. Papel de los flavonoides en la longevidad de semillas..... | 6 |
| 4. Factores de transcripción de la familia WRKY..... | 7 |
| 5. Factores de transcripción de la familia MYB..... | 8 |
| 6. Técnicas de clonaje modular..... | 8 |
| 6.1. Domesticación..... | 9 |
| 6.2. Ensamblaje multipartito de una unidad transcripcional..... | 9 |
| 6.3. Ensamblaje binario..... | 10 |
| 7. Antecedentes del presente TFG..... | 10 |
| 7.1. RNAseq de testa de <i>tt3tt7</i> | 11 |
| OBJETIVOS: | 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 1. Material biológico..... | 14 |
| 1.1. Material vegetal..... | 14 |
| 1.2. <i>Escherichia coli</i> | 14 |
| 1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 14 |
| 2. Manipulación y crecimiento de <i>A. thaliana</i> | 14 |
| 2.1. Esterilización de semillas..... | 14 |
| 2.2. Cultivo <i>in vitro</i> | 14 |
| 2.3. Cultivo en invernadero..... | 15 |
| 2.4. Recolección y almacenamiento de semillas..... | 15 |
| 3. Cultivo y manipulación de microorganismos..... | 15 |
| 3.1. Manipulación y crecimiento de <i>E. coli</i> | 15 |
| 3.2. Preparación y transformación de células competentes..... | 15 |
| 3.3. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> | 16 |
| 3.4. Vectores de clonación y transformación empleados..... | 16 |
| 4. Transformación de <i>A. thaliana</i> | 17 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5. | Técnicas de biología molecular | 17 |
| 5.1. | Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 17 |
| 5.2. | Digestión enzimática de ADN plasmídico | 17 |
| 5.3. | Electroforesis en gel de agarosa | 18 |
| 5.4. | Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa..... | 18 |
| 5.4.1. | Extracción de RNA de semilla y tratamiento con DNAsa | 18 |
| 5.4.2. | Extracción de RNA de hoja senescente..... | 18 |
| 5.4.3. | Síntesis de cDNA | 18 |
| 5.5. | qRT-PCR..... | 19 |
| 5.5.1. | Oligonucleótidos cebadores para qRT-PCR..... | 19 |
| 5.5.2. | Condiciones de la qRT-PCR | 19 |
| 6. | Técnicas de clonaje modular GoldenBraid (GB)..... | 19 |
| 6.1. | Domesticación de secuencias (nivel 0)..... | 19 |
| 6.2. | Ensamblaje multipartito (nivel 1)..... | 21 |
| 6.3. | Ensamblaje binario (nivel 2) | 21 |
| 7. | Caracterización de semillas | 22 |
| 7.1. | Ensayo envejecimiento acelerado (CDT)..... | 22 |
| 7.2. | Ensayo de permeabilidad..... | 22 |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 1. | Caracterización de mutantes de pérdida de función en factores de transcripción de la familia MYB | 23 |
| 1.1. | Estudio de la expresión <i>in silico</i> | 23 |
| 1.2. | Ensayo de envejecimiento acelerado (CDT) | 24 |
| 1.1. | Ensayo de toma de tetrazolio..... | 25 |
| 2. | Caracterización de mutantes de pérdida de función en factores de transcripción de la familia WRKY | 27 |
| 2.1. | Estudio de expresión <i>in silico</i> | 27 |
| 2.2. | Ensayo de envejecimiento acelerado (CDT) | 28 |
| 2.3. | Ensayo de toma de tetrazolio..... | 30 |
| 3. | Análisis de la expresión de posibles genes dianas del factor de transcripción WRKY33 en <i>wrky33</i> | 31 |
| 3.1. | Búsqueda de posibles dianas del factor de transcripción WRKY33 | 31 |
| 3.2. | Diseño de cebadores para qRT-PCR | 31 |
| 3.3. | qRT-PCR..... | 33 |
| 3.3.1. | Controles negativos..... | 33 |
| 3.3.2. | Curvas de melting (T _m) | 33 |
| 3.3.3. | Análisis de la expresión de genes dianas de WRKY33..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 4. Generación de construcciones y transformación de <i>A. thaliana</i> para la obtención de líneas transgénicas que sobreexpresen WRKY33 y WRKY45 | 34 |
| 4.1. Diseño de las construcciones a obtener mediante GB | 34 |
| 4.1.1. Promotor constitutivo: ubiquitina..... | 35 |
| 4.1.2. Promotor específico de cubierta de semilla junto con marcador GUS..... | 35 |
| 4.2. Domesticación | 35 |
| 4.3. Ensamblaje multipartito: digestión de comprobación de correcto ensamblaje <i>in silico</i> y en bancada..... | 37 |
| 4.4. Ensamblaje binario: digestión y PCR colonia | 37 |
| 4.5. Transformación de <i>A. thaliana</i> : “ <i>floral dipping</i> ” | 38 |
| CONCLUSIONES | 39 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |
| ANEXOS | 49 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tejidos principales de la semilla de <i>A. thaliana</i> | 2 |
| Figura 2. Sección longitudinal de la cubierta de la semilla. Capas del tegumento interno y tegumento externo | 2 |
| Figura 3. Principales acontecimientos que tienen lugar durante el desarrollo del embrión: morfogénesis y maduración. | 3 |
| Figura 4. Parámetros más relevantes que determinan la longevidad de las semillas | 5 |
| Figura 5. Ruta de síntesis de los flavonoides | 6 |
| Figura 6. Formación de la barrera apoplástica de la raíz por WRKY33 a través de CYP94B1 para conferir tolerancia a la sal | 8 |
| Figura 7. Regulación de componentes de la pared celular secundaria mediada por MYB | 8 |
| Figura 8. Domesticación de partes básicas..... | 9 |
| Figura 9. Esquema con las distintas categorías (A1-C1) de GB. | 9 |
| Figura 10. Ensamblaje multipartito de una unidad transcripcional (GB 2.0 Users Manual). P: promotor, CDS: secuencia codificante, T: terminador..... | 10 |
| Figura 11. Ensamblaje de dos unidades transcripcionales | 10 |
| Figura 12. Categorías funcionales enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en <i>tt3tt7</i> frente a WT. | 11 |
| Figura 13. Vector pUPD2. | 16 |
| Figura 14. Expresión <i>in silico</i> de los FT de la familia MYB | 23 |
| Figura 15. Ensayo CDT en semillas de mutantes MYB. Porcentaje de plántulas establecidas a partir de las semillas envejecidas durante 0, 9, 14, 21 y 28 días, contado 10 días tras su siembra en placas Petri. | 25 |
| Figura 16. Ensayo de permeabilidad en semillas de mutantes MYB..... | 27 |
| Figura 17. Expresión <i>in silico</i> de los FT WRKY33, WRKY45, WRKY8 y WRKY48 en los distintos estadios de desarrollo de la semilla..... | 28 |
| Figura 18. Imagen representativa de las plántulas establecidas tras 14 días de CDT de las semillas de los genotipos <i>wrky33</i> , <i>wrky45</i> y Col0. La imagen se tomó 10 días tras la siembra.. | 29 |
| Figura 19. Ensayo CDT en semillas de mutantes <i>wrky</i> . Porcentaje de plántulas establecidas a partir de las semillas envejecidas durante 0, 9, 14, 21 y 28 días, contado 10 días tras su siembra en placas Petri. | 29 |
| Figura 20. Ensayo de permeabilidad en semillas de mutantes <i>wrky</i> . a. Mutantes <i>wrky33</i> y <i>wrky45</i> frente a Col0. b. Mutantes <i>wrky8</i> y <i>wrky48</i> frente a Col0..... | 30 |
| Figura 21. Diseño de cebadores para <i>MYB42</i> (arriba) y esquema simplificado (abajo) de cebador directo partido entre dos exones distintos y cebador reverso, para amplificaciones de los genes diana. | 31 |
| Figura 22. Resultado del análisis de a. estructuras <i>hairpins</i> , b. <i>self-dimers</i> y c. <i>hetero-dimers</i> mediante la herramienta de IDT <i>Oligo Analyzer Tool</i> | 32 |
| Figura 23. Alineamiento frente al genoma de <i>A. thaliana</i> del a. cDNA de <i>MYB46</i> , b. cebador directo para <i>MYB46</i> y c. cebador reverso para <i>MYB46</i> | 32 |
| Figura 24. Curvas de melting específicas de la amplificación del gen <i>WRKY8</i> en Col0 y <i>wrky33</i> | 33 |

| | |
|--|----|
| Figura 25. Datos de expresión relativa de los genes dianas de WRKY33 ($2^{\Delta\Delta Ct}$) obtenidos de la qRT-PCR y sus errores (barras)..... | 33 |
| Figura 26. Diseño de las construcciones genéticas de <i>WRKY33/45</i> bajo el control de un promotor constitutivo. | 35 |
| Figura 27. Diseño de las construcciones genéticas de <i>WRKY33/45</i> bajo el control de un promotor específico de testa..... | 35 |
| Figura 28. a. Electroforesis de la PCR de MUM4 (A1-A2), <i>WRKY33</i> , <i>WRKY45</i> (B3-B4), GUS (B5) y control negativo con todos los cebadores de las cuatro amplificaciones. b. Cuantificación del ADN extraído de la banda de gel de agarosa del producto de amplificación de la parte CDS <i>WRKY33</i> (B3-B4). | 36 |
| Figura 29. a. Digestión virtual de <i>WRKY33/45</i> en pUPD2 y del vector pUPD2 vacío. b. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de <i>WRKY33/45</i> en pUPD2 y el vector pUPD2 vacío. | 36 |
| Figura 30. a. Digestión virtual con HindIII de la unidad transcripcional (UT) de <i>WRKY33/45</i> bajo promotor específico en el vector <i>alpha2</i> y <i>alpha2</i> vector vacío b. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de estas unidades transcripcionales con HindIII. | 37 |
| Figura 31. a. Digestión virtual con BamHI del ensamblaje binario de la unidad transcripcional de <i>WRKY33/45</i> bajo promotor específico en el vector <i>alpha2</i> junto con el gen marcador de resistencia a kanamicina en <i>alpha1R</i> ; y vector omega vacío b. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de estos ensamblajes con BamHI..... | 38 |
| Figura 32. Plantas transformadas con las construcciones de <i>WRKY33</i> y <i>WRKY45</i> bajo promotor constitutivo..... | 38 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Genes diferencialmente expresados al alza y a la baja en el mutante <i>tt3tt7</i> y los FT que los regulan predichos por el software TF2Network. | 12 |
| Tabla 2. Líneas mutantes de <i>A. thaliana</i> de pérdida de función de FT de las familias WRKY y MYB..... | 14 |
| Tabla 3. Antibióticos empleados y concentración final de cada uno en la placa | 15 |
| Tabla 4. Partes utilizadas domesticadas para el ensamblaje multipartito, su descripción y su categoría dentro de la gramática de GB. | 21 |

SIGLAS Y ABREVIATURAS

- BSA: *Bovine Serum Albumin* (Albúmina de suero bovino)
- cDNA: complementary DNA
- CDT: Controlled Deterioration Treatment (tratamiento de envejecimiento acelerado)
- Col0: Columbia-0
- C-terminal: Carboxi-terminal
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DNAg: DNA genómico
- EDTA: Ácido Etilen Diamin Tetraacético
- eFP browser: Electronic Fluorescent Pictograph Browser*
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- EMS: Etil metano sulfonato
- EPPO: *Elevated Partial Pressure of Oxygen*
- F3'H: *Flavonoid 3'-Hydroxylase*
- FT: Factor de transcripción
- GUS: β -glucuronidasa
- K-3R: Kaempferol-3-ramnósido
- LB: *Lysogeny Broth* (Caldo lisogénico, conocido también como *Luria-Bertani*)
- MPK: *Mitogen activated protein kinase* (Proteína quinasa activada por mitosis)
- mRNA: RNA mensajero
- MS: Murashige & Skoog
- MYB: factores de transcripción con homólogos al oncogén viral de la mieloblastosis (*myeloblastosis*)
- NPTII: *Neomycin Phosphotransferase II* (Neomicina fosfotransferasa II)
- N-terminal: Amino-terminal
- PAs: proantocianidinas
- PCI: Phenol chloroform isoamyl alcohol (fenol cloroformo isoamílico)
- PCR: *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)
- qRT-PCR: *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*
- RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
- ROS: *Reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno)
- SDS: *Sodium dodecyl sulphate* (Dodecil sulfato sódico)
- SOB: *Supper optimal Broth* (Caldo super óptimo)
- TAE: Tampón compuesto por: Tris base, ácido bórico y EDTA
- Tm: *Melting temperature*
- UTR: *Untranslated region* (Región no traducida)
- WRKY: factores de transcripción con dominio WRKYGQK
- WT: Wild Type (silvestre)

INTRODUCCIÓN

1. Importancia de las semillas en agricultura y alimentación

La aparición y desarrollo de las semillas en plantas espermatofitas hace millones de años, permitió a las plantas adaptarse y colonizar diversidad de hábitats terrestres. La semilla, unidad básica de propagación, proporcionó varias ventajas sobre los métodos más primitivos como la reproducción vegetativa o la liberación de esporas (Toledo et al., 2018). Entre las ventajas más relevantes de las semillas se encuentran:

- La protección del embrión: la semilla protege al embrión de daños mecánicos, desecación, ataque de patógenos, aumentando así las probabilidades de supervivencia.
- La dispersión: Las semillas pueden ser dispersadas por el viento, el agua, los animales... lo que permite que las plantas puedan colonizar nuevas zonas y evitar la competencia con otras plantas de la misma especie (Jason Hilton, 1998).
- Dormancia: las semillas pueden entrar en estado de dormancia para sobrevivir periodos de condiciones ambientales adversas, hasta que las condiciones sean favorables para la germinación y el crecimiento.
- Reserva de nutrientes: como almidón, proteínas, lípidos... que permiten al embrión desarrollarse después de la germinación (Rajjou & Debeaujon, 2008).

Por otro lado, desde el inicio de la agricultura, las semillas han desempeñado un papel muy importante en la seguridad alimentaria y en el desarrollo humano al suministrar alimentos, piensos, y medicinas tradicionales (Rajjou & Debeaujon, 2008). Hace miles de años, nuestros antepasados ya dependían en gran parte de la variedad genética natural de las semillas para asegurar su sustento y supervivencia. Surgió así, la necesidad de seleccionar y almacenar aquellas semillas adaptadas al entorno. Este proceso de selección llevó progresivamente al desarrollo de variedades domesticadas que eran más productivas y útiles para las necesidades humanas.

En el momento actual, las semillas no dejan de tener ese papel fundamental en la producción mundial de alimentos. Según el informe de la FAO de 2020, a nivel mundial se comercializaron más de 4 millones de toneladas de semillas. Además, se estima que el valor del mercado mundial de semillas se ha triplicado los últimos 25 años, hasta alcanzar 60.000 millones de dólares. Las semillas son relevantes no solo para la producción de nuevos cultivos y plantas, sino también como alimento directamente, como los cereales y leguminosas que suponen una fuente directa de nutrientes (Poutanen et al., 2022). Los recientes avances en el cultivo de semillas, la genética y la biotecnología ha permitido desarrollar nuevas variedades de cultivos de alto rendimiento. Estas mejoras, han aumentado la producción agrícola y contribuyen al abastecimiento de la alta demanda de alimentos de una población creciente. Sin embargo, todavía se conoce poco sobre los mecanismos moleculares que controlan factores como la longevidad de las semillas. Por ello, acelerar el desarrollo y obtención de semillas de mejor calidad y de mayor rendimiento sigue siendo uno de los objetivos de la investigación agrícola (Nadarajan et al., 2023).

2. La semilla de *Arabidopsis thaliana*

La semilla de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) está formada por tres partes: el embrión, el endospermo y la cubierta de la semilla (Figura 1).

La formación de la semilla de *A. thaliana* inicia con una doble fecundación: uno de los dos núcleos espermáticos se fusiona con la ovocélula dando lugar al cigoto diploide, mientras que el otro se fusiona

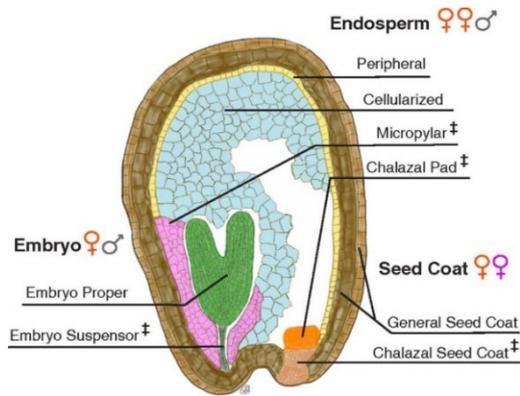


Figura 1. Tejidos principales de la semilla de *A. thaliana* (Geist et al., 2019).

2.1. Estructura y capas de la cubierta

La cubierta o tegumento de la semilla es un tejido materno de origen ovular que rodea al embrión y a los tejidos nutritivos (Rajjou & Debeaujon, 2008). Constituye un elemento esencial en el ciclo vital de las plantas, ya que controla el desarrollo del embrión, determina el periodo de la latencia y regula la germinación (Moïse et al., 2005).

La cubierta de la semilla se diferencia a partir de los tegumentos del óvulo en respuesta a la fecundación en 5 capas distintas: tres internas (*inner integument*, ii), y dos externas (*outer integument*, oi) (Figura 2). Estas capas sufren rápidas divisiones y expansiones celulares, los primeros 5 días tras la fecundación. A continuación, las células se diferenciarán y cada capa sintetizará determinados compuestos químicos con diferentes funciones.

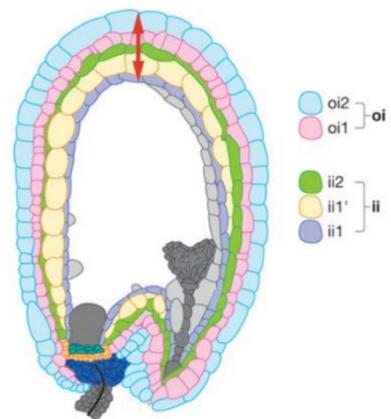


Figura 2. Sección longitudinal de la cubierta de la semilla. Capas del tegumento interno (ii) y tegumento externo (oi) (Modificada a partir de Lepiniec et al., 2006).

- Tegumento externo (oi)
 - Ambas capas del tegumento externo (1 y 2) acumulan almidón en los amiloplastos.
 - Capa 1 – Epidermis: las células sintetizan y secretan mucílago, un carbohidrato que se deposita en la micropila de la semilla para formar la columnela. La micropila es una pequeña abertura en la epidermis de la semilla que permite la entrada de agua y gases necesarios para la germinación. El mucílago protege a la semilla y facilita la hidratación de la semilla durante la germinación (Han et al., 2019).
 - Capa 2 – Subepidermis: Esta capa de células acumula algunos compuestos flavonoides, en concreto compuestos de la familia de los flavonoles, pero no acumula proantocianidinas. Posteriormente las células de la subepidermis sintetizan suberina con la función de impermeabilizar la semilla y evitar que el agua entre en el interior formando una pared engrosada en la cara interna en forma de empalizada.
- Tegumento interno (ii)
 - Capas 3 y 4: Durante el desarrollo de la semilla (día 5-8 tras polinización), las células de las dos capas externas del tegumento interno acumulan almidón. En estadios más avanzados del desarrollo de la semilla, el almidón se degrada para reforzar las paredes celulares y estas dos capas celulares van quedando aplastadas entre sí y quedan unidas.
 - Capa 5 – Endotelio: Las células de la capa más interna del ii constituyen el endotelio y sintetizan compuestos flavonoides. En concreto acumulan flavonoles derivados de quercetina mayoritariamente y proantocianidinas en la vacuola durante la primera semana. Posteriormente la oxidación de estos compuestos aportará un color marrón a la cubierta de la semilla madura (Haughn & Chaudhury, 2005).

En la semilla madura, las células de las cinco capas de la cubierta mueren. Las cuatro capas más internas que se originaron a partir del tegumento del óvulo, quedan aplastadas mientras que la capa más externa de la cubierta mantiene su estructura gracias a la pared secundaria de la columela (de Silva et al., 2021; Rajjou & Debeaujon, 2008).

Por último, entre la capa más interna del ii y el endospermo se encuentra la cutina, una película cerosa con función protectora que impermeabiliza la semilla (De Giorgi et al., 2015).

2.2. Etapas de desarrollo de la semilla

El desarrollo de la semilla puede dividirse en dos grandes etapas (Figura 3):

- I. **Morfogénesis:** esta fase se inicia en el momento de la fecundación, y acaba cuando el embrión se encuentra en estado tardío corazón (día 7 tras la polinización). Durante esta etapa se establece la organización de los tejidos del embrión. El cigoto experimenta divisiones y diferenciación celular muy coordinadas. Inicialmente el cigoto sufre una división asimétrica que genera una célula apical y una basal. Seguidamente, le suceden dos divisiones longitudinales y dos divisiones transversales. Divisiones posteriores originan un embrión con aspecto globular (Verma et al., 2022). Posteriormente, con el desarrollo del cotiledón, el embrión adopta la forma de corazón.
- II. **Maduración:** se inicia cuando el embrión está en aspecto corazón y termina cuando la semilla se ha desarrollado por completo, ha acumulado todos los nutrientes necesarios, se ha secado y ha entrado en estado latente. Durante la maduración, el embrión sigue creciendo mediante elongación, pero ya no hay divisiones celulares ni diferenciación. Paralelamente a la expansión celular, se acumulan en la semilla sustancias de reserva como carbohidratos, proteínas y ácidos grasos (Goldberg et al., 1994).

Al final de la etapa de maduración, ocurre también un proceso de desecación. El contenido de humedad va disminuyendo y la semilla entra en estado latente. El metabolismo de la semilla se detiene a la espera de condiciones ambientales apropiadas para iniciar la germinación de la semilla.

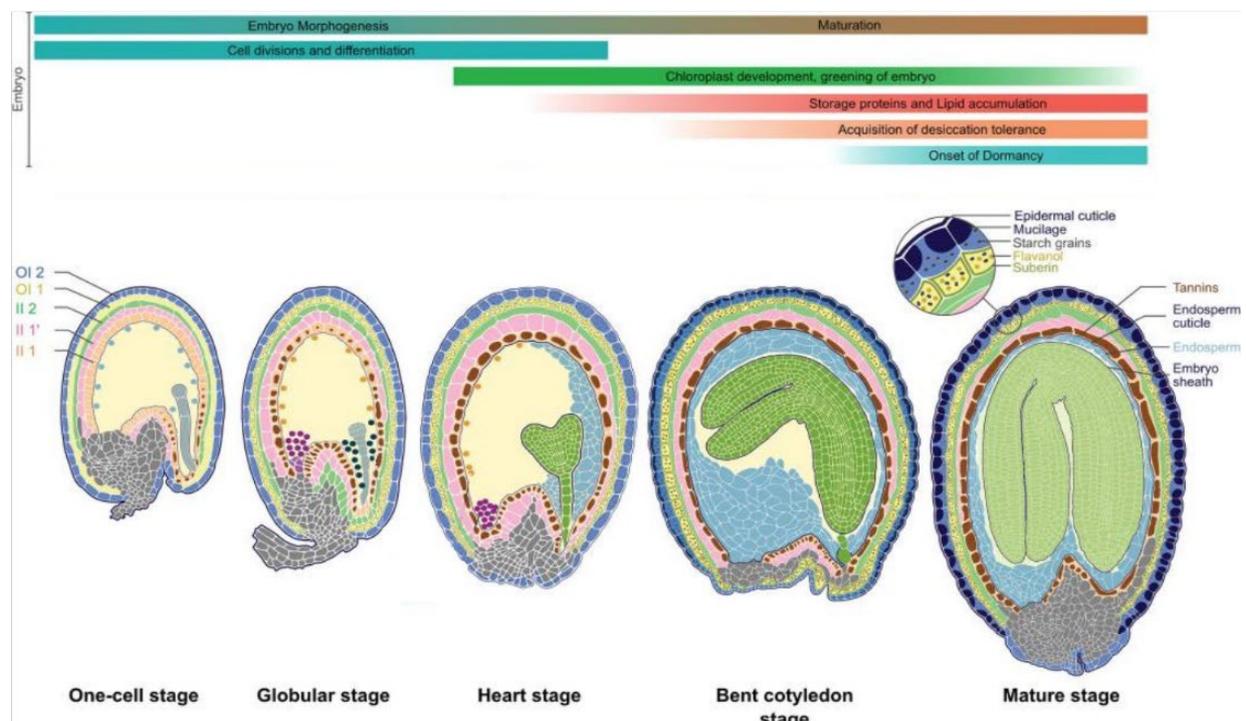


Figura 3. Principales acontecimientos que tienen lugar durante el desarrollo del embrión: morfogénesis y maduración (Modificada a partir de Verma et al., 2022).

3. Longevidad de semillas

3.1. Concepto e importancia

Durante la última fase de maduración, las semillas adquieren tolerancia a la desecación, permitiéndoles permanecer viables durante periodos de tiempo prolongados. La longevidad de las semillas consiste en la capacidad de permanecer viables y germinar adecuadamente, a pesar del paso de largos periodos de tiempo de almacenamiento tras su recolección (Nadarajan et al., 2023).

La longevidad de las semillas es muy variable entre especies. Es un rasgo que está controlado por varios factores genéticos y depende también en gran medida en las condiciones de almacenamiento (Arif & Börner, 2019). Los factores más relevantes que determinan la longevidad y viabilidad de las semillas son el contenido en humedad, la humedad relativa, la temperatura de almacenamiento y la presión de oxígeno (Ellis & Roberts, 1980).

Si almacenamos las semillas durante periodos de tiempo excesivamente largos, la semilla envejece y comienza a presentar síntomas del envejecimiento: cambios morfológicos, cambios estructurales, cambios en la membrana celular, pérdida de la actividad enzimática, disminución en la tasa de respiración, acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), etc., que provocan una acumulación de daños en la semilla (Pirredda et al., 2024). Se ha comprobado que cuando las semillas envejecidas se siembran en campo se observa un retraso en la germinación de las semillas, anomalías en las plántulas y un menor porcentaje de germinación, lo que provoca un menor rendimiento de los cultivos, y consecuentemente graves pérdidas a nivel económico (Corbineau, 2024).

Poder conservar las semillas durante largos periodos de tiempo resulta muy útil para la industria agroalimentaria. Si las semillas son más longevas, las empresas de semillas y los agricultores ya no están obligados a sembrar de manera tan frecuente semillas del mismo cultivo para obtener lotes “frescos”, permitiendo una mayor flexibilidad en la rotación de cultivos, una reducción de costos, mayor seguridad ante escasez de semillas etc. Además, una mayor longevidad facilita la conservación de la diversidad genética ya que las semillas se pueden almacenar en bancos de germoplasmas durante periodos de tiempo más prolongados (Rajjou & Debeaujon, 2008).

Considerando todo lo mencionado anteriormente, entender con mayor profundidad los factores genéticos que determinan la longevidad de las semillas es de considerable importancia.

3.2. Métodos de estudio

Con el paso del tiempo, las semillas van perdiendo la capacidad de germinar. La viabilidad de las semillas varía según la especie. En el caso concreto de las semillas de *A. thaliana*, su viabilidad media es de 3 años.

Para poder estudiar el envejecimiento de las semillas de forma más rápida sin necesidad de esperar periodos de tiempos tan largos, se realizan tratamientos de envejecimiento acelerado. La humedad y la temperatura son dos factores ambientales que afectan en gran medida a la viabilidad de la semilla. Por ello, aplicando elevadas temperaturas, y una alta humedad relativa (HR), se simula un envejecimiento de la semilla análogo al envejecimiento natural, pero en periodos de tiempo mucho más reducidos.

Uno de los tratamientos de envejecimiento más conocido es el CDT (*Controlled Deterioration Treatment*). (Groot, 2002). Consiste en someter las semillas a condiciones controladas de alta temperatura y alta humedad relativa. En concreto, el CDT se lleva a cabo manteniendo las semillas en un recipiente hermético cerrado a 37°C y una humedad relativa del 75%. La humedad relativa se consigue introduciendo una solución saturada de sal (NaCl) dentro del recipiente donde se encuentran las semillas. Cada sal en disolución saturada, tiene un porcentaje específico de humedad relativa. En el caso de NaCl, alcanza una humedad relativa del 75% (Rajjou et al., 2008).

Otro método experimental para estudiar el envejecimiento de la semilla en seco, es el método EPPO (*elevated partial pressure of oxygen*). Durante el almacenamiento EPPO, se aumenta la concentración absoluta de oxígeno mediante el incremento de la presión parcial de oxígeno (hasta 20 MPa), mientras que la concentración relativa de oxígeno se mantiene a 21%, la misma concentración de oxígeno en el aire (Buijs et al., 2020). De esta forma, se consigue envejecer las semillas de forma relativamente rápida (1-2 meses aproximadamente). El envejecimiento por EPPO permite simular las condiciones de humedad y temperatura propias de un envejecimiento natural que ocurre durante el almacenamiento en seco utilizado en el comercio de semillas y en bancos de germoplasma (Groot et al., 2012).

3.3. Importancia de la cubierta de la semilla para su longevidad

El envejecimiento de la semilla se ve afectado por factores tanto genéticos como fisiológicos. A nivel genético, se han estudiado varios genes que están implicados en la longevidad de las semillas. La mayoría cumplen una de estas tres funciones biológicas (Figura 4): función antioxidante frente a estrés oxidativo (detoxificación), reparación de proteínas y ácidos nucleicos dañados (reparación) y desarrollo de la cubierta de la semilla (protección) (Renard et al., 2020).

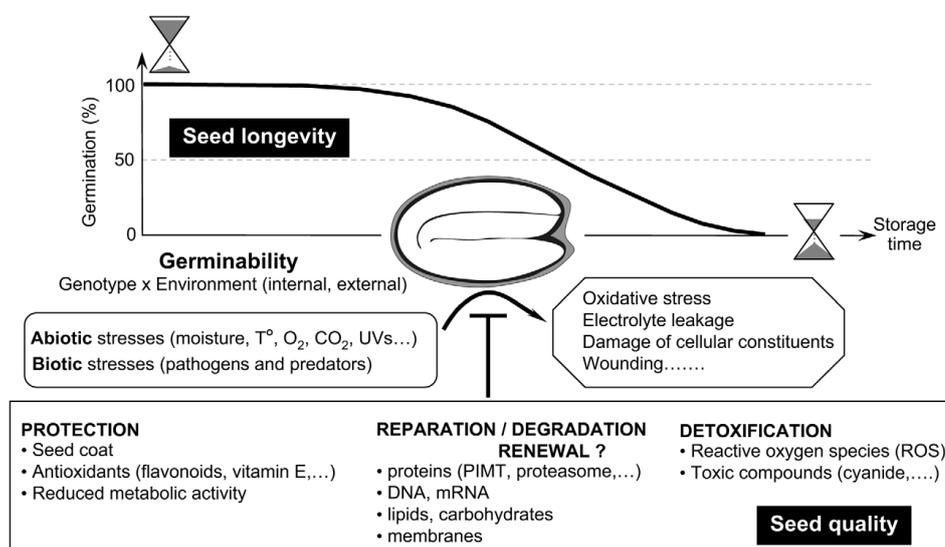


Figura 4. Parámetros más relevantes que determinan la longevidad de las semillas (Rajjou & Debeaujon, 2008).

La cubierta es la primera barrera de protección que presenta la semilla frente a estreses de tipo biótico y abiótico: resguarda al embrión y los tejidos internos contra daños físicos, ataques de microorganismos, desecación excesiva, temperaturas extremas... (Renard et al., 2020). Distintos autores han comprobado que semillas de distintos mutantes que tienen defectos en la testa germinan peor que el control silvestre tras el almacenamiento (Rajjou & Debeaujon, 2008).

3.3.1. Papel de los poliésteres lipídicos en la longevidad de semilla

A nivel fisiológico, existen distintos compuestos de la cubierta de la semilla que contribuyen a la longevidad de la semilla. En concreto, algunos lípidos poliésteres como la suberina y la cutina, impermeabilizan los tejidos de la semilla, evitando la entrada excesiva de humedad u oxígeno que acelerarían el deterioro del embrión. Líneas mutantes en genes necesarios para la biosíntesis de poliésteres (como cutina o suberina) presentan una menor longevidad, debido a la elevada permeabilidad de las semillas (Beisson et al., 2007).

Por otra parte, los investigadores Bueso et al., (2014), descubrieron que la sobreexpresión del FT *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25* (ATHB25), provocaba un aumento en el grosor de la capa de suberina que protege la semilla, y como consecuencia las semillas presentaban una mayor longevidad. Además, comprobaron que las líneas triple mutantes para ATHB25, junto con la mutación de otros dos factores de transcripción (FT) de la misma familia (ATHB22 y ATHB31), presentaban una

longevidad reducida (Bueso et al., 2014). La supresión de estos tres FT, interrumpía la señalización mediada por giberelinas, y disminuía la síntesis de suberina, provocando un aumento en estrés oxidativo y una menor longevidad de las semillas.

Este mismo grupo de investigación, observó un efecto parecido con la sobreexpresión del gen *COGWHEEL1* (*COG1*), que codifica para un FT de tipo DOF, aumentando el grosor de la capa de suberina y mejorando la viabilidad de la semilla (Bueso et al., 2016).

3.3.2. Papel de los flavonoides en la longevidad de semillas

Recientes estudios han mostrado la importancia del estrés oxidativo en la longevidad de las semillas. La acumulación descontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS), puede causar graves daños en la semilla, ya que pueden oxidar otras biomoléculas presentes en la célula como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Lepiniec et al., 2006). Para reducir el daño oxidativo, la semilla acumula compuestos antioxidantes como los flavonoides en la cubierta. Se ha observado que semillas mutantes de enzimas de la biosíntesis de flavonoides son más sensibles al envejecimiento. Dentro de los flavonoides se encuentran: las proantocianidinas (PAs) o taninos, los flavonoles y las antocianinas (Figura 5).

Además de su papel como antioxidantes, las proantocianidinas constituyen elementos estructurales de la cutícula. Loubéry et al. (2018) demostraron que las PAs son necesarias para impermeabilizar la cubierta ya que mutantes *transparent testa* (*tt*), deficientes de enzimas de la ruta de biosíntesis de las PAs, presentaban una permeabilidad de la cubierta muy elevada, que provocaba una menor longevidad de la semilla. Observaron que esta permeabilidad era debida a graves defectos estructurales en la cutícula, y que por lo tanto las PAs son componentes intrínsecos de la cutícula (Loubéry et al., 2018).

Dentro de la cubierta de la semilla, los flavonoles, se acumulan en la subepidermis del tegumento externo. El efecto que tienen los flavonoles como el kaempferol y la quercetina en la semilla, no ha sido tan estudiado, y por ello algunos grupos de investigación como el de biología de semillas del IBMCP (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas) han abordado estudios genéticos, moleculares y estructurales empleando mutantes de pérdida de función en la ruta de biosíntesis de estos compuestos para comprender su función en la cubierta de las semillas, y su posible implicación en mecanismos de longevidad (Niñoles et al., 2023).

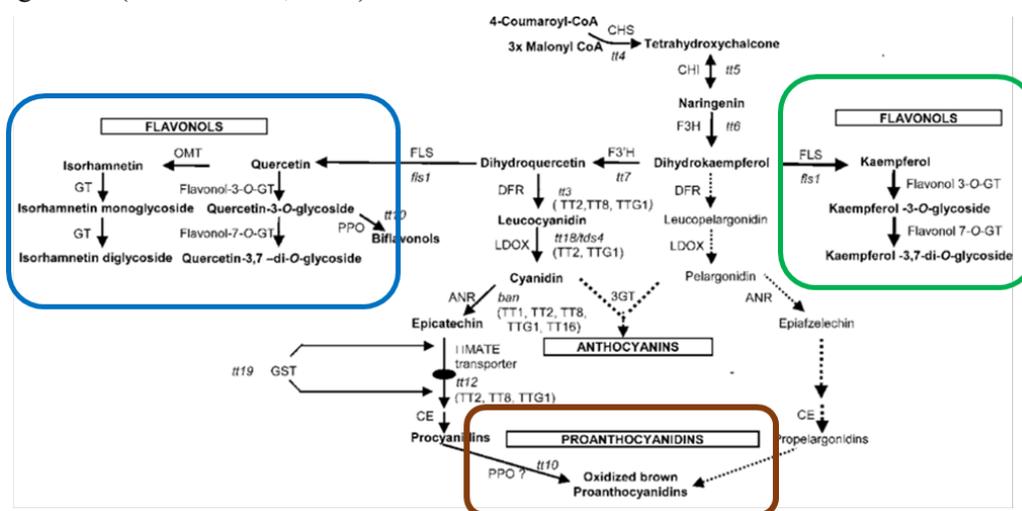


Figura 5. Ruta de síntesis de los flavonoides. Se marcan en azul los flavonoles derivados de quercetina, en verde los derivados de kaempferol y en marrón las proantocianidinas. Modificado a partir de Routaboul et al., (2006).

Concretamente, se caracterizó el mutante *tt7* que presentaba una viabilidad muy baja. El gen *TT7* codifica para la enzima F3'H (flavanone-3-hydroxylase), implicada en la síntesis de flavonoides. Por ello el mutante *tt7* tenía alterada su composición en flavonoides: una acumulación excesiva de compuestos derivados del kaempferol y, por otro lado, una composición alterada de PAs.

Estudios genéticos y fisiológicos permitieron determinar que la reducida longevidad de este mutante se debía a la acumulación de kaempferol-3-ramnósido (K-3R) en la testa, provocando una malformación de la cubierta. En concreto el desarrollo del tegumento externo se veía gravemente afectado, provocando una alta permeabilidad en la cubierta de la semilla y una extremadamente baja longevidad. Además, el mutante *tt7* sufría una degradación incompleta del almidón de la cubierta al final del proceso de maduración de la semilla.

Como se explicará en más detalle en el apartado 7, para determinar los mecanismos moleculares por los que el K-3R provocaba esa alteración en el desarrollo de la testa, se llevó a cabo un análisis global de la expresión génica del doble mutante en los genes de biosíntesis de flavonoides *TT3* y *TT7* (acumula en su testa esencialmente K-3R).

4. Factores de transcripción de la familia WRKY

La familia de FT WRKY es una familia de FT específicos de plantas que regulan diversos procesos de señalización. Reciben este nombre debido a que todos ellos contienen un dominio conservado de alrededor de 60 aminoácidos. Este dominio contiene una secuencia de siete aminoácidos (WRKYGQK) en el extremo amino terminal y una estructura de dedo de zinc. Estos FT regulan la transcripción de genes diana mediante su unión específica a regiones W-box en sus promotores. Los FT WRKY se dividen en distintos grupos (I, II y III) dependiendo del número de dominios WRKY y de motivos de dedos de zinc (H. Wang et al., 2023).

Los FT WRKY contribuyen al crecimiento y desarrollo adecuado de las plantas y participan en distintas respuestas a estrés biótico y abiótico, así como en la señalización hormonal. La mayoría de FT WRKY actúan como reguladores negativos, que reprimen la expresión génica, pero hay algunos que actúan como reguladores positivos activando algunos genes que otorgan una mayor resistencia a estrés (H. Wang et al., 2023).

I. Respuestas a estrés biótico:

La mayoría de estudios de la función de estos FT se ha realizado con respuestas a estrés biótico. Se ha comprobado que varios FT WRKY, están implicados en restringir el patógeno a la zona dañada para evitar que se propague la infección; en activar las vías del ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) o el etileno (ET), que modulan genes que confieren resistencia a estreses bióticos... etc.

Gran parte de las respuestas frente estrés biótico están controladas por la activación de MAP quinasas (MPK). Las MPK activan numerosos FT WRKY para regular distintas respuestas. Por ejemplo, WRKY33 está asociado normalmente en el núcleo a MPK4. Cuando detecta un patógeno, se activan distintas MPK que provocan la disociación del complejo WRKY33-MKS1-MPK4. Cuando WRKY33 se encuentra libre, activa a PAD3 que es necesaria la síntesis de camalexina, un compuesto antimicrobiano (Phukan et al., 2016).

WRKY48 es otro de los FT que regulan la respuesta a estrés biótico. En concreto, WRKY48 es un regulador negativo de la expresión de genes inducidos por la presencia de patógenos como *Pseudomonas syringae*. Los autores (Xing et al., 2008), demostraron que la disrupción génica de WRKY48, afectaba negativamente a la resistencia basal a la enfermedad.

II. Respuestas a estrés abiótico:

Aunque en menor medida, también se ha estudiado el papel de los FT WRKY en respuestas a estrés abiótico, como la sequía, salinidad, temperaturas extremas o estrés osmótico (Rushton et al., 2010).

Muchos FT WRKY como WRKY33 pueden interactuar a través de su dominio C-terminal, con proteínas que tienen motivos VQ (FxxxVQxLTG) para regular estreses abióticos (Phukan et al., 2016). Un ejemplo es la regulación del gen *CYP94B1* del citocromo P450 por el FT WRKY33 (Figura 6), que controla la formación de la barrera apoplástica en las raíces para conferir tolerancia a la sal (Krishnamurthy et al., 2020).



Figura 6. Formación de la barrera apoplástica de la raíz por WRKY33 a través de CYP94B1 para conferir tolerancia a la sal (Krishnamurthy et al., 2020).

Otro FT WRKY que modula la respuesta a estrés abiótico es WRKY8, que regula las vías de señalización para la tolerancia a estrés salino. Mutantes *wrky8*, resultaban ser hipersensibles al estrés salino, y mostraban un retraso en su germinación y desarrollo (Hu et al., 2013).

5. Factores de transcripción de la familia MYB

La amplia familia de FT MYB está conservada en todos los organismos eucariotas y desempeña funciones muy diversas. Los FT MYB presentan un dominio MYB muy conservado de unión al ADN. El dominio MYB es un dominio de hasta cuatro repeticiones imperfectas (R1, R2, R3 y R4) (Stracke et al., 2001). Cada repetición forma una estructura helicoidal de unos 53 aminoácidos, con tres triptófanos separados regularmente de manera que cuando se pliegan en su estructura tridimensional forman un núcleo hidrofóbico (Xiao et al., 2021). Los FT MYB pueden clasificarse en distintas clases según el número de repeticiones adyacentes (grupos: I, II, III y IV).

Estos FT modulan muchos aspectos del metabolismo de la planta, el desarrollo y respuestas a estrés biótico y abiótico. Por ejemplo, varios R2R3-MYB participan en la regulación de la biosíntesis de flavonoides. MYB11, MYB12 y MYB111 controlan la síntesis de flavonoles en todos los tejidos de la planta. MYB75, MYB90, MYB113 y MYB114 participan en la biosíntesis de PAs en la cubierta de la semilla, y MYB123 está también implicado en la síntesis de taninos (Dubos et al., 2010).

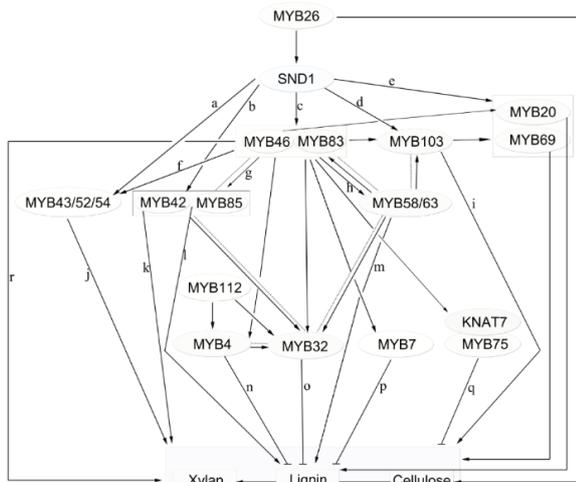


Figura 7. Regulación de componentes de la pared celular secundaria mediada por MYB (Xiao et al., 2021).

Por otro lado, varios FT de la familia MYB intervienen en la síntesis de componentes de la pared celular (Figura 7). En concreto MYB46, MYB58, MYB63 y MYB85 activan la síntesis de lignina, mientras que MYB68 la reprime. MYB52, MYB54, MYB69 son reguladores positivos del engrosamiento de la pared celular de las células fibrosas, y regulan la síntesis de lignina, xilano y celulosa. MYB61 interviene en distintas rutas como la deposición de lignina, la producción de mucílago y la apertura estomática (Dubos et al., 2010).

6. Técnicas de clonaje modular

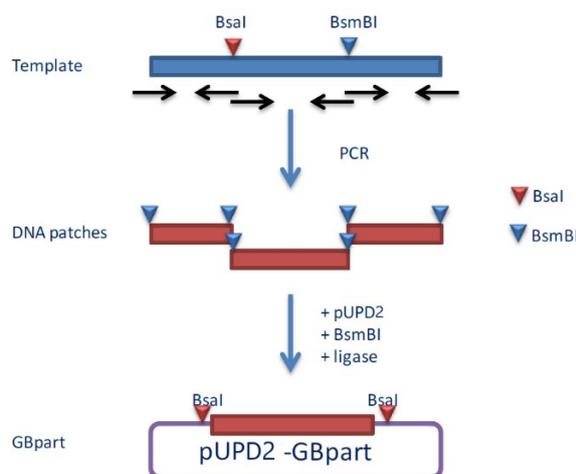
Las técnicas de clonaje modular empleadas en Biología Sintética permiten construir estructuras multigénicas muy complejas de forma estandarizada a partir de partes básicas de ADN.

GoldenBraid (GB) es una técnica de clonaje modular ideada por un grupo de investigadores del IBMCP del Laboratorio de Genómica y Biotecnología Vegetal. GB permite ensamblar varios módulos/varias partes en combinaciones casi infinitas de forma sencilla. Entre las ventajas que presenta esta técnica de clonaje modular destacan su elevada eficiencia, permite crear construcciones de hasta 15-20 kb, con varias unidades transcripcionales. Además, GB permite intercambiar módulos genéticos entre distintos laboratorios, facilitado la introducción de nuevas partes en circuitos genéticos de forma relativamente sencilla y rápida mediante el uso de las herramientas disponibles online (<https://goldenbraidpro.com/tools/>).

Este sistema utiliza enzimas de restricción de tipo IIS, que cortan el ADN fuera de su secuencia de reconocimiento. De esta manera se pueden reutilizar las piezas básicas de ADN para distintas construcciones. Por otro lado, permite añadir múltiples unidades transcripcionales dentro de un mismo vector (Sarrion-Perdigones et al., 2011).

GB es un sistema de clonación que utiliza cuatro plásmidos de destino diferentes (ver materiales y métodos 3.3 para vectores utilizados en GB). Inicialmente se realiza un ensamblaje multipartito que permite obtener una unidad transcripcional a partir de sus módulos o “partes” (como promotor, secuencia codificante (CDS) del gen de interés y terminador). Una vez tenemos las distintas unidades transcripcionales en plásmidos independientes, permite combinarlos de forma binaria. El proceso de clonación de GB consta de las siguientes fases:

6.1. Domesticación



La estandarización de las distintas partes o módulos más básicos se conoce como domesticación. Se introduce cada parte independiente dentro de un vector circular pUPD2 (Figura 8). Para domesticar las distintas partes de la unidad transcripcional que se quiere clonar, hay que eliminar cualquier sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción BsmBI y BsaI dentro de los fragmentos a clonar. En caso de que la secuencia de interés presente sitios de reconocimiento para estos enzimas, se llevará a cabo una mutagénesis dirigida, sustituyendo un nucleótido de la secuencia, de manera que se pierda el sitio de reconocimiento, sin afectar a la secuencia aminoacídica.

Figura 8. Domesticación de partes básicas (GB 2.0 Users Manual).

Además, se añaden en los extremos del fragmento, los sitios de reconocimiento de uno de los enzimas utilizados por GB (BsmBI), y otros 4 nucleótidos flanqueantes, que permiten definir la del módulo o parte en el sistema de GB, y facilitarán la posterior unión de las distintas partes de la unidad transcripcional mediante la T4 ligasa (ensamblaje multipartito).

6.2. Ensamblaje multipartito de una unidad transcripcional

Se trata de un ensamblaje multipartito que permite unir las distintas partes ya domesticadas, en una única unidad transcripcional. Se incorporan las distintas partes que se encuentran en distintos vectores pUPD2 en un mismo vector *alpha*, de forma ordenada gracias a los 4 nucleótidos (NT) de la gramática de GB, que definen la posición de cada parte dentro del ensamblaje (Figura 9).

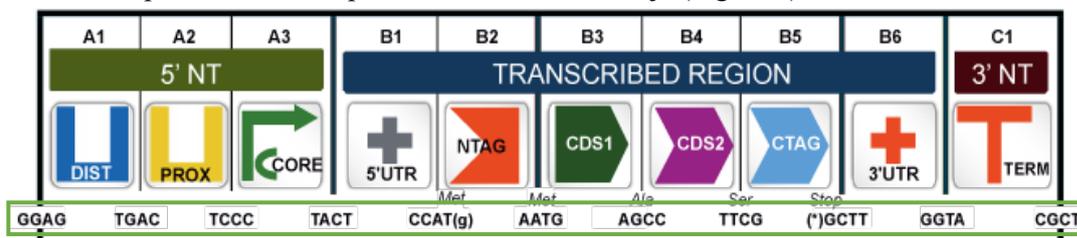


Figura 9. Esquema con las distintas categorías (A1-C1) de GB. Puede observarse como cada una de estas categorías o posiciones queda definida por 4 nucleótidos a su izquierda y derecha (cuadrado verde), que permiten el ensamblaje multipartito de forma ordenada. DIST: región distal del promotor. PROX: Región proximal del promotor. CORE: promotor mínimo, UTR: *unstranlated region*, NTAG: etiqueta/proteína de fusión en el extremo N terminal, CDS1 y 2: secuencias codificantes, CTAG: etiqueta/proteína de fusión en el extremo C terminal. TERM: terminador.

En el ensamblaje multipartito, se utiliza la enzima de restricción de BsaI que permite separar cada fragmento de su plásmido pUPD2 e introducirlos en un vector destino *alpha*. Dependiendo del orden y del sentido en el que se quieran clonar las secuencias, se realizará el ensamblaje multipartito en uno u otro vector *alpha* (*alpha1*, *alpha2*, *alpha1R*, *alpha2R*) (Figura 10).

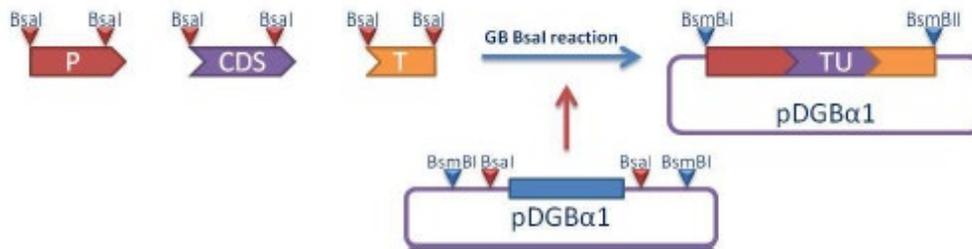


Figura 10. Ensamblaje multipartito de una unidad transcripcional ([GB 2.0 Users Manual](#)). P: promotor, CDS: secuencia codificante, T: terminador.

6.3. Ensamblaje binario

Para unir dos unidades transcripcionales que se encuentra en vectores *alpha*, se procede con una nueva reacción de restricción-ligación, análoga a la anterior. En este caso, la enzima de restricción que se utiliza es BsmBI que permite la salida de las distintas unidades transcripcionales y su introducción en un vector receptor omega. Al igual que los vectores *alpha*, existen distintas categorías: omega1, omega2, omega1R y omega2R. En caso necesario, se puede continuar ensamblando nuevas unidades transcripcionales. Para ello, se ensamblarían otros dos módulos omega en un vector alpha, y así sucesivamente alternando reacciones de ensamblaje entre vectores alpha y omega (Figura 11).

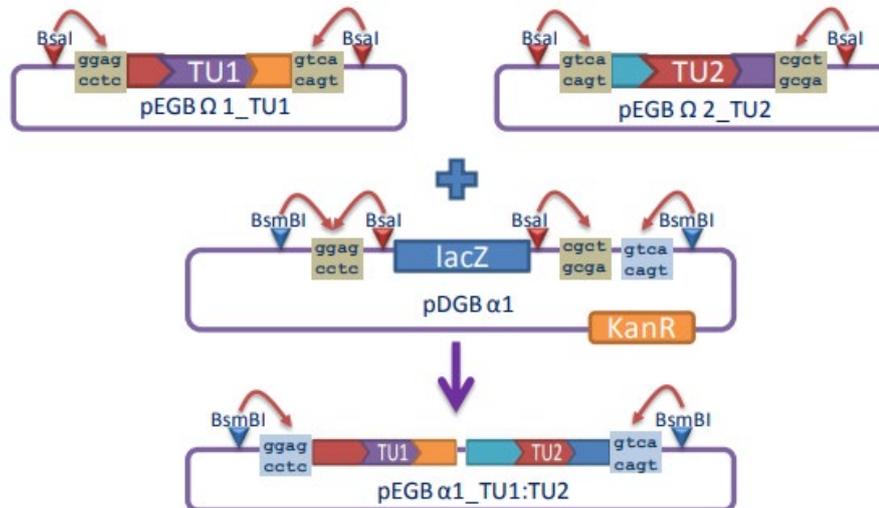


Figura 11. Ensamblaje de dos unidades transcripcionales ([GB 2.0 Users Manual](#)). TU: *Transcriptional Unit*, KanR: Resistencia a Kanamicina.

7. Antecedentes del presente TFG

En el apartado 3.4.1, se ha comentado los mecanismos de protección de la semilla. Uno de los mutantes estudiados relacionados con la longevidad de las semillas era *tt7*, que es muy sensible al envejecimiento. La causa de la baja viabilidad de la semilla era la excesiva acumulación de kaempferol-3-ramnósido en su cubierta, que provocaba anomalías en el desarrollo de la testa (Niñoles et al., 2023). Para estudiar el mecanismo molecular por el cual este metabolito provocaba el fenotipo de una testa totalmente desestructurada, el mismo grupo de investigadores, empleó una línea doble mutante *tt3tt7*, que acumulaba principalmente kaempferol-3-ramnósido en la cubierta de la semilla y, por supuesto, tenía

fenotipos similares a *tt7*. Aislaron la testa de la semilla del doble mutante y llevaron a cabo un RNAseq exclusivamente de la cubierta de la semilla mutante, en comparación con la del control silvestre.

7.1. RNAseq de testa de *tt3tt7*

Los resultados del RNAseq mostraron un total de 201 genes más expresados en *tt3tt7* frente al WT, mientras que había 464 que mostraban una menor expresión en el mutante.

Mediante el uso del software *Panther*[®] (<https://go.pantherdb.org/>), se determinaron las categorías funcionales enriquecidas en el RNAseq. Además, se utilizó el software SRPlot (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) para visualizar dichas categorías (Figura 12).

Entre los genes más expresados en el doble mutante *tt3tt7*, las funciones más enriquecidas eran respuestas a estrés biótico y abiótico, destacando la del estrés oxidativo. En cambio, como se esperaba, las funciones de los genes que se encontraban menos expresados en *tt3tt7*, estaban relacionados con la biosíntesis de la pared celular, con el desarrollo de la cubierta de la semilla, la síntesis de lignina, suberina etc. La síntesis de lignina tiene como precursor la fenilalanina. La fenilalanina se encuentra aguas arriba de la ruta de los fenilpropanoides, y por lo tanto implicada en la síntesis de flavonoides, lignina y suberina. Si se reprime la producción de estos compuestos, la cubierta se hace muy permeable, afectando negativamente a la longevidad.

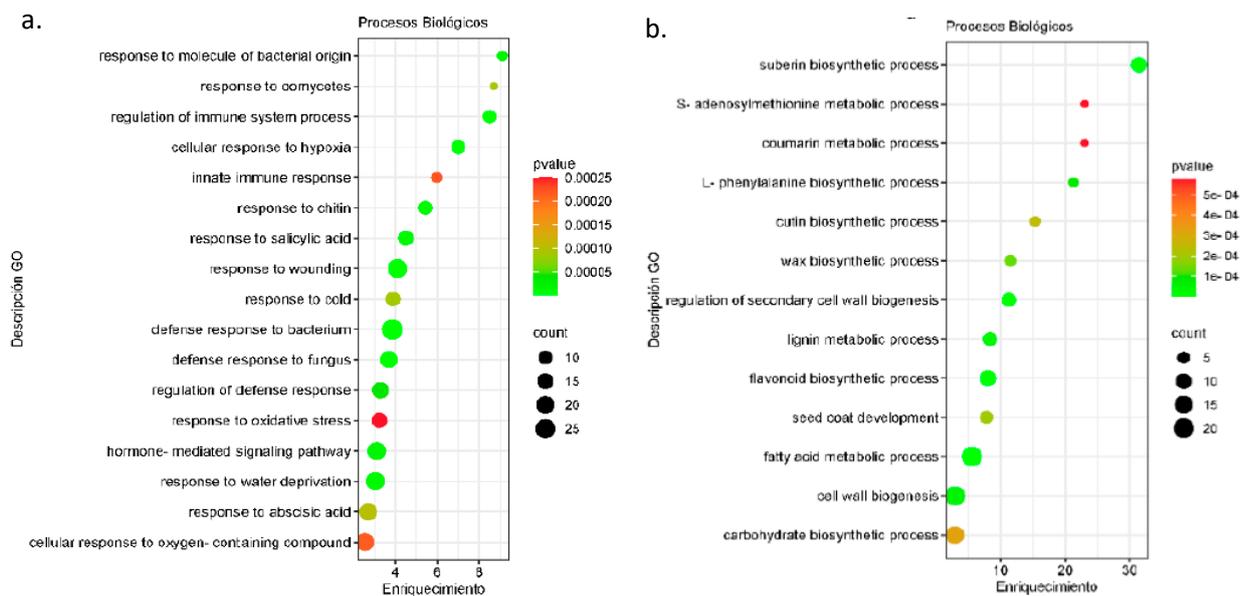


Figura 12. Categorías funcionales enriquecidas en los genes diferencialmente expresados en *tt3tt7* frente a WT en **a.** genes más expresados en *tt3tt7* y **b.** genes menos expresados en *tt3tt7*.

Por otro lado, se observó que había una inducción muy elevada de varios FT de la familia WRKY y una fuerte reducción de FT de la familia MYB en el mutante *tt3tt7*. Se recurrió además al software TF2Network (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/TF2Network/>) para predecir los FT que regulaban aquellos genes que se encontraban más y menos expresados en el doble mutante *tt3tt7* (Tabla 1). Entre los FT identificados como reguladores de los genes más expresados se encontraban FT de la misma familia WRKY, mientras que en la predicción de FT que regulan los genes menos expresados en el mutante se encontraban FT de la familia MYB, ANAC087 y FUS.

Tabla 1. Genes diferencialmente expresados al alza y a la baja en el mutante *tt3tt7* y los FT que los regulan predichos por el software TF2Network.

| Genes más expresados en <i>tt3tt7</i> | | |
|---------------------------------------|--------|--------------------------|
| Gen | | Número de veces inducido |
| AT2G38470 | WRKY33 | 42 |
| AT5G49520 | WRKY48 | 17 |
| AT4G18170 | WRKY28 | 72 |
| AT5G46350 | WRKY8 | 34 |

| FT regulando genes más expresados (TF2N) |
|--|
| WRKY33 |
| WRKY45 |
| WRKY21 |
| WRKY57 |
| WRKY49, 32, 15, 46 |

| Genes menos expresados en <i>tt3tt7</i> | |
|---|-------|
| Gen | |
| AT4G33450 | MYB69 |
| AT4G12350 | MYB42 |
| AT5G23000 | MYB37 |
| AT1G73410 | MYB54 |
| AT4G22680 | MYB85 |
| AT5G16770 | MYB9 |
| AT1G68320 | MYB62 |

| FT regulando genes menos expresados (TF2N) |
|--|
| MYB3 (represión de fenilpropanoides) |
| MYB58 (síntesis lignina) |
| MYB64 |
| MYB63 (síntesis pared secundaria) |
| ANAC087 |
| FUS |

OBJETIVOS:

Este Trabajo Final de Grado tiene como objetivo general estudiar la posible implicación de factores de transcripción de tipo WRKY y MYB en la longevidad de las semillas. Para ello se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterizar mutantes de pérdida de función de factores de transcripción de las familias MYB y WRKY
2. Analizar la expresión en semilla de posibles dianas de WRKY33
3. Generar las herramientas para obtener líneas transgénicas de sobreexpresión de FT de la familia WRKY

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Material vegetal

En este trabajo se utilizan distintas líneas mutantes de *A. thaliana* que provocan la pérdida de función por inserción de T-DNA, de FT pertenecientes a las familias WRKY y MYB (Tabla 2).

Tabla 2. Líneas mutantes de *A. thaliana* de pérdida de función de FT de las familias WRKY y MYB.

| Accession number | Nombre | Líneas | Tipo mutación | Referencia |
|------------------|--------|---------------------|---------------|-----------------------|
| AT2G38470 | WRKY33 | GABI 324B11 | T-DNA | (Rosso et al., 2003) |
| AT3G01970 | WRKY45 | GK-684G12.01 | T-DNA | (Rosso et al., 2003) |
| AT5G46350 | WRKY8 | SALK 107668.46.15.x | T-DNA | (Alonso et al., 2003) |
| AT5G49520 | WRKY48 | SALK 066438.52.75.x | T-DNA | (Alonso et al., 2003) |
| AT1G22640 | MYB3 | GABI 815G05 | T-DNA | (Rosso et al., 2003) |
| AT5G23000 | MYB37 | SALK 201021C | T-DNA | (Alonso et al., 2003) |
| AT4G12350 | MYB42 | SALK 003422C | T-DNA | (Alonso et al., 2003) |
| AT1G73410 | MYB54 | WiscDsLox485-488J18 | T-DNA | (Woody et al., 2007) |
| AT1G79180 | MYB63 | GK-765A08.09 | T-DNA | (Rosso et al., 2003) |
| AT3G12720 | MYB67 | GK-762D10.06 | T-DNA | (Rosso et al., 2003) |
| AT4G22680 | MYB85 | SALK 104777C | T-DNA | (Alonso et al., 2003) |

El control que se utiliza para todos los casos es Columbia-0 (Col0).

1.2. *Escherichia coli*

Para los clonajes realizados en este Trabajo Fin de Grado (TFG), se utiliza la cepa DH5 α de *Escherichia coli* (*E.coli*). Se trata de una cepa, que es muy utilizada para clonaje, debido a las siguientes características. Tiene un elevado rendimiento de transformación, permite una alta estabilidad del inserto debido a la mutación en *recA1*, y una buena calidad del ADN plasmídico gracias a una mutación en el gen *endA*. (*DH5 α Competent Cells* | Thermo Fisher Scientific - ES, n.d.).

1.3. *Agrobacterium tumefaciens*

Para transferir los plásmidos con la construcción de interés a *A. thaliana*, es necesario emplear la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*). En este TFG, se utiliza la cepa *A. tumefaciens* GV30, que tiene un rendimiento de transformación elevado.

2. Manipulación y crecimiento de *A. thaliana*

2.1. Esterilización de semillas

Se lleva a cabo una esterilización de semillas con el objetivo de eliminar posibles bacterias o virus presentes en las semillas que puedan afectar a la germinación de la semilla y al desarrollo completo de la planta.

Se esterilizan las semillas en su superficie mediante un tratamiento con una solución de etanol 70% (v/v) y detergente Triton X-100 0,1% (v/v). Las semillas se agitan durante 15 minutos a 21 rpm en el agitador rotatorio. Pasado este tiempo, se elimina la solución de etanol y se procede con tres lavados de agua destilada. Finalmente, se dejan durante 2 días a 4°C para favorecer la estratificación de la semilla.

2.2. Cultivo *in vitro*

Las semillas se siembran en 25 mL de medio sólido *Murashige Skoog*, MS en placas Petri de 9 cm de diámetro. El medio MS consiste en sales MS (*sigma-Aldrich*) al 0,4%, sacarosa al 1% (p/v) y 10 Mm de MES-Tris (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) pH 6,0. Se ajusta el pH a 5,7. Tras la siembra de semillas, las placas se sellan con cinta porosa adhesiva (Micropore) y se incuban en condiciones

controladas en la cámara de cultivo de 23°C, fotoperiodo de día largo (16 horas de luz al día), y una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.3. Cultivo en invernadero

Para obtener semillas de todas las líneas mutantes en las mismas condiciones, las plántulas de *A. thaliana* obtenidas en el cultivo *in vitro*, se transfieren a tierra y se cultivan en un sustrato mezcla de turba, vermiculita exfoliada y perlita. Se utilizan macetas circulares de 12 cm y se transfieren 5 plántulas por maceta. Las condiciones de cultivo son temperatura de 23°C, humedad relativa del 70%, fotoperiodo de día largo e intensidad lumínica aproximadamente de 130 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plantas se riegan 2 veces por semana.

2.4. Recolección y almacenamiento de semillas

Cuando *A. thaliana* ha completado su ciclo vital, y las semillas ya están maduras, las plantas se dejan secar durante una semana en la cámara de secado. Se separan las semillas de las silicuas y se almacenan en tubos Eppendorf de 1,5 mL a 4°C.

3. Cultivo y manipulación de microorganismos

3.1. Manipulación y crecimiento de *E. coli*

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido, se usan tubos de 13 mL con medio Luria Bertani (LB) líquido. El medio LB es una disolución acuosa de triptona 1%, al que se le añade extracto de levadura 0,5% y NaCl 1% a pH 7. La bacteria se inocula picando una colonia de una placa de medio LB sólido (LB+2% agar).

Para crecer *E. coli* en medio sólido, se usan placas de 9 cm de diámetro con medio LB junto con el antibiótico que permite seleccionar las bacterias que hayan incorporado el plásmido de interés, a las concentraciones indicadas a continuación.

Tabla 3. Antibióticos empleados y concentración final de cada uno en la placa

| Antibiótico | Concentración |
|-----------------|---------------|
| Ampicilina | 100 mg/mL |
| Cloranfenicol | 50 mg/mL |
| Kanamicina | 50 mg/mL |
| Espectinomicina | 100 mg/mL |
| Rifampicina | 50 mg/mL |

Asimismo, las placas se suplementan con Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido) (40 mg/L) e IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) (0,5 mM), para permitir la selección de colonias que han incorporado el inserto, mediante sistema de complementación alpha de la beta galactosidasa.

3.2. Preparación y transformación de células competentes

Se emplearon células competentes de *E. coli* “*Mix and go*” (*Zymo Research*). Se preparan 200 mL de medio SOB (2% p/v triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 3mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 10 mM MgSO₄) al que se la añaden 400 μL de un cultivo saturado de la cepa DH5 α de *E. coli*. Se incuba a temperatura ambiente hasta que presenta una densidad óptica de 0,4 a una longitud de onda de 600 nm.

Las células se centrifugan en frío durante 5 minutos a 5000 rpm, y se resuspenden en 10 mL de *Transformation Buffer* (TB) frío. Este buffer se obtiene a partir de 0,48% p/v Pipes (Piperazina-N,N'bis(2-ácido etanosulfónico)), 16 mM CaCl, 170 mM KCl, 40 Mm MnCl₂, y se ajusta a pH 6,7.

Se incuba en hielo 10 minutos y se centrifuga de nuevo en frío durante 5 minutos a 5000 rpm. Se resuspenden las células de *E. coli* en 10 mL de TB frío. Se añaden 750 μL de DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente se vuelve a incubar otros 10 minutos en hielo y se realizan alícuotas de 100 μL que se guardan a -80°C para su transformación posterior.

Para transformar las células, se toman 100 μL de células competentes, a las que se les añade 5 μL del producto de reacción del ensamblaje realizado. Posteriormente se mezcla bien y se mantiene durante 10 minutos en hielo, agitando cada 5 minutos. Se añaden 300 μL LB y se incuba 1 hora en agitación a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se añaden 300 μL del cultivo a placas de medio LB sólido con el antibiótico adecuado. Se extiende con bolitas de vidrio estéril para que el cultivo crezca de forma uniforme por la placa. Se dejan crecer las colonias a 37°C toda la noche.

Las cepas de *E. coli* que se han transformado y han incorporado el plásmido correctamente, se glicerinan y se almacenan en congeladores a -80°C. Para glicerinar las bacterias, se añaden 600 μL de glicerol al 50% a 1400 μL de cultivo. Tras invertir varias veces se almacenan a -80°C.

3.3. Transformación de *A. tumefaciens*

Se parte de una alícuota de 100 μL de células competentes de *A. tumefaciens*. Se añade el volumen de ligación correspondiente a 1 μg de plásmido, y se sumerge inmediatamente en nitrógeno líquido. Seguidamente se incuba durante 5 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, se añaden 900 μL de medio LB. Se incuba a 28°C durante 4 horas en agitación, a 220 rpm. Se añaden 200 μL del cultivo en placas de LB los antibióticos: rifampicina (100 mg/mL), gentamicina (50 mg/mL) y espectinomicina (50 mg/mL), para poder seleccionar aquellas bacterias que hayan incorporado el plásmido. Finalmente, se dejan crecer durante 2 o 3 días en oscuridad a una temperatura de 28°C.

3.4. Vectores de clonación y transformación empleados

Para realizar los clonajes, se utilizaron distintos vectores según el nivel de ensamblaje:

- Vector de entrada pUPD2 (nivel 0) (Figura 13): Es un vector de entrada a GB universal, que permite establecer un protocolo estándar para la domesticación de todas las partes (o fragmentos de ADN que se quieren clonar), gracias al código de 4 NT que se incorporan en cada parte mediante PCR. Está diseñado para aceptar fragmentos de ADN generados a partir de reacciones de digestión con enzimas de restricción de tipo IIS. El vector vacío pUPD2 contiene sitios de reconocimiento para las enzimas BsaI y BsmBI, que permiten la sustitución del gen LacZ de selección blanco/azul por el fragmento que se quiere clonar. Para introducir los fragmentos de ADN en pUPD2 se utiliza la enzima BsmBI, mientras que para extraer los fragmentos y hacer un ensamblaje multipartito en alpha, se digiere con BsaI.

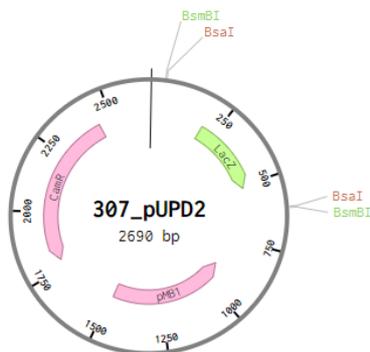


Figura 13. Vector pUPD2. Consta de las siguientes partes: pMB1: origen de replicación, camR: Gen de resistencia a cloranfenicol, LacZ: Fragmento Alpha de la beta galactosidasa.

- Vectores de destino GB:
 - Son los vectores destinatarios para unir los nuevos ensamblajes. Contienen el gen LacZ flanqueado por sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción de tipo IIS: BsmBI y BsaI. En la reacción de ensamblaje, el fragmento del gen LacZ será sustituido por la construcción específica. Existen distintos tipos de vectores destino:
 - o Vectores alpha (nivel 1):
 - Los vectores alpha se utilizarán para llevar a cabo el ensamblaje multipartito de la unidad transcripcional, mediante la digestión con BsaI. Dentro de los vectores alpha encontramos los siguientes subtipos: pDGB_α1, pDGB_α2, pDGB_α1R y pDGB_α2R. Se utilizan los dos últimos cuando interesa tener el fragmento en orientación reversa.
 - o Vectores omega (nivel 2):
 - Los vectores omega se utilizan como plásmidos de destino de varias unidades transcripcionales, mediante un ensamblaje binario, en el que participa la enzima BsmBI.

De forma análoga a los vectores alpha, existen cuatro subtipos: dos de orientación directa: pDGB_Ω1, pDGB_Ω2 y otros dos de orientación reversa: pDGB_Ω1R y pDGB_Ω2R.

4. Transformación de *A. thaliana*

Tras realizar los ensamblajes de cada unidad transcripcional y transferir las construcciones a *A. tumefaciens*, se transformaron plantas de *A. thaliana*. Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

De las placas que se han dejado crecer de *A. tumefaciens*, durante 2 o 3 días a 28°C, se pica una colonia, y se deja crecer durante 3-4 días hasta obtener un cultivo saturado. Se prepara un matraz con 200 mL de LB autoclavado al que se la añaden rifampicina (50 mg/mL), gentamicina (50 mg/mL) y espectinomicina (100 mg/mL). Se añade además 1 mL del cultivo saturado. Se deja crecer el cultivo a 28°C durante 24h. Se centrifuga el cultivo en tubos de centrifuga de 500 mL, a 5000 rpm durante 15 minutos. Se prepara una nueva disolución con 400 mL de agua milliQ y 20 g de sacarosa. Se disuelve y se añaden 80 µL del detergente *Silwet*. Se resuspende el pellet obtenido en los tubos de centrifuga con esta disolución de sacarosa y *Silwet*.

Se vierte el contenido del tubo de centrifuga en un recipiente de boca ancha. Se sumerge durante 20-30 segundos la parte aérea de *A. thaliana* en la solución preparada de *A. tumefaciens* asegurándose que las flores quedan dentro de la disolución. A continuación, para mantener la humedad, se tapa la planta con una bolsa de plástico ligeramente abierta por los externos superiores.

Es importante que antes de realizar la transformación de *A. thaliana* se hayan eliminado todas las silicuas que ya ha desarrollado la planta, para evitar recoger posteriormente semillas que no han habrán incorporado el plásmido.

Las plantas transformadas con las construcciones correspondientes son:

- Construcción pUb:WRKY33:Tnos: 2 plantas Col0 para sobreexpresión y 2 plantas *wrky33*.
- Construcción pUb:WRKY45:Tnos: 2 plantas Col0 para sobreexpresión y 2 plantas *wrky45*.
- Construcción pMUM:5'UTR:WRKY33:WRKY33:GUS:Tnos: 2 plantas Col0 para sobreexpresión y 2 plantas *wrky33*.
- Construcción pMUM:5'UTR:WRKY45:WRKY45:GUS:Tnos: 2 plantas Col0 para sobreexpresión y 2 plantas *wrky45*.

5. Técnicas de biología molecular

5.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Se inicia la extracción de DNA plasmídico partiendo de 3 ml de cultivo bacteriano en LB líquido. Se realiza el protocolo descrito por el kit comercial E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek, Inc.).

Una vez finalizado el protocolo, se procede con la cuantificación de DNA presente en la extracción, utilizando un dispositivo *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1 (NanoDrop Technologies, Inc.)*

5.2. Digestión enzimática de ADN plasmídico

Se utilizan distintas enzimas de restricción para comprobar, mediante una electroforesis posterior, si el plásmido incorporado es correcto.

Para la digestión enzimática, se parte de 300 ng de plásmido extraído y se añade 1,5 µL del buffer de la enzima, y 0,8 µL del enzima apropiado, completando con agua hasta alcanzar un volumen final de 15 µL. Se incuba la muestra durante 1 hora y 30 minutos a 37°C.

Se utilizó el software *Benchling* (www.benchling.com) para realizar una digestión virtual *in silico*, que permite, en primer lugar, seleccionar el enzima apropiado para realizar la digestión, y en segundo lugar, comparar la digestión virtual esperada con el resultado obtenido tras correr el resultado de la digestión en un gel de agarosa.

5.3. Electroforesis en gel de agarosa

Tras la reacción de digestión, se comprueba el número y tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos mediante una electroforesis en gel de agarosa.

Para la separación del ADN mediante electroforesis, se usan geles con TAE 1x (40 mM Tris-acetato y 1 mM de EDTA, pH 8,3), agarosa al 1% y 1% de bromuro de etidio. Si los tamaños de ADN son menores a 400 pb, entonces se emplean geles con 1,5% de agarosa.

El marcador de peso molecular que se utilizó para estimar los tamaños de los fragmentos amplificados fue *Gene ruler kb Plus DNA Ladder* (ThermoScientific®).

Se aplica un voltaje de 90 V durante 10-15 minutos. Se visualiza el gel en un transiluminador con iluminación ultravioleta.

5.4. Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa

5.4.1. Extracción de RNA de semilla y tratamiento con DNAsa

Las silicuas congeladas a -80°C son el material de partida para la extracción de RNA de semillas en desarrollo (10-14 días post-polinización). Se vierten las silicuas en un mortero con nitrógeno líquido. Con un tamizador, se separan las semillas de las vainas. Se trituran con fuerza las semillas y se enfrían de nuevo en nitrógeno líquido. Se añaden 550 µL de buffer de extracción (LiCl 0,4 M, Tris 0,2 M pH 8, EDTA 25 mM y SDS 1%) y 550 µL de cloroformo. Se centrifugan 3 minutos a 11000 rpm a una temperatura de 4°C. Tras recuperar el sobrenadante se añaden 700 µL de fenol cloroformo. Se centrifuga a 11000 rpm durante 3 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se le añade 1/3 de su volumen de LiCl 8M. Se deja precipitar overnight a 4°C. Posteriormente se centrifuga 30 min, se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en 500 µL de agua Milli-Q. Se añaden 7 µL de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 250 µL de etanol absoluto. Se centrifuga a 11000 rpm 10 minutos para eliminar los posibles carbohidratos. Se toma el sobrenadante y se le añade 43 µL de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 750 µL de etanol absoluto. Se deja la muestra a -20°C durante al menos dos horas. Se centrifuga durante 20 min a 4°C y se secan los restos de etanol mediante aspiración. Finalmente, se resuspende el pellet en 30 µL de H₂O milliQ.

Tras la extracción de RNA de semillas, se lleva a cabo un tratamiento con DNAsa, según el protocolo del kit E.Z.N.A®. Plant RNA Kit Quick Guide (Omega Bio-Tek, para evitar posibles amplificaciones de DNA genómico, que pudieran interferir en los resultados de expresión génica a nivel de RNA.

5.4.2. Extracción de RNA de hoja senescente

En el caso de extracción de ARN de hoja se sigue el protocolo del kit E.Z.N.A.®. Plant RNA Kit Quick Guide (Omega Bio-Tek®).

Para la obtención del extracto, se añaden 12 bolitas de vidrio al Eppendorf que contiene la muestra de hoja y se tritura en el homogeneizador (*Retsch Mill MM400*). Se añade a cada muestra 500 µL de Buffer RB y 10 µL de beta-mercaptoetanol. A continuación, se toma el sobrenadante y añade 1 volumen de etanol. Se transfiere este extracto a una columna '*HiBind*' del kit y se siguen las instrucciones del mismo, incluyendo el tratamiento con DNAsa, hasta obtener la muestra de RNA.

5.4.3. Síntesis de cDNA

Para llevar a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído, se utilizó el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR*.

Se calcula el volumen necesario para cada muestra equivalente a 1 µg de RNA tratado con DNAsa, y se completa hasta alcanzar un volumen de 15 µL. Se añaden 4 µL de 5X *Reaction Mix* y 1 µL de la enzima *Maxima Enzyme Mix*. El volumen final de la reacción es de 20 µL. Se incuban las muestras en el termociclador con el programa siguiente: 10 min a 25°C, 30 min a 50°C y 5 min a 85°C.

5.5. qRT-PCR

5.5.1. Oligonucleótidos cebadores para qRT-PCR

Se diseñan cebadores específicos para cada gen de interés con las siguientes características: su producto de amplificación debe tener un tamaño entre 100 y 200 bp, la longitud de los primers debe ser alrededor de 24 nucleótidos, temperatura de melting alrededor de los 58°C, porcentaje de GC aproximadamente 50%, y procurar que acaben en G o C para lograr una mayor estabilidad. Para evitar la amplificación de ADN genómico (gDNA) uno de los cebadores se diseña con nucleótidos correspondientes a dos exones contiguos (cebador partido). De esta forma no es posible la amplificación de ADN genómico porque dicho cebador hibridará únicamente en el cDNA y no en el gDNA, debido a la presencia de intrones en este último.

Empleando la herramienta “*oligoanalyzer tool*” de IDT (web) se comprueba que los primers no formen dímeros ni *hairpins*. Para comprobar la especificidad de los cebadores, se realiza un *blast* de cada cebador contra el genoma de *A. thaliana* en la base de datos de TAIR (*The Arabidopsis Information Resource, web*), para evitar amplificar otros posibles genes de la misma familia génica o con homología.

5.5.2. Condiciones de la qRT-PCR

Para analizar la expresión génica en las semillas de plantas mutantes *wrky33* se lleva a cabo una qRT-PCR en placas de 96 pocillos.

Se preparan soluciones madre que deben tener por pocillo: 6,2 µL de agua milliQ, 2 µL de enzima *PyroTaq*, 0,4 mM de primer directo y 0,4 mM de primer reverso. Además, se añade 1 µL del cDNA correspondiente. Para cada muestra se realizan 3 réplicas técnicas y tomamos el gen ASAR1 como gen constitutivo (Bar-Peled et al., 1995).

Se realizó la reacción de qRT-PCR en el equipo QuantStudio-3 (*Thermo Fisher Scientific*), de acuerdo con el siguiente programa:

- 2 min a 50°C
- Desnaturalización inicial: 10 min a 95°C
- 40 ciclos:
 - o 15 s a 95°C
 - o 30 s a 55°C
 - o 30 s a 72°C. En esta última etapa de cada ciclo se mide la fluorescencia, para poder construir la curva de amplificación.
- Curva de melting que consta de 3 pasos:
 - o 15 s a 95°C
 - o 1 min a 60°C
 - o 15 s a 95°C

La curva de melting se realizó para comprobar que no hubiera amplificaciones inespecíficas.

6. Técnicas de clonaje modular GoldenBraid (GB)

La técnica de clonaje modular de GB, es un sistema de ensamblaje modular de secuencias de ADN, que se lleva a cabo en tres etapas: domesticación, ensamblaje multipartito y ensamblaje binario (ver introducción punto 6).

6.1. Domesticación de secuencias (nivel 0)

Para domesticar las secuencias de interés *in silico*, se utiliza el software de Golden Braid 4.0 (<https://goldenbraidpro.com/>). Se introduce en el programa la secuencia del fragmento a clonar, se indica la categoría del fragmento (promotor, UTR, CDS, terminador...), y las enzimas de restricción que se van a utilizar (BsaI y BsmBI); y el propio software genera dos archivos distintos: un documento de texto con el protocolo a seguir y otro con la secuencia del plásmido unido al fragmento de interés.

El proceso de domesticación en bancada consta de diferentes pasos:

- a) PCR para clonación, empleando la polimerasa *Phusion*, de alta fidelidad.

Para cada reacción se prepara una solución madre con los siguientes reactivos:

| | |
|-----------------------------|--------|
| 5x HF buffer: | 10 µL |
| DMSO: | 1,5 µL |
| dNTPs (10mM): | 1 µL |
| Cebador directo* (10uM): | 2,5 µL |
| Cebador reverso* (10uM): | 2,5 µL |
| Polimerasa <i>Phusion</i> : | 0,5 µL |
| H ₂ O: | 31 µL |

En tubos de 0,2 mL se ponen 49 µL de la mezcla de PCR y 1 µL del cDNA molde (50 ng/µL).

Se colocan en el termociclador que sigue el siguiente programa:

- 30 s a 98°C
- 35 ciclos de:
 - o 10 s a 98°C
 - o 20 s a la T_m (temperatura de melting correspondiente de los cebadores).
 - o Tiempo de elongación a 72°C (el tiempo de elongación dependerá de la longitud del producto de PCR amplificado: 40s por cada kilobase a amplificar).
- 5 min a 72°C

- b) Purificación de productos de PCR

El producto de PCR obtenido, se purificará corriendo la muestra en un gel de electroforesis y siguiendo un protocolo de extracción de DNA del gel de agarosa, concretamente el del kit *NZYGelpure*, utilizando columnas NZYtech. Finalmente se cuantifica el ADN extraído utilizando un *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1* (*NanoDrop Technologies, Inc.*), y se almacena a -20°C.

- c) Ensamblaje en vector pUPD2

Tras obtener el producto de PCR purificado se procede a introducirlo dentro del vector pUPD2.

Para ello se añaden los siguientes reactivos en un tubo de 0,2 mL:

- 60 fmol del producto de PCR purificado
- 20 fmol del plásmido pUPD2
- 1,5 µL de BSA (0,1 mg/mL)
- 0,8 µL BsmBI
- 0,8 µL T4 ligasa (Promega)
- H₂O hasta los 15 µL

Para conocer el volumen correspondiente a X fmol, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen equivalente} = X \cdot 10^{15} \cdot (\text{longitud en NT fragmento}) \cdot \text{Masa media NT} \cdot 10^9$$

Siendo NT: nucleótido y la masa molecular media de los nucleótidos 617,96 g/mol.

Finalmente se introducen los tubos en el termociclador con este programa:

- 35-40 ciclos de:
 - o 3 min a 37°C
 - o 4 min a 16°C
- 10 min a 50°C
- 10 min a 80°C

Se mantienen a 4°C hasta su posterior utilización para transformar células de *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado XX. Para comprobar que la domesticación ha funcionado correctamente, se realiza digestión de plásmido y electroforesis. Las colonias con el patrón de bandas esperado son secuenciadas, para asegurarse de que la PCR no ha introducido ninguna mutación en la secuencia a clonar.

6.2. Ensamblaje multipartito (nivel 1)

En este trabajo hemos obtenido 4 unidades transcripcionales distintas, para las que hemos utilizado partes domesticadas por este proyecto y partes de la propia colección de GB. En la siguiente tabla (Tabla 4) quedan reflejadas todas las partes básicas utilizadas para llevar a cabo el ensamble multipartito en vectores alpha.

Tabla 4. Partes utilizadas domesticadas para el ensamblaje multipartito, su descripción y su categoría dentro de la gramática de GB.

| Origen | Descripción | Categoría GB |
|-------------------------|---------------|--------------|
| Base datos GB (GBxx) | pUbiq | A1-B2 |
| Domesticado en este TFG | pMUM | A1-A2 |
| Domesticado en este TFG | 5' UTR WRKY33 | A3-B2 |
| Domesticado en este TFG | 5' UTR WRKY45 | A3-B2 |
| Domesticado en este TFG | WRKY33 | B3-B5 |
| Domesticado en este TFG | WRKY45 | B3-B5 |
| Domesticado en este TFG | WRKY 33 | B3-B4 |
| Domesticado en este TFG | WRKY 45 | B3-B4 |
| Domesticado en este TFG | GUS | B5 |
| Base datos Gb (GB0037) | Tnos | B6-C1 |

Los ensamblajes realizados pretenden expresar los FT WRKY33 y WRKY45 bajo el control de un promotor constitutivo (promotor ubiquitina10) y uno específico de testa de la semilla (MUM4), (Dean et al., 2017). En ambos casos se emplea el terminador *Tnos*, muy empleado en plantas.

Para ensamblar las distintas partes, se añade en un tubo Eppendorf el volumen correspondiente a 20 fmol de cada plásmido con la parte que queremos incluir dentro de la unidad transcripcional. Se añaden además 1,5 µL de tampón ligasa 10x, 1,5µL de albúmina de suero bovino (BSA) (1 mg/mL), 0,8 µL de la enzima BsaI (10 U/µL), 0,8 µL de la enzima T4 ligasa (1-3 Weiss units/µL) y agua hasta completar un volumen final de 15 µL. Se incuba en el termociclador con el siguiente programa:

- 35 ciclos de:
 - o 3 min a 37°C
 - o 4 min a 16°C
- 10 min a 50°C
- 10 min a 80°C

Una vez finalizado el ensamblaje se mantiene a 4°C hasta su posterior utilización para transformar células de *E. coli*.

6.3. Ensamblaje binario (nivel 2)

Para cada ensamblaje binario se añaden los siguientes reactivos en un tubo de 0,2 mL:

- 20 fmol de la UT1 (unidad transcripcional 1) en alpha2
- 20 fmol de la UT2 en alpha1R
- 20 fmol plásmido omega1
- 1,5 µL buffer ligasa
- 1,5 µL BSA (0,1 mg/mL)
- 0,8 µL BsmBI
- 0,8 µL T4 ligasa
- H₂O hasta 15 µL.

Al igual que en el ensamblaje multipartito previo, se lleva al termociclador y se utiliza el siguiente programa:

- 35 ciclos de:
 - o 3 min a 37°C
 - o 4 min a 16°C

- 10 min a 50°C
- 10 min a 80°C

El producto ensamblado se mantiene a 4°C hasta su utilización para transformar células de *E. coli*. El correcto ensamblaje se comprueba con una PCR de colonia en la que se amplifica directamente de la colonia de *E. coli* transformada. Se usa un cebador directo que hibrida con el promotor y un cebador reverso que hibrida con la secuencia codificante de WRKY33/45 en cada caso. La reacción de PCR se lleva a cabo con los siguientes reactivos:

| | |
|------------------------------|---------|
| 10x <i>Reaction buffer</i> : | 2 µl |
| dNTP mix 10 mM: | 0,4 µl |
| Cebador directo 4 mM | 0,8 µl |
| Cebador reverso 4 mM | 0,8 µl |
| DNA polimerasa | 0,5 µl |
| Agua milliQ | 15,5 µl |

Una vez realizada la PCR de colonia se corren los productos amplificados en un gel de agarosa al 1,5%. Finalmente se corrobora si el producto amplificado se corresponde con el esperado.

7. Caracterización de semillas

7.1. Ensayo envejecimiento acelerado (CDT)

Para simular un envejecimiento acelerado en las semillas, se ponen 25 mg de semillas de cada genotipo en tubos Eppendorf de 0,5 mL que se dejan abiertos dentro de un recipiente hermético a 37°C y una humedad relativa del 75%. La humedad relativa, se consigue preparando una disolución de NaCl saturada en un vaso de precipitados que se coloca en el interior del mismo recipiente donde se encuentran las semillas. Para cada genotipo de semillas, se preparan 5 lotes de tubos distintos para los distintos tiempos a analizar: t0, t9, t14, t21 y t28, que hacen referencia al número de días que se encuentran sometidas a las condiciones de alta temperatura y humedad.

Pasado dicho tiempo, se esterilizan las semillas y se estratifican durante 2 días a 4°C. Se siembran 90 semillas de cada genotipo y se dejan crecer a 23°C durante 9 días. Se procede a cuantificar el porcentaje de germinación a los 9 días de la siembra, tomando como germinadas aquellas plántulas que presentan los cotiledones verdes y abiertos. Posteriormente se calculó la media de las 3 réplicas biológicas, así como la desviación estándar y el error típico. Asimismo, se realizó una prueba estadística t-test para comprobar cada genotipo con el control Col0.

7.2. Ensayo de permeabilidad

Para estudiar cómo de permeables son las semillas de cada genotipo, se realizó un estudio de permeabilidad con sales de tetrazolio (*2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride*). Cuando el tetrazolio atraviesa la testa de la semilla y llega al embrión, es reducido por la enzima NADH deshidrogenasa a formazán, un compuesto de color rojizo. De esta manera midiendo la absorbancia de las muestras se puede cuantificar el grado de permeabilidad de las semillas (Debeaujon et al., 2000).

Para realizar este ensayo se pesan 25 mg de cada accesión de semillas de *A. thaliana* y se colocan en un tubo Eppendorf de 2 mL. Por otro lado, se prepara una disolución de tetrazolio al 1% (p/v) en un vaso de precipitados y se mezcla bien con un agitador magnético. Una vez disuelto, se añade a cada tubo 500 µL de esta disolución. Se mantienen durante 3 o 4 días a 30°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se procede con dos lavados con agua milliQ. Se homogenizan las semillas en el homogeneizador y se mide la absorbancia de las muestras en una placa ELISA utilizando un espectrofotómetro TECAN monocromador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización de mutantes de pérdida de función en factores de transcripción de la familia MYB

1.1. Estudio de la expresión *in silico*

Como primer paso en la caracterización, analizamos el nivel de expresión de cada FT de la familia MYB en semilla, que es donde queremos estudiar su función. Para ello se usó la base de datos *The Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). Se estudió la expresión *in silico* de FT elegidos en base a dos criterios distintos (apartado 7.1 de Introducción):

- FT que estaban menos expresados según los resultados del RNAseq realizado en el doble mutante *tt3tt7* específico de testa. Entre ellos se encuentran MYB37, MYB42, MYB54, MYB67 y MYB85 (Figura 14a).
- FT que regulaban genes reprimidos en el mutante según dicho RNAseq, como MYB3 y MYB63, predichos por el software TF2Network (Figura 14b).

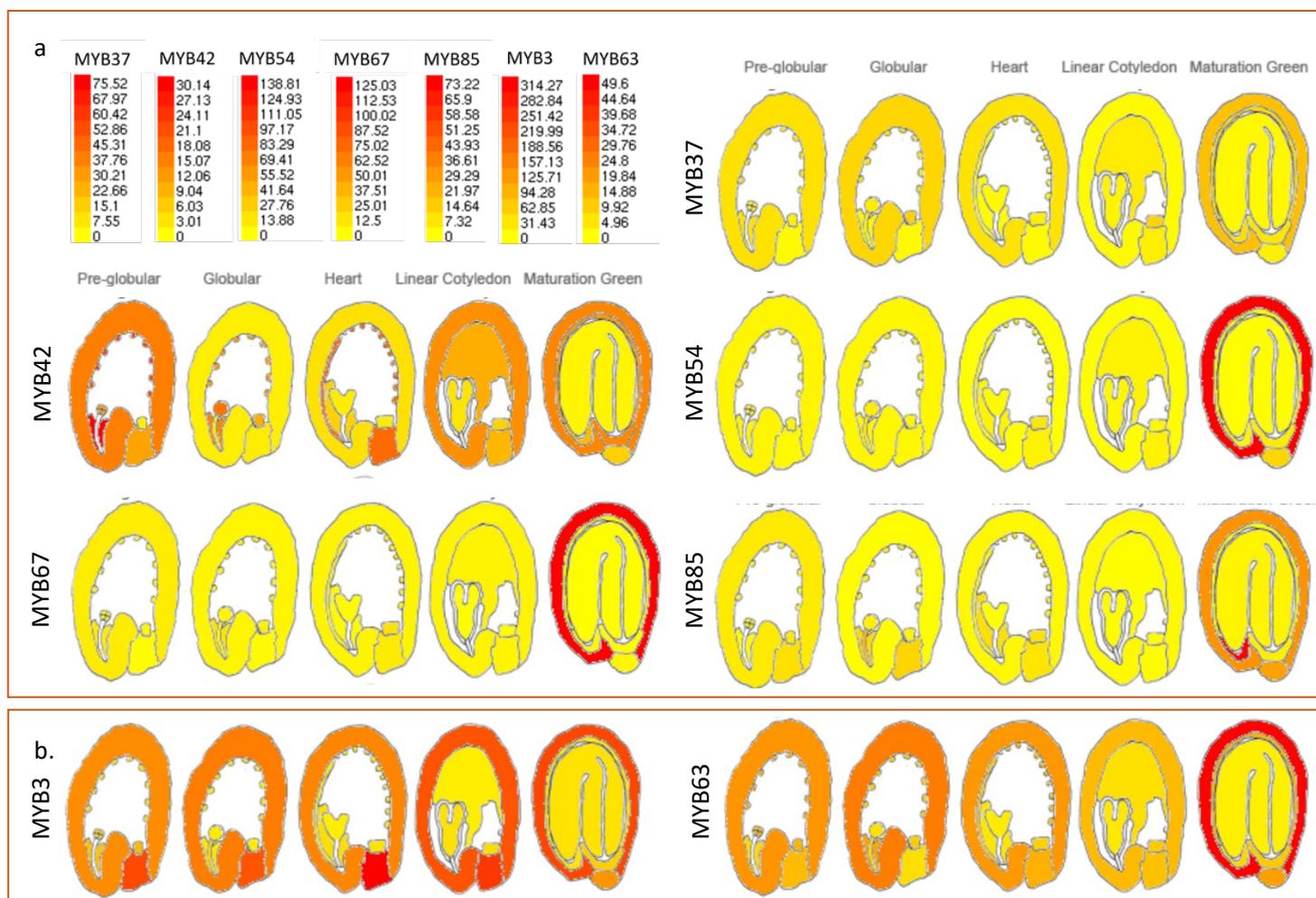


Figura 14. Expresión *in silico* de los FT de la familia MYB **a.** MYB37, MYB42, MYB54, MYB67 y MYB85. **b.** MYB3 y MYB63 en semilla. **c.** Leyenda de los tejidos de la semilla. Obtenida de *The Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).



La Figura 14 muestra que los FT más expresados (rojo) en la cubierta de la semilla son *MYB3*, *MYB54* y *MYB67*. Mientras que *MYB63* (Figuras 14b), se encuentra expresado de forma continua a lo largo de las distintas fases de desarrollo de la semilla, *MYB54* y *MYB67* únicamente se expresan en el último estado de maduración (Figura 14a). *MYB42* y *MYB63* también se expresan de forma continua en la cubierta de la semilla, pero en menor medida. *MYB85* tiene una ligera expresión en la cubierta de la semilla durante la última etapa de maduración de la semilla. Finalmente, *MYB37* tiene niveles de expresión bajos o ausentes en este tejido en las distintas etapas de desarrollo de la semilla (amarillo) (Figura 14a).

1.2. Ensayo de envejecimiento acelerado (CDT)

Siguiendo con la caracterización funcional, se quiso ver el comportamiento de las semillas mutantes *myb* tras el CDT de semilla.

Para ello, las semillas se sembraron en placa tras ser sometidas al CDT durante distintos periodos de tiempo (entre 0 y 28 días). Diez días después de la siembra, se determinó el porcentaje de plántulas establecidas.

Aunque se analizaron el conjunto de mutantes *myb* con el mismo control, para facilitar la visualización de los datos, hemos representado los datos manteniendo la división anterior: por un lado, los FT menos expresados en el RNAseq de testa del doble mutante *tt3tt7* (Figura 15a) y por otro, los FT MYB que regulaban los genes menos expresados en el mutante *tt3tt7* según el resultado del mismo RNAseq (Figura 15b).

En la Figura 15a y b, podemos observar que conforme aumentan los días de envejecimiento, se observa un menor porcentaje plántulas establecidas. Tanto el control Col0 como los mutantes *myb*, presentan un porcentaje de germinación del 100% en ausencia de envejecimiento (día 0), a excepción de *myb54*, cuya germinación inicial está algo reducida (80%). Tras 28 días de CDT se observa que ya no germina nada. Sin embargo, sí que se observan diferencias significativas tras 14 y 21 días de CDT. Para observar mejor los resultados, se ilustra el porcentaje de plántulas establecidas para los mutantes de FT MYB menos expresados en *tt3tt7* y su respectivo control Col0 tras 14 días (Figura 15c) y 21 días (Figura 15d) de CDT.

Tras 14 días de CDT (Figura 15c), se observaron diferencias significativas para varios mutantes como *myb42* y *myb67* (en torno a 87%), y *myb85* (alrededor de 77%), mientras que Col0 presentaba aproximadamente un 100% de plántulas establecidas. A día 21 (Figura 15d) se continuó viendo diferencias significativas para *myb85* (aproximadamente 25%) y *myb54* (alrededor de 20%) frente a Col0 que tiene cerca de 52% de plántulas establecidas.

Para los FT que regulaban genes menos expresados en la cubierta de *tt3tt7* (Figura 15b), se observó que a día 14, tanto *myb3* (alrededor de 89%) como *myb63* (aproximadamente 94%) presentaban porcentajes de plántulas establecidas significativamente menores al control. A día 21, mantuvieron las diferencias de *myb3* (aproximadamente 30%) y *myb63* (alrededor de 40%) con respecto a Col0 (aproximadamente 50%).

Por lo tanto, la tendencia general observada tras el ensayo CDT en semillas de mutantes *myb*, es que la pérdida de función de estos FT provoca una reducción en el porcentaje de plántulas establecidas, y por lo tanto una menor longevidad.

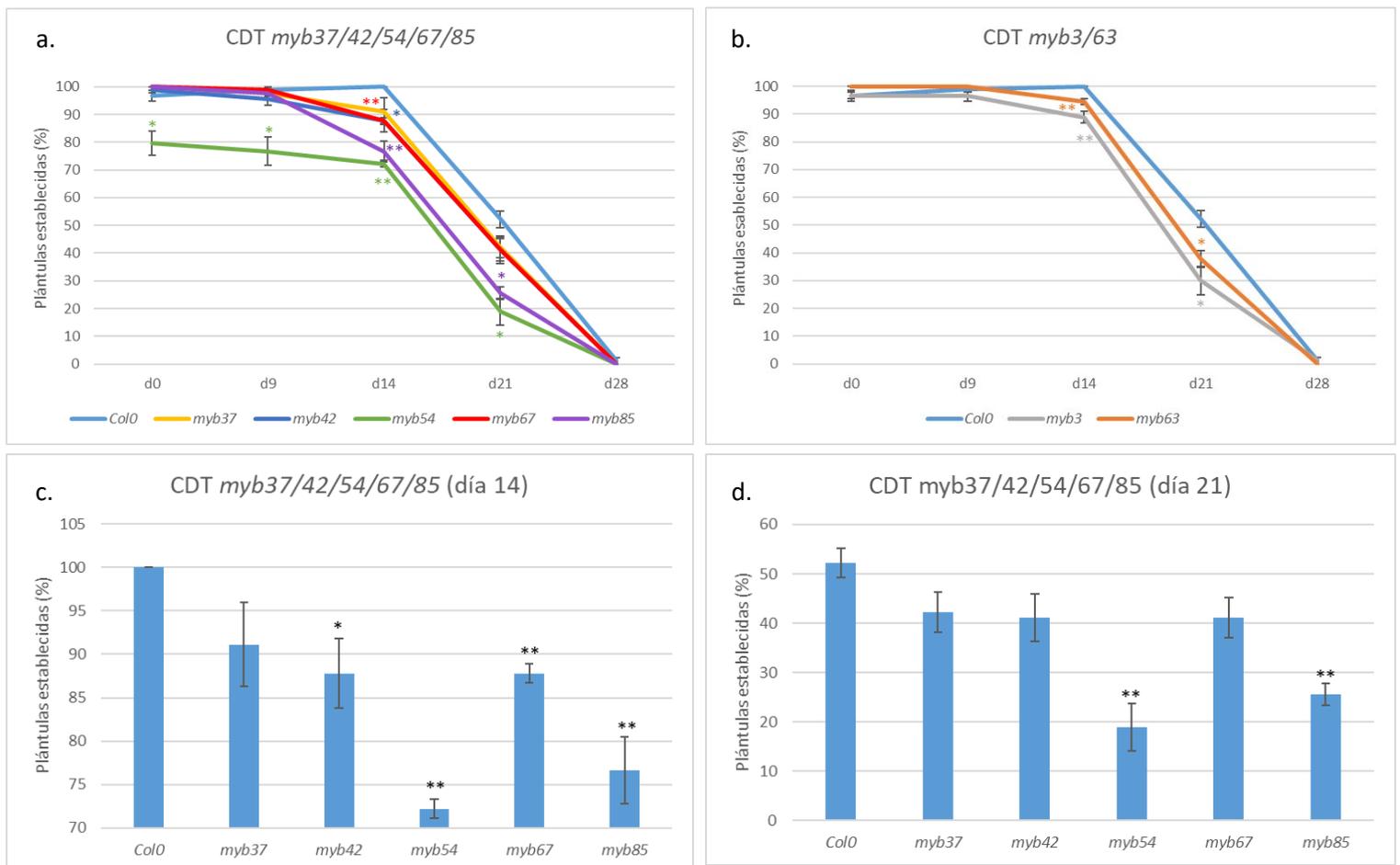


Figura 15. Ensayo CDT en semillas de mutantes MYB. Porcentaje de plántulas establecidas a partir de las semillas envejecidas durante 0, 9, 14, 21 y 28 días, contado 10 días tras su siembra en placas Petri. **a.** Mutantes de FT MYB menos expresados en *tt3tt7* según el RNAseq. **b.** Mutantes de FT MYB que regulan genes menos expresados en *tt3tt7*. **c.** Porcentaje de plántulas establecidas tras 14 días de CDT en mutantes de FT MYB que regulan genes menos expresados en *tt3tt7*. **d.** Porcentaje de plántulas establecidas tras 21 días de CDT en mutantes de FT MYB que regulan genes menos expresados en *tt3tt7*. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas en base a una prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha < 0,05$. (*) o $\alpha < 0,01$ (**).

1.1. Ensayo de toma de tetrazolio

Dado que, como se ha comentado en la introducción, algunos FT de la familia MYB están implicados en la síntesis de algunos componentes que forman parte de la cubierta de la semilla, como la lignina de la pared celular, se quiso estudiar la permeabilidad de la cubierta de las semillas de estos mutantes.

Además, como se observó una menor longevidad en mutantes *myb*, se quiso comprobar si la pérdida de viabilidad era debido a una mayor permeabilidad de su cubierta. Para ello, llevamos a cabo el ensayo de toma de tetrazolio (Figura 16). Transcurrido el tiempo de incubación con sales de tetrazolio, se homogenizaron las semillas y se observó a simple vista una gran diferencia en la coloración del homogenizado de las semillas de los mutantes *myb63*, *myb54* y *myb3*; y en menor medida *myb85* y *myb67* (Figura 16a). Para analizar los datos de forma cuantitativa, se midió su absorbancia con un espectrofotómetro TECAN monocromador. Los resultados de absorbancia obtenidos quedan reflejados en la Figura 16b.

Queda de manifiesto la gran diferencia de permeabilidad observada para el mutante *myb63*. MYB63 es uno de los FT implicado en la síntesis de lignina (Zhou et al., 2009). Es decir, al quedar afectado el gen que codifica para MYB63, se reduce la síntesis de lignina y como consecuencia, la cubierta de la testa se encuentra desestructurada y no correctamente permeabilizada. De entre todos los mutantes estudiados

myb63, es el que tiene un fenotipo más marcado por su pared celular desestructurada y elevada permeabilidad. Esto se traduce en una longevidad reducida, como se muestra en la figura 15b. Sin embargo, su longevidad no se reduce tanto como aumenta su permeabilidad, por lo que este mutante debe compensar de algún modo la elevada falta de permeabilidad de su cubierta.

El mutante *myb85* presenta una permeabilidad significativamente mayor con respecto al control (Figura 16b). El FT MYB85 también está implicado en la síntesis de lignina (Zhou et al., 2009), y por lo tanto su mutante tendrá afectada la cubierta de la semilla, lo que podría estar provocando la menor longevidad de las semillas observadas en el ensayo CDT.

A pesar de que tanto *MYB63* como *MYB85* han sido implicados en biosíntesis de lignina, el efecto de *MYB63* sobre la permeabilidad es mucho mayor. Posiblemente, este FT actúe también sobre otros componentes de la cubierta por lo que su pérdida de función altere en mayor medida su desarrollo y, consecuentemente, su permeabilidad.

El ensayo en el mutante *myb3* presenta una absorbancia que es significativamente mayor a la del control (alrededor de 0,25 frente a 0,1). MYB3 es un FT que actúa como regulador de la ruta de las fenilalaninas que son precursores tanto de flavonoides como de lignina. Los flavonoides y la lignina son componentes de la cubierta que determinan su permeabilidad (D. Kim et al., 2022). Los resultados obtenidos para este mutante para el ensayo de CDT fue una menor longevidad respecto al control, y para el ensayo de toma de tetrazolio una mayor permeabilidad en comparación con Col0. Es decir, parece lógico que la elevada permeabilidad del mutante sea la causante del fenotipo de una menor longevidad.

En la toma de tetrazolio, *myb54* resultó tener en el ensayo una gran diferencia de absorbancia (cerca de 0,48) frente al control (alrededor de 0,1). MYB54 es un regulador positivo del engrosamiento de la pared celular de la semilla, y regula la síntesis de lignina, xilano y celulosa (Dubos et al., 2010) (ver apartado 5 de Introducción). Una mutación en *MYB54* provoca una mayor permeabilidad de la semilla debido a la alteración del engrosamiento de la pared celular. Esto concuerda con la sensibilidad al CDT que muestra el mutante (Figura 15a, c, d).

El mutante *myb67* también presenta una mayor permeabilidad que el control (presenta una absorbancia dos veces mayor que la de Col0). MYB67 es un FT que regula de ruta de biosíntesis de los flavonoides (Rains et al., 2018), y por ello podría tener implicaciones en la correcta formación y establecimiento de la cubierta. Además, tras 14 días de CDT, presentaba un menor porcentaje de plántulas establecidas, lo que parece indicar que la mayor permeabilidad de las semillas de este mutante sean la causa de su menor longevidad.

Las semillas mutantes *myb42* no dieron diferencias significativas en el ensayo de permeabilidad con su control Col0 (Figura 16b). Dado que MYB42 ha sido previamente implicado en la formación de lignina, la ausencia de fenotipo muestra que estos FT de la familia MYB actúan de forma redundante, por lo que sería necesario analizar dobles, triples o cuádruples mutantes para poder observar los fenotipos más claramente. Los investigadores Geng et al., 2020, demostraron que los FT MYB20, MYB42, MYB43 y MYB85 actuaban de forma redundante activando la ruta de síntesis de fenilalanina y de la lignina. Todos ellos reprimen MYB4, que reprime el inicio de la ruta de biosíntesis de los flavonoides, de forma que favorece la síntesis de lignina a partir de fenilalanina (Geng et al., 2020). Es decir, la redundancia de algunos de los FT MYB es la causa de no ver diferencias significativas en el ensayo de permeabilidad y en el CDT en las semillas de algunos de los mutantes estudiados.

En resumen, los FT de la familia MYB contribuyen al correcto desarrollo de la cubierta de la semilla, determinando su permeabilidad y, consecuentemente, su longevidad. Por tanto, la baja expresión de estos FT en el doble mutante *tt3tt7*, puede explicar, al menos parcialmente, su alteración en el desarrollo de la testa y su reducida longevidad.

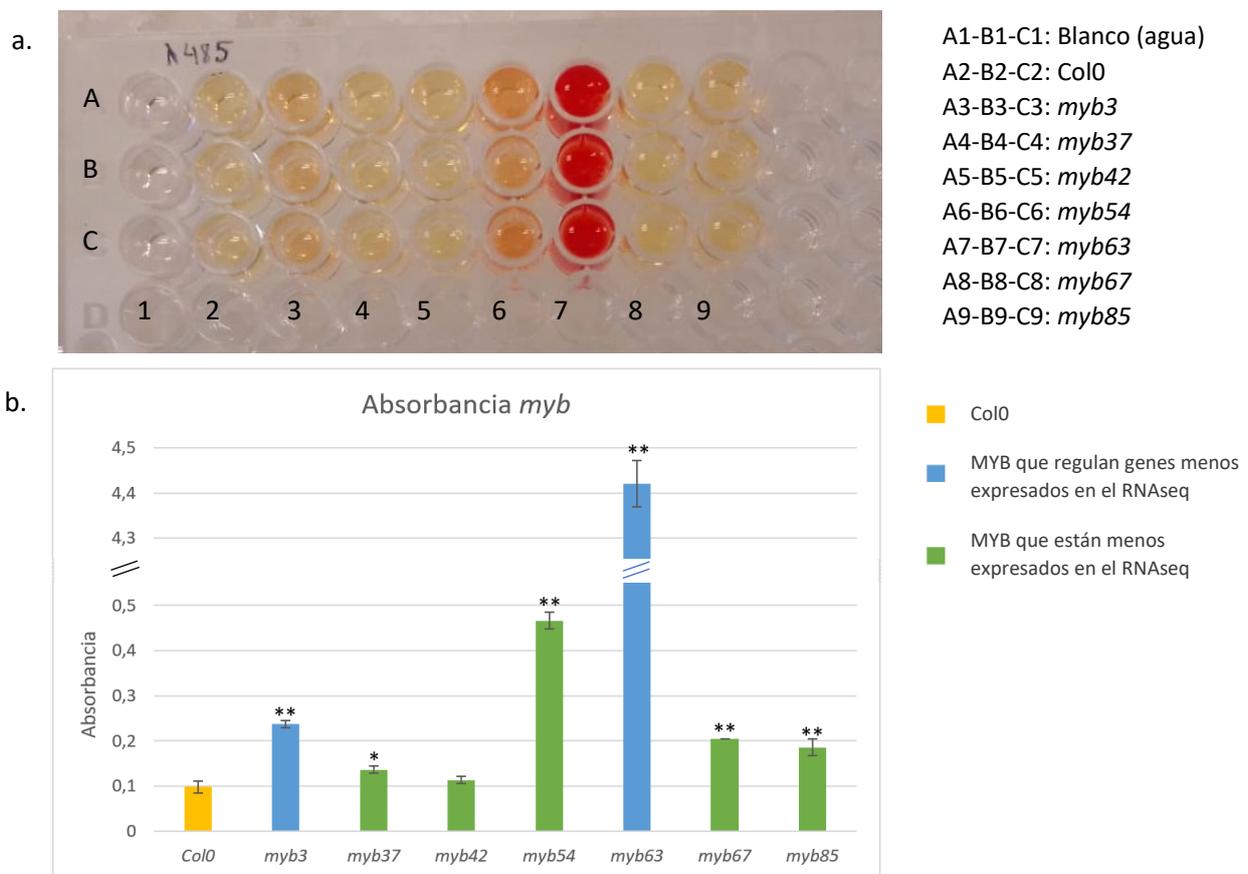


Figura 16. Ensayo de permeabilidad en semillas de mutantes *myb*. **a.** Placa ELISA para medir la absorbancia del homogenizado de semillas mutantes para distintos FT MYB. **b.** Absorbancia medida en el espectrofotómetro TECAN monocromador para las distintas semillas mutantes *myb*. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas en base a una prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha < 0,05$. (*) o $\alpha < 0,01$ (**).

2. Caracterización de mutantes de pérdida de función en factores de transcripción de la familia WRKY

2.1. Estudio de expresión *in silico*

Realizamos el mismo procedimiento que habíamos realizado previamente para estudiar los mutantes *myb*. Para empezar la caracterización de los mutantes de pérdida de función de FT de la familia WRKY, queremos ver si dichos FT se expresan en semilla. Se estudió la expresión *in silico* de los FT elegidos en base a dos criterios distintos (apartado 7.1):

- FT que estaban más expresados en el RNAseq realizado en el doble mutante *tt3tt7* específico de testa. Entre ellos se encuentran WRKY33, WRKY8 y WRKY48.
- FT que regulaban genes más expresados predichos por el software TF2Network, como WRKY45 y WRKY33 (de nuevo) (Figura 17).

Se realizó una búsqueda de los niveles de expresión de estos FT en los distintos tejidos o compartimentos de la semilla (Figura 17). Para ello se utilizó la base de datos de *The Bio-Analytic Resource for Plant Biology* (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

De forma general, los FT WRKY estudiados presentan niveles de expresión bajos. De forma más concreta WRKY33 y WRKY8 son los que presentan mayores niveles de expresión en semilla. WRKY33 se expresa en cubierta al final del desarrollo de la semilla, mientras que WRKY8 se expresa

principalmente en el endospermo micropilar. WRKY45 se expresa principalmente en la cubierta y en la chalaza de la cubierta de la semilla, en estado de cotiledón. Por último, WRKY48 presenta una baja expresión en la cubierta y en el endospermo de la periferia. Además, presenta expresión en el embrión hasta estado corazón, en la chalaza de la cubierta durante todo el desarrollo y en el endospermo micropilar en la semilla madura (Figura 17).

Por lo tanto, en general los FT WRKY se expresan en niveles bajos en la semilla, por lo que su alta expresión en estos tejidos observada en el mutante *tt3tt7* podría ser parcialmente responsable de sus fenotipos, o por el contrario, podría ser una respuesta para tratar de restaurar un fenotipo silvestre.

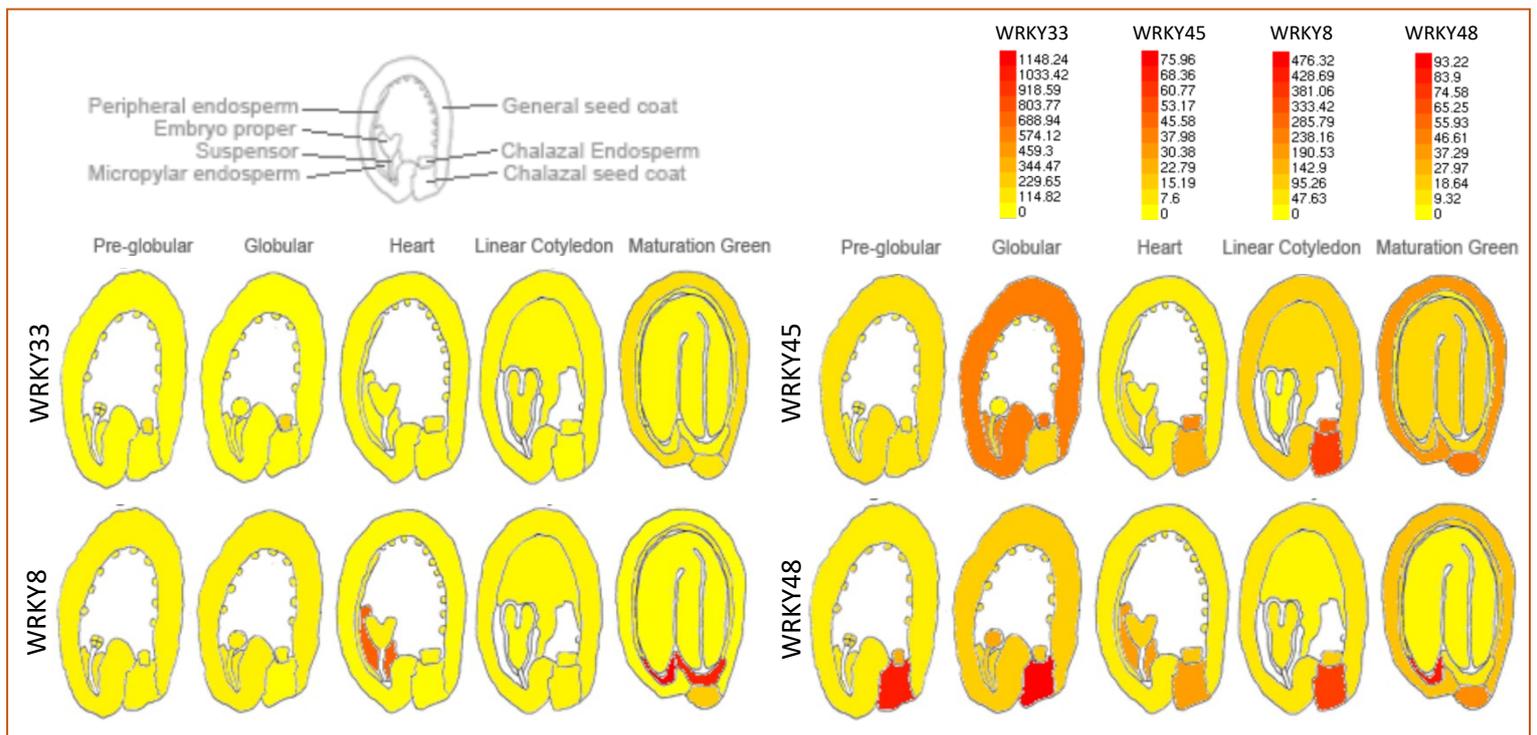


Figura 17. Expresión *in silico* de los FT WRKY33, WRKY45, WRKY8 y WRKY48 en los distintos estadios de desarrollo de la semilla. Obtenida de *The Bio-Analytic Resource for Plant Biology*.

2.2. Ensayo de envejecimiento acelerado (CDT)

Tras analizar la expresión *in silico* de los FT de la familia WRKY en semilla, se quiso estudiar el comportamiento de semillas mutantes *wrky33*, *45*, *8* y *48* tras el CDT. Lo que se busca con este ensayo es comprobar si la disrupción génica de estos FT altera la longevidad de la semilla, puesto que en el mutante *tt3tt7*, menos longevo, estos FT aparecían más expresados o regulaban genes más expresados (ver apartado 7.1 de la Introducción).

Tras someter las semillas de mutantes *wrky* a condiciones de elevadas temperaturas y humedad (37°C, 75% HR) durante diferentes tiempos (0-28 días), se cuantificó el porcentaje de germinación 10 días tras la siembra (Figura 19). A medida que aumenta el periodo de tratamiento de CDT, el porcentaje de plántulas establecidas se reduce. A tiempo cero, prácticamente el 100% de las plántulas de Col0 quedan bien establecidas tras su germinación. Tras 28 días de CDT se observa que ya no germina ningún genotipo.

En el primer lote de semillas (Col0, *wrky33* y *wrky45*) se obtuvieron diferencias significativas únicamente para *wrky45* frente al control Col0 (Figura 18), tras 14, 21 y 28 días de tratamiento de CDT (Figura 19a). A día 14, *wrky45* presenta aproximadamente 62% de plántulas establecidas, mientras que Col0 presenta alrededor de un 83%. A día 21, las diferencias son todavía mayores: solo un 29% de las plántulas de *wrky45* quedan establecidas, frente al control que presenta un 65%.

No se obtuvieron diferencias significativas para *wrky33* con respecto a Col0 (Figura 19a).

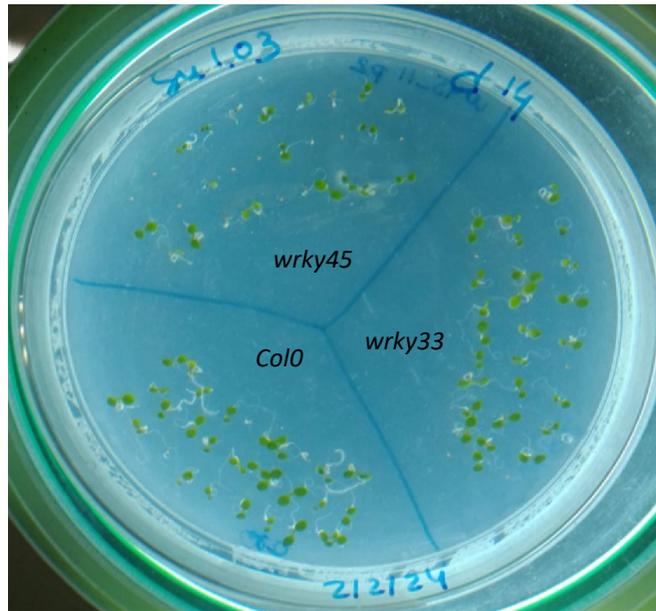


Figura 18. Imagen representativa de las plántulas establecidas tras 14 días de CDT de las semillas de los genotipos *wrky33*, *wrky45* y Col0. La imagen se tomó 10 días tras la siembra.

En el caso de *wrky8* y *wrky48* las diferencias no fueron tan notorias como en el caso anterior, aunque sí que hubo diferencias significativas para un nivel de significación estadística $\alpha < 0,05$. Tras 14 días de CDT, *wrky8* establece un 60% de las plántulas y *wrky48* un 45%, frente a Col0 que presenta un 70% de plántulas establecidas. Tras 21 días de CDT, *wrky8* cuenta con un 28% de plántulas establecidas, *wrky48* con un 10%, frente a Col0 que cuenta con un 38% de plántulas establecidas aproximadamente (Figura 18b).

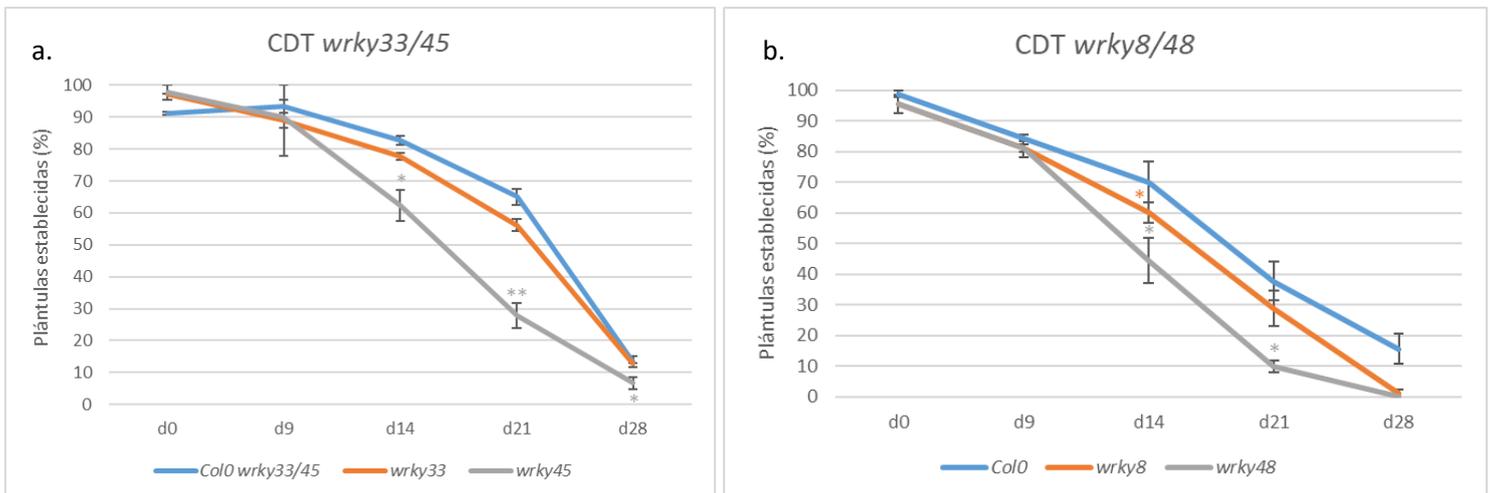


Figura 19. Ensayo CDT en semillas de mutantes *wrky*. Porcentaje de plántulas establecidas a partir de las semillas envejecidas durante 0, 9, 14, 21 y 28 días, contado 10 días tras su siembra en placas Petri. **a.** Ensayo CDT de semillas de mutantes *wrky33* y *wrky45* frente a Col0. **b.** Ensayo CDT de semillas de mutantes *wrky8* y *wrky48* frente a Col0. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas en base a una prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha < 0,05$. (*) o $\alpha < 0,01$ (**).

2.3. Ensayo de toma de tetrazolio

Como el fenotipo obtenido en el doble mutante *tt3tt7* (ver antecedentes), presentaba una elevada permeabilidad en comparación con el control, y los FT WRKY estaban mucho más expresados en el doble mutante con respecto al control o regulaban genes más expresados, se quiso estudiar si la disrupción génica de los genes de los distintos FT de la familia WRKY alteraba la permeabilidad de la semilla. Para ello, se llevó a cabo el ensayo de permeabilidad basado en la toma de tetrazolio. Tras mantener las semillas en solución de tetrazolio durante varios días a 30°C se homogenizaron y se midió la absorbancia de las muestras en la placa ELISA.

Los resultados obtenidos para las semillas de *wrky33*, *wrky45*, *wrky8* y *wrky48* se muestran en la Figura 20. Debido a la diferencia de absorbancia medida para el control Col0 de *wrky33* y *wrky45*, y el control Col0 de *wrky8* y *wrky48*, quedan representados en gráficas separadas. La distinta permeabilidad de los controles Col0 es debida a la presencia de pulgón en las plantas madres de Col0, *wrky8* y *wrky48* que provocaba un aumento de la permeabilidad de las semillas hijas.

Analizando los datos obtenidos tras el ensayo de permeabilidad de tetrazolio se observó que no había diferencias de permeabilidad entre la cubierta de las semillas mutantes *wrky33* y las control (Figura 20a), lo cual encaja con la ausencia de fenotipo tras el CDT. Sin embargo, sí había una diferencia significativa para las semillas mutantes *wrky45* (Figura 20a). La cubierta de las semillas mutantes *wrky45* son mucho más permeables que el control, por lo que el gen *WRKY45*, que se expresa en ese tejido (figura 17) podría tener cierta relación con la correcta formación de la cubierta de la semilla y, consecuentemente, sobre su permeabilidad. Este resultado podría explicar la baja resistencia del mutante al CDT observada en la Figura 19a.

Las semillas *wrky8* y *wrky48* no dieron diferencias de permeabilidad significativas con su control Col0 (Figura 20b). El mutante *wrky8* no tenía fenotipo tras el CDT, pero *wrky48* mostraba cierta sensibilidad al tratamiento. Esta sensibilidad no podría explicarse por una mayor permeabilidad de su cubierta.

La ausencia de efecto en la permeabilidad de la semilla en los mutantes *wrky33*, *wrky8* y *wrky48*, puede ser debida a la baja expresión de estos *WRKY* en la cubierta de la semilla en condiciones normales. La sobreexpresión de estos FT, simulando lo que ocurre en el doble mutante *tt3tt7*, permitirá comprobar si estos genes pueden afectar de algún modo a la cubierta de la semilla cuando su expresión es mayor (apartado 7.1 de Introducción).

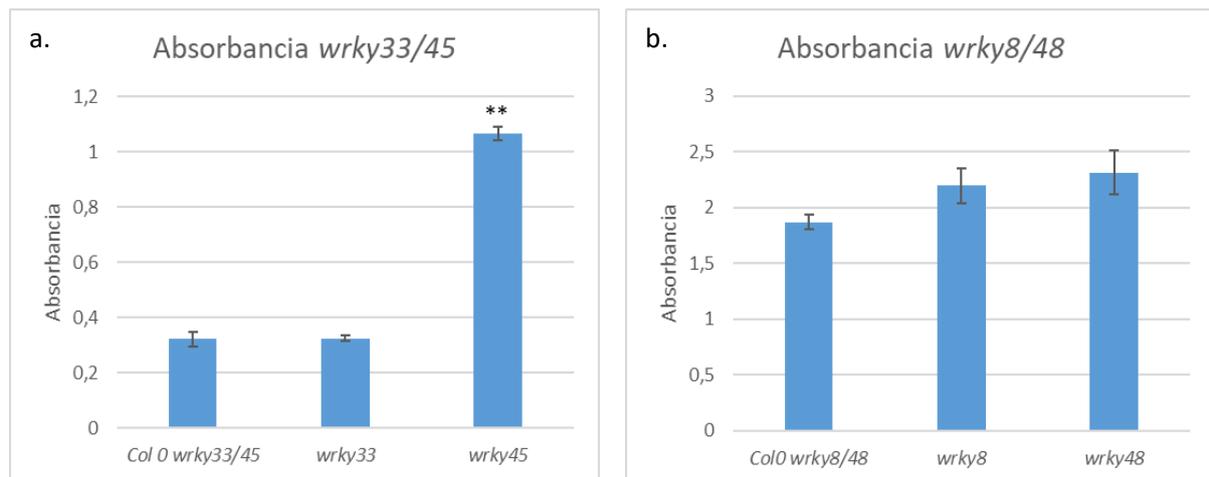


Figura 20. Ensayo de permeabilidad en semillas de mutantes *wrky*. **a.** Mutantes *wrky33* y *wrky45* frente a Col0. **b.** Mutantes *wrky8* y *wrky48* frente a Col0. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas en base a una prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha < 0,05$. (*) o $\alpha < 0,01$ (**).

3. Análisis de la expresión de posibles genes dianas del factor de transcripción WRKY33 en *wrky33*

3.1. Búsqueda de posibles dianas del factor de transcripción WRKY33

Como se ha explicado anteriormente, los FT WRKY45 y WRKY33 fueron identificados por el software TFN2Network (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/TF2Network/>) como FT que regulaban muchos de los genes más expresados en el doble mutante *tt3tt7*. A diferencia del FT WRKY45, sobre el cual no hay mucha información, en la bibliografía es posible encontrar numerosos artículos sobre el FT WRKY33. Para mejorar su caracterización funcional, decidimos buscar posibles dianas de este FT y analizar su expresión mediante qRT-PCR en el mutante de pérdida de función *wrky33*, para ver si WRKY33 activaba o reprimía dichas dianas.

Por un lado, la propia herramienta TFN2Network permite encontrar cuáles de los genes altamente expresados en *tt3tt7* son dianas directas de WRKY33 (se dispone de datos de interacción DNA-proteína). Entre ellas se encontraban el propio WRKY33, WRKY8 y MYB15.

Por otra parte, se realizó una búsqueda bibliográfica. Entre los artículos leídos, el de Liu et al. 2015, Wang et al. 2013 y Krishnamurthy et al., 2020 fueron los de mayor relevancia. En el primer trabajo se realizó un CHIPseq, para encontrar las posibles dianas de WRKY33, entre las que se encontraban WRKY33, WRKY48, MYB42, MYB64, MYB85, MYB15, MYB96 (Liu et al., 2015). Sin embargo, a pesar de aportar evidencias de ser dianas directas, no menciona si WRKY33 está activando o reprimiendo cada gen diana.

La investigación llevada a cabo por Wang et al. puso de manifiesto que WRKY33 reprimía *CESA8* mediante la unión a elementos W-box de su región promotora, e interviniendo en la tolerancia a la sequía (X. Wang et al., 2013). Krishnamurthy et al., 2020, demostró que WRKY33 inducía el gen *CYP94B1* que controla la formación de la barrera apoplástica en las raíces para conferir tolerancia a la sal (Krishnamurthy et al., 2020). Como los autores ya habían demostrado que WRKY33 reprime *CESA8* e induce *CYP94B1*, utilizamos estos dos genes como controles en nuestra qRT-PCR, y estudiamos si ocurría lo mismo en otros tejidos.

3.2. Diseño de cebadores para qRT-PCR

Para diseñar cebadores específicos para los genes dianas para qRT-PCR, partimos de la secuencia completa del gen diana de la base de datos *Plaza*, que permite visualizar exones e intrones (https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v5_dicots/) (Figura 21).

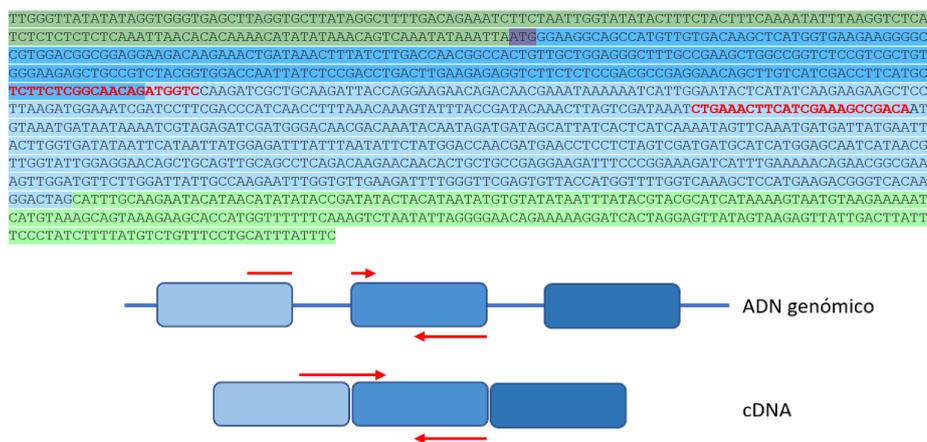


Figura 21. Diseño de cebadores para *MYB42* (arriba) y esquema simplificado (abajo) de cebador directo partido entre dos exones distintos y cebador reverso, para amplificaciones de los genes diana. En verde regiones UTR, en azul los diferentes exones. En el esquema simplificado, las líneas azules representan los intrones, y los rectángulos azules los exones. Las flechas y las letras de color rojo representan cebadores.

Para evitar la amplificación de DNA genómico, uno de los cebadores se diseñó de forma que la mayor parte del cebador (incluyendo el extremo 5') hibridaba con un exón, mientras que la otra parte restante del extremo 3' (5 o 6 nucleótidos) hibridaba con el siguiente exón (Figura 21). El genómico no amplifica pues la presencia de intrones impide que el cebador hibride correctamente.

Además de este requisito, los cebadores debían cumplir las siguientes características: una longitud alrededor de 22 nucleótidos, temperatura de melting alrededor de 60°C, porcentaje de GC aproximadamente 50%, procurar que terminaran en G o C para una mayor estabilidad del cebador y amplificar una región de 90-120 pb de longitud. Todos estos parámetros se comprobaron usando la herramienta IDT *Oligo Analyzer Tool* (<https://eu.idtdna.com/>). Así mismo, se empleó esta herramienta para comprobar que los cebadores no formaran estructuras *hairpins*, *self-dimers* o *hetero-dimers* (Figura 22). El criterio para validar los cebadores es que las T_m de los *hairpins* sean al menos 20 grados inferiores a la T_m de los cebadores.

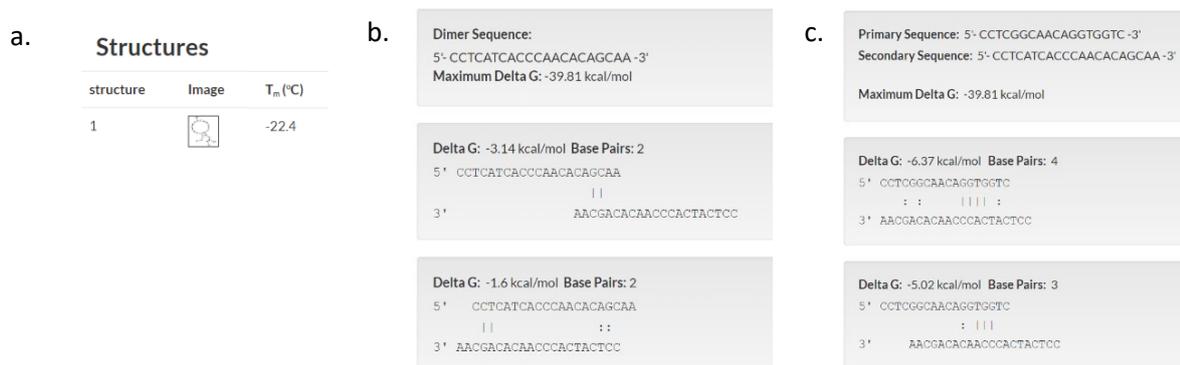


Figura 22. Resultado del análisis de **a.** estructuras *hairpins*, **b.** *self-dimers* y **c.** *hetero-dimers* mediante la herramienta de IDT *Oligo Analyzer Tool*

Para comprobar la especificidad de los cebadores, se llevó a cabo un BLAST en la base de datos de TAIR (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>), de forma que no amplificaran ningún otro gen. Debido a el número elevado de FT dentro de las familias WRKY y MYB con una elevada homología entre sí, realizamos primero un alineamiento del gen del FT contra el genoma de *A. thaliana* con el fin de encontrar aquellas zonas específicas donde poder diseñar los cebadores (Figura 23a). Una vez diseñados los cebadores, se volvía a hacer un alineamiento de cada cebador frente al genoma de *A. thaliana* para asegurarnos de su especificidad, porque el primer alineamiento realizado se limita a mostrar zonas de homología de gran tamaño, y no permite observar homología en regiones más pequeñas. A pesar de encontrar homología en la mayoría de cebadores, nos aseguramos que no hibridaran en el mismo locus o en regiones muy próximas entre sí, que podrían contribuir a amplificaciones de tipo inespecíficas (Figura 23b y c).

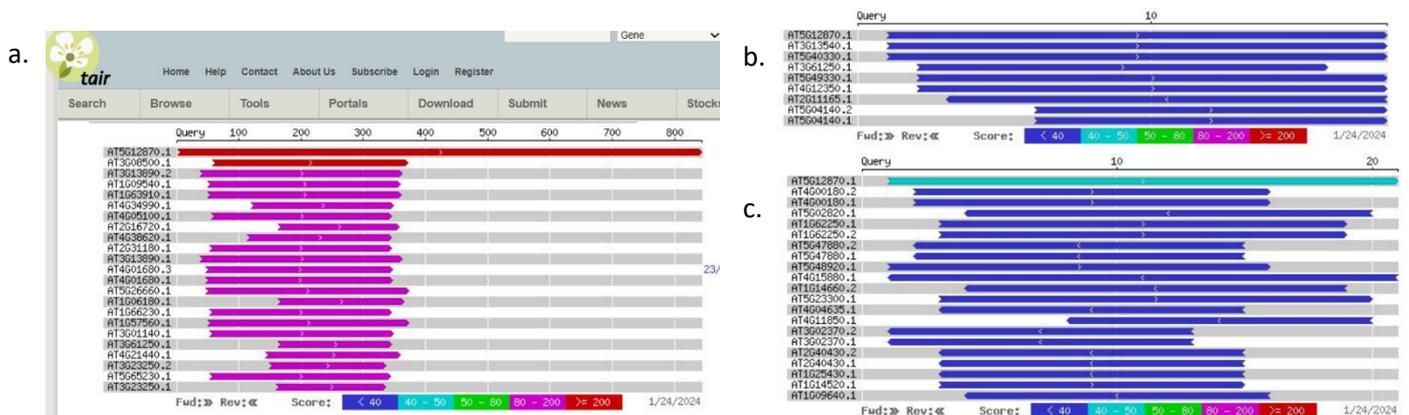


Figura 23. Alineamiento frente al genoma de *A. thaliana* del **a.** cDNA de *MYB46*, **b.** cebador directo para *MYB46* y **c.** cebador reverso para *MYB46*.

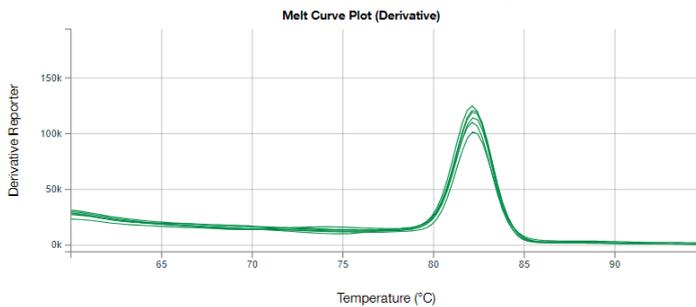
Los cebadores que se han utilizado en este trabajo han sido sintetizados por la empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT). En el Anexo 1 se muestran los cebadores utilizados en el estudio.

3.3. qRT-PCR

3.3.1. Controles negativos

Para comprobar que la amplificación de cada gen diana era específica y no había contaminación, se realizó un control negativo para cada *mix* de PCR de cada gen diana analizado. Solo se tomaron como válidos, aquellos datos de expresión cuyo control negativo no había amplificado.

3.3.2. Curvas de melting (T_m)



Para comprobar si la amplificación había sido específica se llevó a cabo una curva de melting tras finalizar la amplificación. En la figura 24, se puede apreciar que la amplificación para *WRKY8* ha sido específica pues las curvas de melting tienen un único pico máximo, a la misma temperatura.

Figura 24. Curvas de melting específicas de la amplificación del gen *WRKY8* en Col0 y *wrky33*.

3.3.3. Análisis de la expresión de genes dianas de WRKY33

Para conocer si el FT WRKY33 estaba activando o reprimiendo los genes diana, llevamos a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

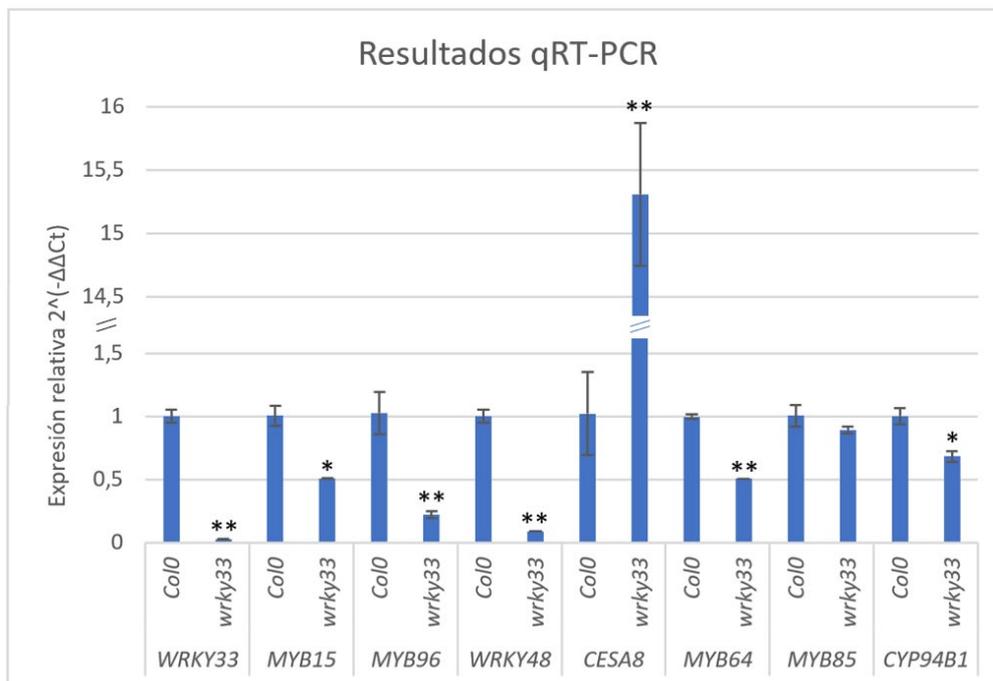


Figura 25. Datos de expresión relativa de los genes dianas de WRKY33 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) obtenidos de la qRT-PCR y sus errores (barras). Los datos son la media de tres réplicas. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas en base a una prueba t de Student con un nivel de significación $\alpha < 0,05$ (*) o $\alpha < 0,01$ (**).

La expresión de cada gen diana se relativizó con respecto a Col0 que siempre tendrá una expresión relativa de 1. En primer lugar, se comprobó que, a pesar de ser baja, la expresión en semilla del gen *WRKY33* en el control Col0, era detectable (amplifica en ciclo 31) y, por supuesto, mayor que en el mutante *wrky33* (expresión relativa de 0,03) (Figura 25).

Comprobado esto, se estudiaron sus dianas. Cuando la expresión relativa de un gen diana en *wrky33* es menor a 1, indica que el gene tiene menor expresión en el mutante que en el control, por lo que el FT WRKY33 activa a dicho gen diana.

Por ejemplo, en el caso de *CESA8*, se observa una clara represión (expresión relativa alrededor de 15,2) por parte de *WRKY33*. Los investigadores X. Wang et al., 2013 ya habían descrito que *WRKY33* inhibe a *CESA8* en raíz, para conferir tolerancia a la sequía (X. Wang et al., 2013). Como se ha mencionado anteriormente, se ha usado el gen *CESA8* como control por estar ya descrito su modo de actuación. Además, con estos resultados se demuestra que *WRKY33* también inhibe *CESA8* en semilla, y no sólo en raíz.

Asimismo, se observa que *WRKY33* activa *CYP94B1* en semilla (expresión relativa aproximadamente de 0,65). Estudios anteriores, han mostrado la activación de *CYP94B1* en raíz para conferir tolerancia a estrés salino (Krishnamurthy et al., 2020). Junto con *CESA8*, *CYP94B1* se utilizó como control para confirmar los resultados de la qRT-PCR. *WRKY48* presenta una expresión relativa muy baja, en torno a 0,1; lo que indica que *WRKY33* también está activando a *WRKY48*. En este trabajo hemos demostrado que la pérdida de función en este gen tiene cierta sensibilidad al CDT, por lo que su inducción podría contribuir favorablemente a mejorar la longevidad de la semilla, por mecanismos que, de momento, desconocemos.

El gen *MYB85* no dio resultados significativos, por lo que no podemos confirmar que *WRKY33* lo esté activando o inhibiendo.

En el caso de *MYB15* y *MYB64*, se observa que tienen una expresión relativa cercana a 0,5. Esto significa que *WRKY33* activa a *MYB15* y a *MYB64*. Esta activación se traduciría, probablemente en un refuerzo de la pared, mediante la activación de la síntesis de lignina (S. H. Kim et al., 2020). De la misma forma *MYB96* presenta una expresión relativa en el mutante *wrky33* de 0,2 aproximadamente, por lo que se deduce que *WRKY33* activa *MYB96*. *MYB96* es un FT implicado en la movilización de lípidos, y su sobreexpresión provoca una mayor acumulación de ácidos grasos (Lee et al., 2018), por lo que parecería lógico que *WRKY33* estuviera activando *MYB96* para intentar contrarrestar el efecto que ha provocado el kaempferol en la testa (reducción de ácidos grasos entre otros). Esto explica el fenotipo de *tt3tt7*, en el que todos estos FT están reprimidos y su pared está totalmente desestructurada.

De los resultados obtenidos de la qRT-PCR se concluye que *WRKY33* parece estar activando FT de tipo MYB que podrían contribuir a reforzar la testa de la semilla.

Aunque en el mutante *wrky33* no se han podido detectar diferencias significativas de permeabilidad mediante el ensayo de tetrazolio, ni fenotipo tras el CDT, sí que se observan diferencias a nivel de expresión génica que indican la activación o represión de sus genes dianas. Posiblemente *wrky33* no muestra una menor permeabilidad debido a que la expresión de *WRKY33* en semilla es muy baja (ver apartado Resultados 2.1), por lo que, aunque hay cambios a nivel transcripcional, no se llegan a ver cambios a nivel de permeabilidad. Por eso, se decidió obtener la sobreexpresión de *WRKY33* para ver si se traducía en un refuerzo de la pared de la cubierta de la semilla.

4. Generación de construcciones y transformación de *A. thaliana* para la obtención de líneas transgénicas que sobreexpresen *WRKY33* y *WRKY45*.

4.1. Diseño de las construcciones a obtener mediante GB

En este trabajo se abordó mediante el método de clonación de GB, el diseño y ensamblaje de 4 construcciones genéticas. El objetivo de este ensamblaje era conseguir la sobreexpresión en *A. thaliana* de *WRKY33* y *WRKY45* bajo un promotor constitutivo, y bajo un promotor específico de testa. Esta herramienta permitirá dilucidar mejor el papel de estos FT en la longevidad de semillas *A. thaliana*.

4.1.1. Promotor constitutivo: ubiquitina

Se diseñaron las categorías de las distintas partes de cada circuito genético, para WRKY33 y WRKY45. Cada construcción constaba de 3 partes básicas: promotor ubiquitina (posición A1-B2), secuencia codificante del FT WRKY33/45 (posición B3-B5), y terminador Tnos (posición B6-C1). Cada una de estas partes fue domesticada en pUPD2 de acuerdo con su posición y su gramática correspondiente (Figura 26).

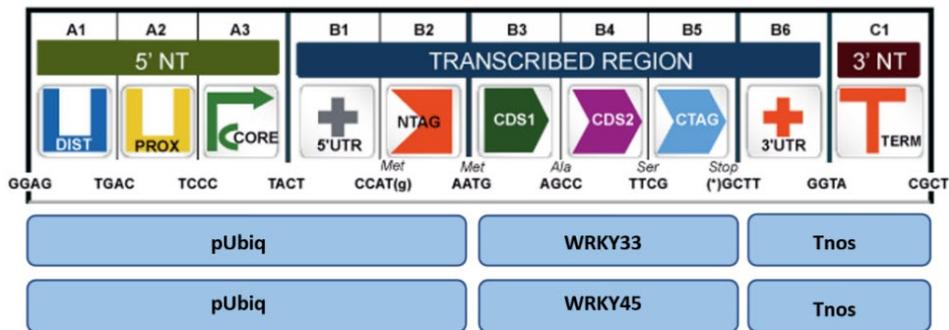


Figura 26. Diseño de las construcciones genéticas de *WRKY33/45* bajo el control de un promotor constitutivo.

4.1.2. Promotor específico de cubierta de semilla junto con marcador GUS

El diseño de las dos construcciones bajo un promotor específico constaba de 5 partes básicas: promotor MUM4 específico de testa (posición A1-A2), región 5'UTR del FT WRKY (posición A3-B2), secuencia codificante de WRKY33/45 (posición B3-B4), un gen marcador (*GUS*) (posición B5), y el terminador Tnos (posición B6-C1). Al igual que en el caso anterior, cada una de estas cinco partes, fue domesticada de forma independiente en vectores pUPD2, con las posiciones que quedan reflejadas en la Figura 27.

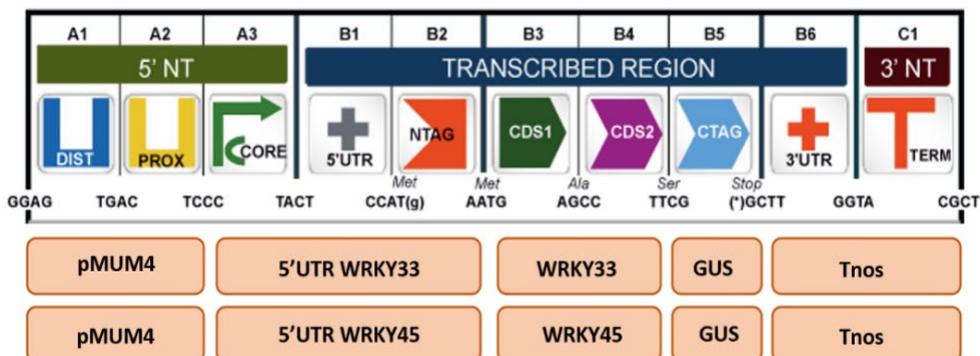


Figura 27. Diseño de las construcciones genéticas de *WRKY33/45* bajo el control de un promotor específico de testa.

4.2. Domesticación

Dado que la construcción genética de WRKY33/45 bajo el promotor MUM4 es más compleja, emplearemos este modelo para ilustrar los resultados que hemos obtenido para las cuatro construcciones genéticas.

Tras la amplificación del fragmento de ADN que se quiere clonar con los cebadores propios para la domesticación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (Figura 28a). Se procedió a purificar y extraer el fragmento de ADN deseado. Una vez realizada la purificación, se cuantificó el ADN extraído de la banda del gel de agarosa del tamaño esperado mediante *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v3.8.1* (*NanoDrop Technologies, Inc.*) (Figura 28b).

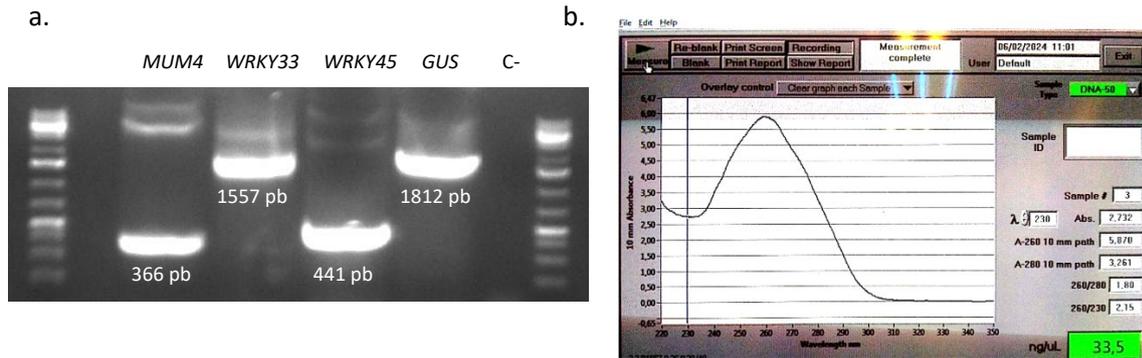


Figura 28. a. Electroforesis de la PCR de MUM4 (A1-A2), *WRKY33*, *WRKY45* (B3-B4), GUS (B5) y control negativo con todos los cebadores de las cuatro amplificaciones. b. Cuantificación del ADN extraído de la banda de gel de agarosa del producto de amplificación de la parte CDS *WRKY33* (B3-B4).

Posteriormente se clonó el fragmento en el vector pUPD2 y se transformaron células competentes de *E. coli*. La correcta domesticación de cada parte en el vector pUPD2, se comprobó por digestión. Para ello se realizó previamente una digestión virtual del plásmido pUPD2 con el fragmento de interés, empleando el software *Benchling*. Por ejemplo, el plásmido que contiene el CDS de *WRKY33* en pUPD2 tiene un tamaño total de 3666 pb, y cuando se digiere con *BsaI* se corta en dos fragmentos de 1560 y 2105 pb (Figura 29). Tras la digestión, el plásmido que contiene el CDS de *WRKY45* presenta una banda de 2105 pb y otra de 444 pb. La digestión del vector pUPD2 vacío, da lugar a dos bandas, con unos tamaños de 585 y 2105 pb.

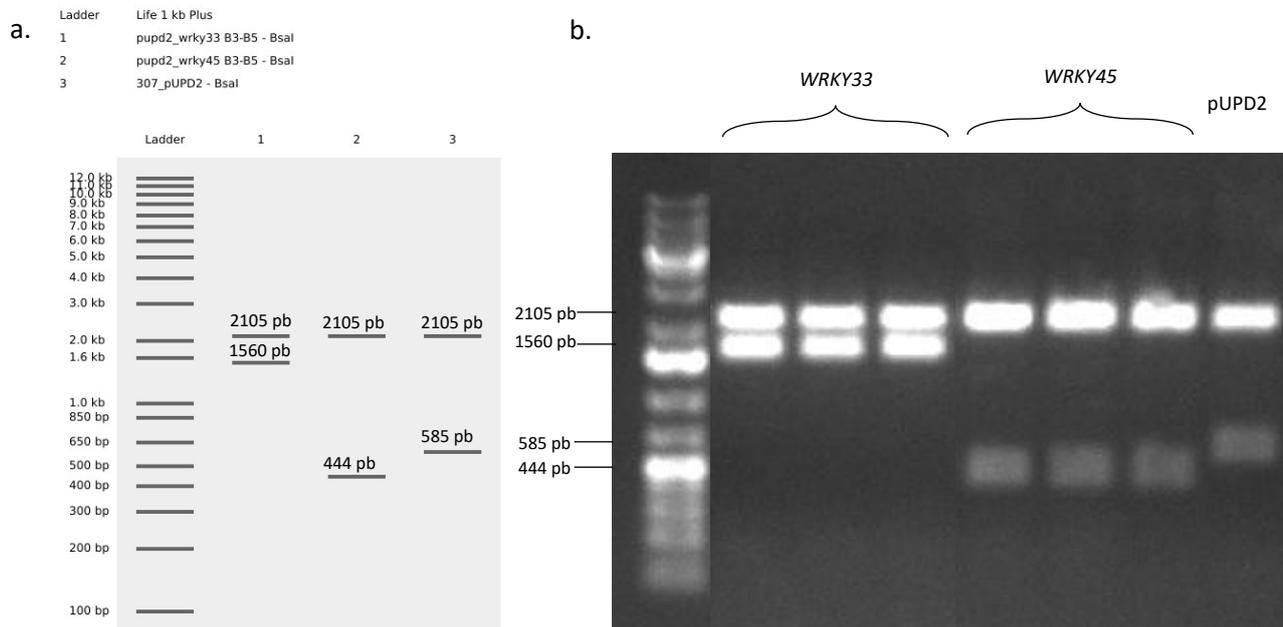


Figura 29. a. Digestión virtual de *WRKY33/45* en pUPD2 y del vector pUPD2 vacío. b. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de *WRKY33/45* en pUPD2 y el vector pUPD2 vacío.

Por último, se secuenció cada parte en pUPD2 para comprobar que no se había producido ninguna mutación.

4.3. Ensamblaje multipartito: digestión de comprobación de correcto ensamblaje *in silico* y en bancada.

Tras la correcta domesticación de cada una de las partes de las distintas construcciones genéticas, se procedió con el ensamblaje multipartito para obtener las unidades transcripcionales descritas en el apartado 4.1. A su vez se realizó tanto *in silico* como en bancada un ensamblaje multipartito en un vector *alpha2*, y una digestión de estos ensamblajes con HindIII. (Figura 30).

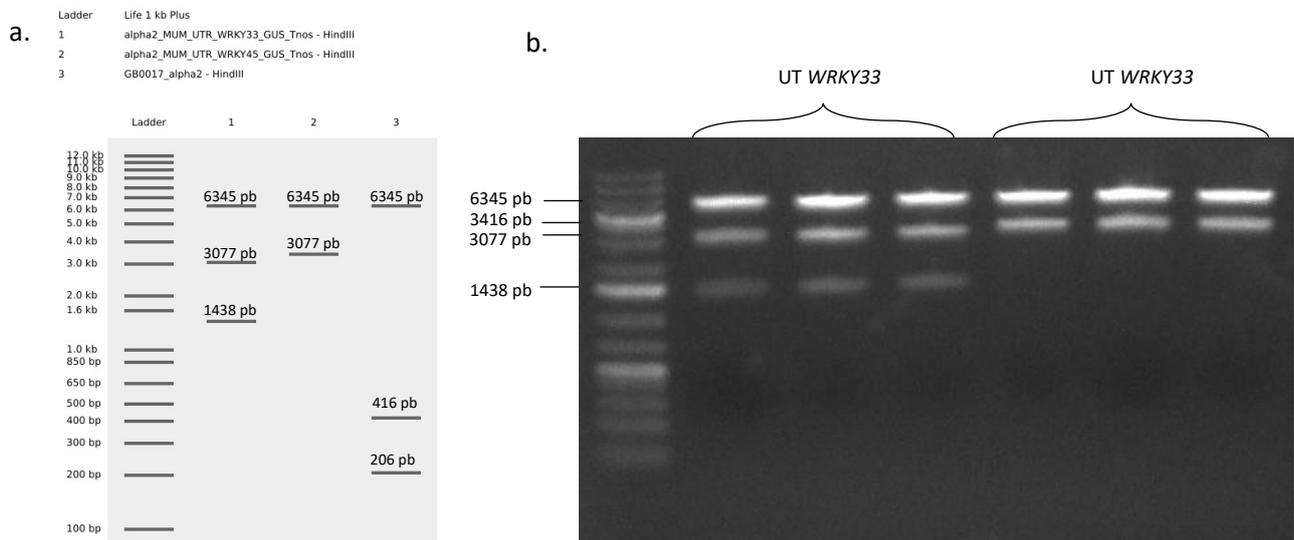


Figura 30. a. Digestión virtual con HindIII de la unidad transcripcional (UT) de *WRKY33/45* bajo promotor específico en el vector *alpha2* y *alpha2* vector vacío **b.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de estas unidades transcripcionales con HindIII. UT: Unidad Transcripcional.

La digestión de la unidad transcripcional pMUM:5'UTR:WRKY33:WRKY33:GUS:Tnos en *alpha2*, daba lugar a tres bandas, 1438, 3077 y 6345 pb. La digestión de la unidad transcripcional equivalente de WRKY45 daba lugar a una banda de 3416 pb y otra de 6345 pb; mientras que el vector vacío *alpha2* daba lugar a las siguientes bandas: 206 pb, 416 pb y 6345 pb.

4.4. Ensamblaje binario: digestión y PCR colonia

Las cuatro unidades transcripcionales en *alpha2*, se ensamblaron de forma independiente junto con la unidad transcripcional que confiere resistencia a kanamicina (p35S:NPTII:Tnos) en el vector *alpha1R*, dando lugar a cuatro vectores *omega1*.

Tras el ensamblaje binario se transformaron colonias de *E. coli*. Tras hacer una siembra en placa con medio LB y espectinomicina se dejaron crecer durante una noche. Se picaron varias colonias que habían crecido y potencialmente habían incorporado correctamente el plásmido omega. Se dejaron crecer a 37°C en medio LB con espectinomicina durante toda la noche y se realizó un protocolo de extracción de ADN plasmídico.

Para comprobar la presencia de ambas unidades transcripcionales se realizó por un lado una digestión enzimática (Figura 31) a modo de comprobación con la enzima BamHI, que cortaba en la TU de WRKY. Para la construcción de WRKY33 en *omega1* se esperaban dos bandas: una de 5928 pb y otra de 6674 pb; mientras que para la construcción de WRKY45 se esperaban tres bandas de: 1916 pb, 2908 pb y 6674 pb. Finalmente, para el vector vacío *omega1* se esperaban tres bandas de: 239 pb, 382 pb y 6674 pb. Como se observa en la Figura 31, solo las colonias 1 y 3 de Ω 1-WRKY33 y las colonias 1 y 2 de Ω 1-WRKY45 incorporaron adecuadamente la construcción genética completa. Esto es debido a la mayor complejidad de la construcción genética bajo promotor específico de testa y gen marcador *GUS*.

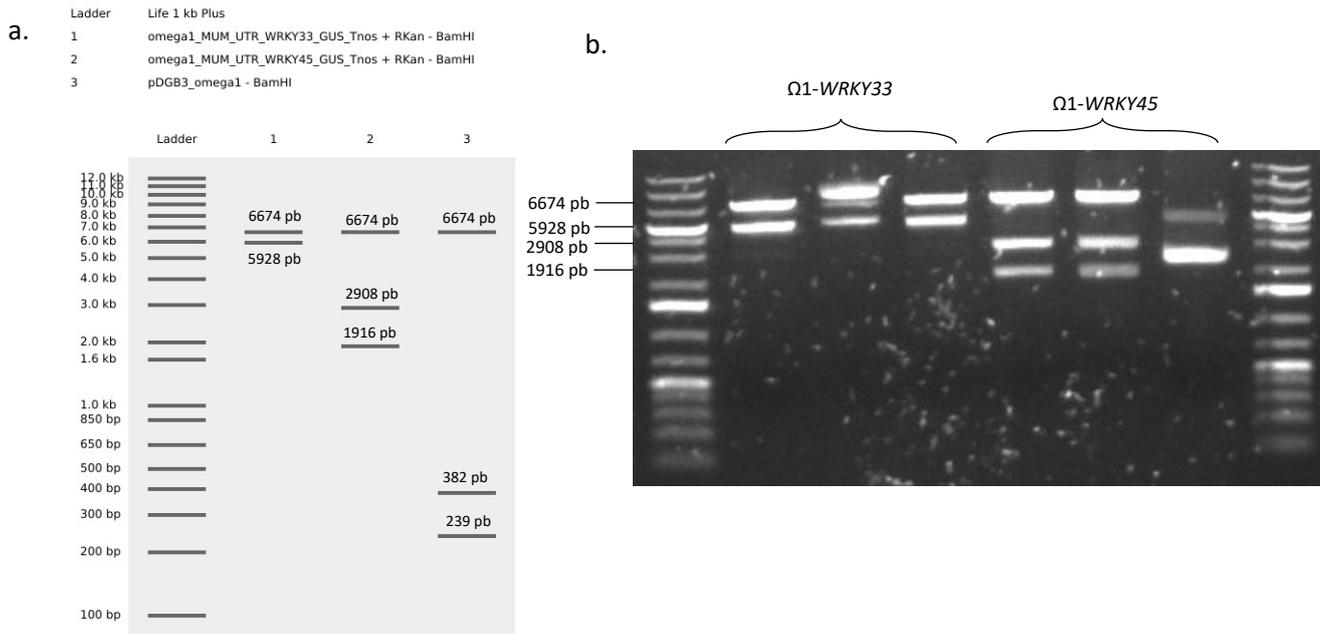


Figura 31. a. Digestión virtual con BamHI del ensamblaje binario de la unidad transcripcional de *WRKY33/45* bajo promotor específico en el vector *alpha2* junto con el gen marcador de resistencia a kanamicina en *alpha1R*; y vector omega vacío **b.** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de estos ensamblajes con BamHI.

Y, por otro lado, para comprobar la incorporación de la resistencia a kanamicina, se realizó una PCR directamente de esas mismas colonias de *E. coli* y una electroforesis posterior.

4.5. Transformación de *A. thaliana*: “floral dipping”

Posteriormente, tras la obtención y comprobación de las distintas construcciones genéticas se transfirieron primero a *A. tumefaciens* mediante el protocolo de transformación descrito en el apartado 3.3, y finalmente se transformaron plantas de *A. thaliana* por el método “floral dipping”. En la Figura 32 se puede observar las plantas de *A. thaliana* transformadas.

Aunque ya no forma parte del trabajo, posteriormente se procederá a la recolección de semillas y selección de las transformadas. Como se ha comentado anteriormente, las plantas transgénicas que sobreexpresen estos FT de la familia WRKY, serán una herramienta muy útil para completar el análisis funcional de estos genes y aclarar su posible implicación en la longevidad de semillas.



Figura 32. Plantas transformadas con las construcciones de *WRKY33* y *WRKY45* bajo promotor constitutivo.

CONCLUSIONES

En relación al primer objetivo de caracterización de mutantes de pérdida de función de FT de las familias MYB y WRKY se concluye que:

En general, los FT de la familia MYB se expresan en la cubierta de la semilla, y su pérdida de función incrementa su permeabilidad, lo que provoca una reducción en la longevidad de sus semillas.

Los FT WRKY presentan una baja expresión en la cubierta de la semilla, a excepción de WRKY45. El mutante *wrky45* presenta una alta permeabilidad que se relaciona con una reducción en su longevidad.

WRKY33, WRKY8 y WRKY48 se expresan en menor medida en cubierta y su pérdida de función no afecta a su permeabilidad.

En relación al segundo objetivo de analizar la expresión en semilla de posibles dianas de WRKY33 se concluye que:

El FT WRKY33 regula positivamente FT de la familia MYB, como MYB15, MYB64 o MYB94 que, podrían actuar reforzando la cubierta de la semilla.

WRKY33 activa también el FT WRKY48, cuya función en el desarrollo de la cubierta de la semilla y en su longevidad todavía se desconoce.

En relación al tercer y último objetivo, se concluye que:

Las líneas transgénicas sobreexpresando WRKY33 y WRKY45 de forma constitutiva o específica de testa generadas a partir de este TFG, permitirán profundizar en el papel de los FT de la familia WRKY en la longevidad de semillas.

Finalmente indicar que todos los resultados obtenidos en este TFG son preliminares y será necesario comprobar su reproducibilidad empleando una nueva generación de semillas mutantes, dado que el ambiente en el que crecen las plantas madre, afecta en gran medida a la calidad de sus semillas hijas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)*, *301*(5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1086391>
- Arif, M. A. R., & Börner, A. (2019). Mapping of QTL associated with seed longevity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Journal of Applied Genetics*, *60*(1), 33–36. <https://doi.org/10.1007/S13353-018-0477-Y/FIGURES/2>
- Bar-Peled, M., Conceicao, AdS., Frigerio, L., & Raikhel, N. V. (1995). Expression and Regulation of aERD2, a Gene Encoding the KDEL Receptor Homolog in Plants, and Other Genes Encoding Proteins Involved in ER-Golgi Vesicular Trafficking. *The Plant Cell*, 667–676. <https://doi.org/10.1105/TPC.7.6.667>
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. B. (2007). The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of *Arabidopsis* W OA. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048033>
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., & Serrano, R. (2014). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiology*, *164*(2), 999–1010. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232223>
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Martínez, C., Tello, C., Martínez-Almonacid, I., Ballester, P., Simón-Moya, M., Brunaud, V., Yenush, L., Ferrándiz, C., & Serrano, R. (2016). Arabidopsis COGWHEEL1 links light perception and gibberellins with seed tolerance to deterioration. *The Plant Journal*, *87*(6), 583–596. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13220>
- Corbineau, F. (2024). The Effects of Storage Conditions on Seed Deterioration and Ageing: How to Improve Seed Longevity. *Seeds 2024, Vol. 3, Pages 56-75*, *3*(1), 56–75. <https://doi.org/10.3390/SEEDS3010005>
- De Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L., & Lopez-Molina, L. (2015). An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLoS Genetics*, *11*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005708>
- de Silva, N. D. G., Boutin, C., Lukina, A. O., Western, T. L., Molina, I., & Rowland, O. (2021). Seed coat suberin forms a barrier against chromium (Cr³⁺) during early seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, *191*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104632>
- Dean, G. H., Jin, Z., Shi, L., Esfandiari, E., McGee, R., Nabata, K., Lee, T., Kunst, L., Western, T. L., & Haughn, G. W. (2017). Identification of a seed coat-specific promoter fragment from the Arabidopsis MUCILAGE-MODIFIED4 gene. *Plant Molecular Biology*, *95*(1–2), 33–50. <https://doi.org/10.1007/S11103-017-0631-7/FIGURES/6>
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). *Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in Arabidopsis 1*. www.plantphysiol.org

- DH5a Competent Cells* | Thermo Fisher Scientific - ES. (n.d.). Retrieved March 6, 2024, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 15, Issue 10, pp. 573–581). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany*, 45(1), 13–30. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AOB.A085797>
- Geist, K. S., Strassmann, J. E., & Queller, D. C. (2019). Family quarrels in seeds and rapid adaptive evolution in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9463–9468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817733116>
- Geng, P., Zhang, S., Liu, J., Zhao, C., Wu, J., Cao, Y., Fu, C., Han, X., He, H., & Zhao, Q. (2020). MYB20, MYB42, MYB43, and MYB85 regulate phenylalanine and lignin biosynthesis during secondary cell wall formation[OPEN]. *Plant Physiology*, 182(3), 1272–1283. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01070>
- Goldberg, R. B., Paiva, G. de, & Yadegari, R. (1994). Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science*, 266(5185), 605–614. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.266.5185.605>
- Groot, S. P. C. (2002). *A controlled deterioration test fo Arabidopsis thaliana reveals genetic variation in seed quality*. <https://www.researchgate.net/publication/40129608>
- Groot, S. P. C., Surki, A. A., De Vos, R. C. H., & Kodde, J. (2012). Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany*, 110(6), 1149–1159. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs198>
- Han, X., Zhang, L., Miao, X., Hu, X., Nan, S., & Fu, H. (2019). *Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of mucilage biosynthesis during Artemisia sphaerocephala seed development*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111991>
- Haughn, G., & Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 10, Issue 10, pp. 472–477). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.005>
- Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F., & Yu, D. (2013). Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *Plant Journal*, 74(5), 730–745. <https://doi.org/10.1111/tbj.12159>
- Jason Hilton. (1998). Review of the Fossil Evidence for the Origin and Earliest Evolution of the Seed-plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 40.
- Kim, D., Jeon, S. J., Yanders, S., Park, S. C., Kim, H. S., & Kim, S. (2022). MYB3 plays an important role in lignin and anthocyanin biosynthesis under salt stress condition in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 41(7), 1549–1560. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02878-7>
- Kim, S. H., Lam, P. Y., Lee, M. H., Jeon, H. S., Tobimatsu, Y., & Park, O. K. (2020). The Arabidopsis R2R3 MYB Transcription Factor MYB15 Is a Key Regulator of Lignin Biosynthesis in Effector-Triggered Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583153>
- Krishnamurthy, P., Vishal, B., Ho, W. J., Lok, F. C. J., Lee, F. S. M., & Kumar, P. P. (2020). Regulation of a cytochrome P450 gene CYP94B1 by WRKY33 transcription factor controls apoplastic barrier formation in roots to confer salt tolerance. *Plant Physiology*, 184(4), 2199–2215. <https://doi.org/10.1104/pp.20.01054>

- Lee, H. G., Kim, H., Suh, M. C., Kim, H. U., & Seo, P. J. (2018). The MYB96 Transcription Factor Regulates Triacylglycerol Accumulation by Activating DGAT1 and PDAT1 Expression in Arabidopsis Seeds. *Plant & Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy073>
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 57, pp. 405–430). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252>
- Liu, S., Kracher, B., Org Ziegler, J. ", Birkenbihl, R. P., & Somssich, I. E. (2015). Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards Botrytis cinerea 2100. *ELIFE*. <https://doi.org/10.7554/eLife.07295.001>
- Loubéry, S., De Giorgi, J., Utz-Pugin, A., Demonsais, L., & Lopez-Molina, L. (2018). A maternally deposited endosperm cuticle contributes to the physiological defects of transparent testa seeds. *Plant Physiology*, *177*(3), 1218–1233. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00416>
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaitė-Savitch, L., Johnson, D. A., & Miki, B. L. A. (2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* *2005 41:5*, *41*(5), 620–644. <https://doi.org/10.1079/IVP2005686>
- Nadarajan, J., Walters, C., Pritchard, H. W., Ballesteros, D., & Colville, L. (2023). Seed Longevity—The Evolution of Knowledge and a Conceptual Framework. In *Plants* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12030471>
- Niñoles, R., Arjona, P., Azad, S. M., Hashim, A., Casañ, J., Bueso, E., Serrano, R., Espinosa, A., Molina, I., & Gadea, J. (2023). Kaempferol-3-rhamnoside overaccumulation in flavonoid 3'-hydroxylase tt7 mutants compromises seed coat outer integument differentiation and seed longevity. *New Phytologist*, *238*(4), 1461–1478. <https://doi.org/10.1111/nph.18836>
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016). WRKY transcription factors: Molecular regulation and stress responses in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue JUNE2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>
- Pirredda, M., Fañanás-Pueyo, I., Oñate-Sánchez, L., & Mira, S. (2024). Seed Longevity and Ageing: A Review on Physiological and Genetic Factors with an Emphasis on Hormonal Regulation. In *Plants* (Vol. 13, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13010041>
- Poutanen, K. S., Kårlund, A. O., G Omez-Gallego, C., Johansson, D. P., Scheers, N. M., Marklinder, I. M., Eriksen, A. K., Silventoinen, P. C., Nordlund, E., Sozer, N., Hanhineva, K. J., Kolehmainen, M., & Landberg, R. (2022). Grains—a major source of sustainable protein for health. *Nutrition Reviews*. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab084>
- Rains, M. K., De Silva, N. D. G., & Molina, I. (2018). Reconstructing the suberin pathway in poplar by chemical and transcriptomic analysis of bark tissues. *Tree Physiology*, *38*(3), 340–361. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPX060>
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(10), 796–805. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2008.07.021>
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P. C., Belghazi, M., Job, C., & Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, *148*(1), 620–641. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>

- Ralf Stracke, M. W. and B. W. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 447–456.
- Renard, J., Niñoles, R., Martínez-Almonacid, I., Gayubas, B., Mateos-Fernández, R., Bissoli, G., Bueso, E., Serrano, R., & Gadea, J. (2020). Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. *Plant Cell and Environment*, 43(10), 2523–2539. <https://doi.org/10.1111/pce.13822>
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., & Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*, 53(1–2), 247–259. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009297.37235.4A>
- Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Debeaujon, I., Pourcel, L., Caboche, M., Einhorn, J., & Lepiniec, L. (2006). Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 224(1), 96–107. <https://doi.org/10.1007/S00425-005-0197-5>
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.02.006>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- Toledo, S., Bippus, A. C., & Tomescu, A. M. F. (2018). Buried deep beyond the veil of extinction: Euphyllphyte relationships at the base of the spermatophyte clade. *American Journal of Botany*, 105(8), 1264–1285. <https://doi.org/10.1002/AJB2.11102>
- Verma, S., Attuluri, V. P. S., & Robert, H. S. (2022). Transcriptional control of *Arabidopsis* seed development. In *Planta* (Vol. 255, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03870-x>
- Wang, H., Cheng, X., Yin, D., Chen, D., Luo, C., Liu, H., & Huang, C. (2023). Advances in the Research on Plant WRKY Transcription Factors Responsive to External Stresses. In *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 45, Issue 4, pp. 2861–2880). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cimb45040187>
- Wang, X., Du, B., Liu, M., Sun, N., & Qi, X. (2013). *Arabidopsis* Transcription Factor WRKY33 Is Involved in Drought by Directly Regulating the Expression of *CesA8*. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 21–27. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.46A004>
- Woody, S. T., Sandra, A. E., Ae, A.-P., Amasino, R. M., Patrick, A. E., & Krysan, J. (n.d.). *The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline*. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0048-x>
- Xiao, R., Zhang, C., Guo, X., Li, H., & Lu, H. (2021). MYB transcription factors and its regulation in secondary cell wall formation and lignin biosynthesis during xylem development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073560>
- Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F., & Chen, Z. X. (2008). Stress- and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular Plant*, 1(3), 459–470. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn020>

- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *21*(1), 248–266. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063321>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, N.Y.)*, *301*(5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1086391>
- Arif, M. A. R., & Börner, A. (2019). Mapping of QTL associated with seed longevity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Journal of Applied Genetics*, *60*(1), 33–36. <https://doi.org/10.1007/S13353-018-0477-Y/FIGURES/2>
- Bar-Peled, M., Conceicao, AdS., Frigerio, L., & Raikhel, N. V. (1995). Expression and Regulation of aERD2, a Gene Encoding the KDEL Receptor Homolog in Plants, and Other Genes Encoding Proteins Involved in ER-Golgi Vesicular Trafficking. *The Plant Cell*, 667–676. <https://doi.org/10.1105/TPC.7.6.667>
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. B. (2007). The Acyltransferase GPAT5 Is Required for the Synthesis of Suberin in Seed Coat and Root of *Arabidopsis* W OA. *Plant Cell*. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048033>
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., & Serrano, R. (2014). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiology*, *164*(2), 999–1010. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232223>
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Martínez, C., Tello, C., Martínez-Almonacid, I., Ballester, P., Simón-Moya, M., Brunaud, V., Yenush, L., Ferrándiz, C., & Serrano, R. (2016). Arabidopsis COGWHEEL1 links light perception and gibberellins with seed tolerance to deterioration. *The Plant Journal*, *87*(6), 583–596. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13220>
- Corbineau, F. (2024). The Effects of Storage Conditions on Seed Deterioration and Ageing: How to Improve Seed Longevity. *Seeds 2024, Vol. 3, Pages 56-75*, *3*(1), 56–75. <https://doi.org/10.3390/SEEDS3010005>
- De Giorgi, J., Piskurewicz, U., Loubery, S., Utz-Pugin, A., Bailly, C., Mène-Saffrané, L., & Lopez-Molina, L. (2015). An Endosperm-Associated Cuticle Is Required for Arabidopsis Seed Viability, Dormancy and Early Control of Germination. *PLoS Genetics*, *11*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005708>
- de Silva, N. D. G., Boutin, C., Lukina, A. O., Western, T. L., Molina, I., & Rowland, O. (2021). Seed coat suberin forms a barrier against chromium (Cr³⁺) during early seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, *191*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104632>
- Dean, G. H., Jin, Z., Shi, L., Esfandiari, E., McGee, R., Nabata, K., Lee, T., Kunst, L., Western, T. L., & Haughn, G. W. (2017). Identification of a seed coat-specific promoter fragment from the Arabidopsis MUCILAGE-MODIFIED4 gene. *Plant Molecular Biology*, *95*(1–2), 33–50. <https://doi.org/10.1007/S11103-017-0631-7/FIGURES/6>
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). *Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in Arabidopsis I*. www.plantphysiol.org

- DH5a Competent Cells* | Thermo Fisher Scientific - ES. (n.d.). Retrieved March 6, 2024, from <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html>
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., & Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 15, Issue 10, pp. 573–581). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Ellis, R. H., & Roberts, E. H. (1980). Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. *Annals of Botany*, 45(1), 13–30. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.AOB.A085797>
- Geist, K. S., Strassmann, J. E., & Queller, D. C. (2019). Family quarrels in seeds and rapid adaptive evolution in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9463–9468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817733116>
- Geng, P., Zhang, S., Liu, J., Zhao, C., Wu, J., Cao, Y., Fu, C., Han, X., He, H., & Zhao, Q. (2020). MYB20, MYB42, MYB43, and MYB85 regulate phenylalanine and lignin biosynthesis during secondary cell wall formation[OPEN]. *Plant Physiology*, 182(3), 1272–1283. <https://doi.org/10.1104/PP.19.01070>
- Goldberg, R. B., Paiva, G. de, & Yadegari, R. (1994). Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science*, 266(5185), 605–614. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.266.5185.605>
- Groot, S. P. C. (2002). *A controlled deterioration test fo Arabidopsis thaliana reveals genetic variation in seed quality*. <https://www.researchgate.net/publication/40129608>
- Groot, S. P. C., Surki, A. A., De Vos, R. C. H., & Kodde, J. (2012). Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany*, 110(6), 1149–1159. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs198>
- Han, X., Zhang, L., Miao, X., Hu, X., Nan, S., & Fu, H. (2019). *Transcriptome analysis reveals the molecular mechanisms of mucilage biosynthesis during Artemisia sphaerocephala seed development*. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111991>
- Haughn, G., & Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 10, Issue 10, pp. 472–477). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.005>
- Hu, Y., Chen, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, F., & Yu, D. (2013). Arabidopsis transcription factor WRKY8 functions antagonistically with its interacting partner VQ9 to modulate salinity stress tolerance. *Plant Journal*, 74(5), 730–745. <https://doi.org/10.1111/tbj.12159>
- Jason Hilton. (1998). Review of the Fossil Evidence for the Origin and Earliest Evolution of the Seed-plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 40.
- Kim, D., Jeon, S. J., Yanders, S., Park, S. C., Kim, H. S., & Kim, S. (2022). MYB3 plays an important role in lignin and anthocyanin biosynthesis under salt stress condition in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, 41(7), 1549–1560. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02878-7>
- Kim, S. H., Lam, P. Y., Lee, M. H., Jeon, H. S., Tobimatsu, Y., & Park, O. K. (2020). The Arabidopsis R2R3 MYB Transcription Factor MYB15 Is a Key Regulator of Lignin Biosynthesis in Effector-Triggered Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583153>
- Krishnamurthy, P., Vishal, B., Ho, W. J., Lok, F. C. J., Lee, F. S. M., & Kumar, P. P. (2020). Regulation of a cytochrome P450 gene CYP94B1 by WRKY33 transcription factor controls apoplastic barrier formation in roots to confer salt tolerance. *Plant Physiology*, 184(4), 2199–2215. <https://doi.org/10.1104/pp.20.01054>

- Lee, H. G., Kim, H., Suh, M. C., Kim, H. U., & Seo, P. J. (2018). The MYB96 Transcription Factor Regulates Triacylglycerol Accumulation by Activating DGAT1 and PDAT1 Expression in Arabidopsis Seeds. *Plant & Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy073>
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 57, pp. 405–430). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252>
- Liu, S., Kracher, B., Org Ziegler, J. ", Birkenbihl, R. P., & Somssich, I. E. (2015). Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards Botrytis cinerea 2100. *ELIFE*. <https://doi.org/10.7554/eLife.07295.001>
- Loubéry, S., De Giorgi, J., Utz-Pugin, A., Demonsais, L., & Lopez-Molina, L. (2018). A maternally deposited endosperm cuticle contributes to the physiological defects of transparent testa seeds. *Plant Physiology*, 177(3), 1218–1233. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00416>
- Moïse, J. A., Han, S., Gudynaitė-Savitch, L., Johnson, D. A., & Miki, B. L. A. (2005). Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2005 41:5, 41(5), 620–644. <https://doi.org/10.1079/IVP2005686>
- Nadarajan, J., Walters, C., Pritchard, H. W., Ballesteros, D., & Colville, L. (2023). Seed Longevity—The Evolution of Knowledge and a Conceptual Framework. In *Plants* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants12030471>
- Niñoles, R., Arjona, P., Azad, S. M., Hashim, A., Casañ, J., Bueso, E., Serrano, R., Espinosa, A., Molina, I., & Gadea, J. (2023). Kaempferol-3-rhamnoside overaccumulation in flavonoid 3'-hydroxylase tt7 mutants compromises seed coat outer integument differentiation and seed longevity. *New Phytologist*, 238(4), 1461–1478. <https://doi.org/10.1111/nph.18836>
- Phukan, U. J., Jeena, G. S., & Shukla, R. K. (2016). WRKY transcription factors: Molecular regulation and stress responses in plants. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Issue JUNE2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>
- Pirredda, M., Fañanás-Pueyo, I., Oñate-Sánchez, L., & Mira, S. (2024). Seed Longevity and Ageing: A Review on Physiological and Genetic Factors with an Emphasis on Hormonal Regulation. In *Plants* (Vol. 13, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13010041>
- Poutanen, K. S., Kårlund, A. O., G Omez-Gallego, C., Johansson, D. P., Scheers, N. M., Marklinder, I. M., Eriksen, A. K., Silventoinen, P. C., Nordlund, E., Sozer, N., Hanhineva, K. J., Kolehmainen, M., & Landberg, R. (2022). Grains—a major source of sustainable protein for health. *Nutrition Reviews*. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab084>
- Rains, M. K., De Silva, N. D. G., & Molina, I. (2018). Reconstructing the suberin pathway in poplar by chemical and transcriptomic analysis of bark tissues. *Tree Physiology*, 38(3), 340–361. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/TPX060>
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus Biologies*, 331(10), 796–805. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2008.07.021>
- Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S. P. C., Belghazi, M., Job, C., & Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, 148(1), 620–641. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>

- Ralf Stracke, M. W. and B. W. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 447–456.
- Renard, J., Niñoles, R., Martínez-Almonacid, I., Gayubas, B., Mateos-Fernández, R., Bissoli, G., Bueso, E., Serrano, R., & Gadea, J. (2020). Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. *Plant Cell and Environment*, 43(10), 2523–2539. <https://doi.org/10.1111/pce.13822>
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., & Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology*, 53(1–2), 247–259. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009297.37235.4A>
- Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Debeaujon, I., Pourcel, L., Caboche, M., Einhorn, J., & Lepiniec, L. (2006). Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 224(1), 96–107. <https://doi.org/10.1007/S00425-005-0197-5>
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., & Shen, Q. J. (2010). WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15(5), 247–258. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.02.006>
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E. E., Zandalinas, S. I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., & Orzaez, D. (2011). GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021622>
- Toledo, S., Bippus, A. C., & Tomescu, A. M. F. (2018). Buried deep beyond the veil of extinction: Euphyllphyte relationships at the base of the spermatophyte clade. *American Journal of Botany*, 105(8), 1264–1285. <https://doi.org/10.1002/AJB2.11102>
- Verma, S., Attuluri, V. P. S., & Robert, H. S. (2022). Transcriptional control of *Arabidopsis* seed development. In *Planta* (Vol. 255, Issue 4). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03870-x>
- Wang, H., Cheng, X., Yin, D., Chen, D., Luo, C., Liu, H., & Huang, C. (2023). Advances in the Research on Plant WRKY Transcription Factors Responsive to External Stresses. In *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 45, Issue 4, pp. 2861–2880). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cimb45040187>
- Wang, X., Du, B., Liu, M., Sun, N., & Qi, X. (2013). *Arabidopsis* Transcription Factor WRKY33 Is Involved in Drought by Directly Regulating the Expression of *CesA8*. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 21–27. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.46A004>
- Woody, S. T., Sandra, A. E., Ae, A.-P., Amasino, R. M., Patrick, A. E., & Krysan, J. (2007). The WiscDsLox T-DNA collection: an *Arabidopsis* community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *Journal of Plant Research*. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0048-x>
- Xiao, R., Zhang, C., Guo, X., Li, H., & Lu, H. (2021). MYB transcription factors and its regulation in secondary cell wall formation and lignin biosynthesis during xylem development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073560>
- Xing, D. H., Lai, Z. B., Zheng, Z. Y., Vinod, K. M., Fan, B. F., & Chen, Z. X. (2008). Stress- and pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense. *Molecular Plant*, 1(3), 459–470. <https://doi.org/10.1093/mp/ssn020>

Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., & Ye, Z. H. (2009). MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(1), 248–266. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063321>

ANEXOS

Anexo 1. Cebadores directos y reversos empleados para analizar la expresión diferencial de genes mediante qRT-PCR (F: cebador directo, R: cebador reverso)

| | |
|----------------------|------------------------------|
| qRT <i>WRKY48</i> F | CAAAAACAGTCCTTATCCCAGAAGC |
| qRT <i>WRKY48</i> R | CGTGAGCATTCCGATGTGTC |
| qRT <i>MYB15</i> F | CCAAATACTTGGCAATAGATGGTCAG |
| qRT <i>MYB15</i> R | TGCTGGTCTTAGGTTTAGCTGG |
| qRT <i>MYB96</i> F | CCCTTTTAGGCAACAGATGGGC |
| qRT <i>MYB96</i> R | TGAACTAGTGTTTGATGAAGAGACACC |
| qRT <i>MYB42</i> F | TCTTCTCGGCAACAGATGGTC |
| qRT <i>MYB42</i> R | TGTCGGCTTTCGATGAAGTTTCAG |
| qRT <i>MYB85</i> F | CATGCTAATCTCGGCAATAAGTGGTC |
| qRT <i>MYB85</i> R | CACTGAGACATCGTCTGGATTGG |
| qRT <i>MYB64</i> F | TGGCCGTTATTGGAGAAATCGTC |
| qRT <i>MYB64</i> R | CATCACCAACTTTATCAACTTCCTGTCT |
| qRT <i>CESA8</i> F | GCGGCAATCCTTACGATGAGAAT |
| qRT <i>CESA8</i> R | CAGCTCTCCACTCTGTTCTTCC |
| qRT <i>WRKY33</i> F | GAACAATGGAGCCAAACCGAG |
| qRT <i>WRKY33</i> R | GTTTCATTGTCCCCTTCCATCTC |
| qRT <i>CYP94B1</i> F | CCGTTCCAGAACTTGTTAAGGCT |
| qRT <i>CYP94B1</i> R | GGCCCGGATGATCTCAGAC |