

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Epistasia entre *ATHB25* y *COG1*, factores de transcripción que aumentan la longevidad de semillas de *Arabidopsis thaliana*, y enzimas implicadas en la formación de la suberina y el mucílago.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: SAMUEL BARBERÀ MORENO

TUTORES: RAMÓN SERRANO SALOM Y EDUARDO BUESO RÓDENAS

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, 30 DE JUNIO DE 2015





Datos personales

Nombre y apellidos: Samuel Barberà Moreno

Datos del trabajo fin de grado

Título: Epistasia entre *ATHB25* y *COG1*, factores de transcripció que augmentan la longevitat de semilles de *Arabidopsis thaliana*, y enzimas implicadas en la formació de la suberina y el mucílago.

Titulació: Grado en Biotecnología

Tutores: Ramón Serrano Salom y Eduardo Bueso Ródenas

Fecha de lectura: Julio 2015

Resum

La longevitat de les llavors és un factor crític a l'agricultura. A mesura que passa el temps, van perdent viabilitat i açò obliga als agricultors a comprar-ne de noves tots els anys. Este fet provoca un augment de les despeses associades a la producció i disminueix els beneficis de l'agricultor. Per tant, la recerca dels gens implicats en la longevitat de les llavors constitueix un nou objectiu en la millora genètica d'aquelles plantes d'interès agrícola.

En aquest treball s'ha estudiat la relació dels factors de transcripció *ATHB25* i *COG1* amb components essencials de la formació de la coberta de la llavor d'*Arabidopsis thaliana* com són *PRX25*, *GPAT5* i *SEX1* per poder determinar si la resistència a l'envelliment es veu alterada en els mutants de pèrdua de funció d'aquests components.

Per poder determinar l'efecte es varen crear els individus que posseïen una sobreexpressió dels factors de transcripció *ATHB25* i *COG1* amb individus mutants de pèrdua de funció per als enzims *PRX25*, *GPAT5* i *SEX1*. Posteriorment, es van determinar els mutants dobles homozigots i s'analitzaren característiques fenotípiques com la grandària, la resistència a l'envelliment de la llavor, la permeabilitat i les possibles alteracions en la deposició de mucílago i de suberina.

Els resultats han mostrat que l'augment de la resistència a l'envelliment rau en la sobreexpressió dels factors de transcripció *ATHB25* i *COG1* perquè són capaços de promoure canvis en la coberta de la llavor. Açò es va comprovar mitjançant l'aïllament de mutants dobles per als enzims *PRX25*, *GPAT5* i *SEX1*.



Paraules clau

Arabidopsis, aciltransferasa, suberina, mucílag, epistasia

Abstract

Seed longevity is a critical factor in agriculture. As time passes, they lose viability and this requires farmers to buy new ones every year. This fact causes an increase in expenses associated with the production and decreased profits for the farmer. Therefore, the search for genes involved in seed longevity is a new target in breeding those plants of agricultural interest.

This work has studied the relationship between transcription factors ATHB25 and COG1 and essential components of the formation of the testa in *Arabidopsis thaliana*. These components are PRX25, GPAT5 and SEX1. To determine whether the resistance is, we make aging mutants altered in the loss of function of these components.

To determine the effect we crossed the individuals who owned overexpression of the transcription factors ATHB25 and COG1 with individuals that have loss of function mutant enzymes PRX25, GPAT5 and SEX1. Later, we determined the double homozygous mutants and analysed phenotypic characteristics such as size, resistance to aging in seeds, permeability and possible alterations in the deposition of suberin and mucilage.

The results showed that the increased aging resistance lies in the overexpression of the transcription factors ATHB25 and COG1 because they are able to promote changes in the testa. This was verified by isolating double mutants of the enzymes PRX25, GPAT5 and SEX1.

Key words

Arabidopsis, acyltransferase, suberin, mucilage, epistasis

AGRAÏMENTS

En primer lloc vull agrair a Ramón i a Mariche l'oportunitat de desenvolupar el meu Treball de Final de Grau al seu laboratori, i més amb les circumstàncies de com vaig arribar-hi. A vosaltres dos, gràcies pel vostre somriure amable i familiar, la consideració, la paciència i les formes tan educades que són característiques de les bones persones, dels bons cors.

En segon lloc vull donar-li les gràcies al meu tutor, Edu, que amb paciència, dedicació i atenció, ha sabut transmetre'm la importància del treball ben fet, la constància que es necessita al laboratori, el coneixement tècnic, la perspectiva científica i, si més no, les seues xicotetes manies (els dos sabem de què estic parlant). També vull agrair-li el respecte que he rebut com a persona i la formalitat dels tractes, valors que m'han fet sentir des d'un primer moment com un més de l'equip del laboratori. Per descomptat, no puc deixar de costat a la meua inestimable companya Irene. Has sigut un punt de suport enorme durant tot el temps que ha durat este treball. De tu m'emporte l'alegria, l'interès, la cura a l'hora de desenvolupar un experiment, la preocupació per obtenir bons resultats i les nostres meravelloses xarrades filosòfico-polític-economico-culturals. Eres i seràs molt especial per a mi. També vull agrair-los a Jesús, Lola, Marcos, Manu, Belén i Betlem els seus consells, la visió i les comentaris graciosos que fan que done gust anar a treballar.

En tercer lloc vull donar les gràcies a la meua família i amics, especialment als meus pares. Gràcies per estar sempre al meu costat, per saber traure'm un somriure en els pitjors moments, per donar-me ànims quan més els necessitava i pel vostre amor i respecte. Estos dos valors m'han ajudat a avançar, a créixer com a persona i a semblar-me, encara que siga un poc, a vosaltres. Aprofite estes línies per agrair-li, a ella, la força, la valentia i el coratge que ens ha transmès a tots, encara que hui no es trobe entre nosaltres. Espere que allà on estigues ens continues ajudant com quan era de costum.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Erosión genética	4
1.2 Conservación de los recursos fitogenéticos	6
1.3 Longevidad de semilla	7
1.4 Factores que afectan a la longevidad de la semilla	7
1.5 La cubierta de las semillas	8
1.5.1. Origen, desarrollo y diferenciación de la cubierta	8
1.5.2 Suberina	10
1.5.3 Giberelinas.....	11
1.6. Factores de transcripción DOF	12
1.7. Enzimas relacionadas con el desarrollo de la cubierta.....	13
1.8 Antecedentes del proyecto	14
1.8.1 Rastreo de mutantes con semillas más longevas.....	14
1.8.2 Localización de la inserción en los mutantes seleccionados.....	14
1.8.3 Análisis de la expresión de los genes adyacentes en los mutantes	15
1.8.4 Recapitulación del fenotipo mediante líneas de sobreexpresión.....	15
1.8.5 COG1 y ATHB25 regulan la capa de suberina de la cubierta de la semilla.....	15
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Obtención de mutantes.....	19
3.2 Esterilización húmeda de semillas.....	19
3.3 Cultivo en medio sólido Murashige-Skoog (ms)	19
3.4 Cultivo en invernadero	20
3.5 Aislamiento de DNA genómico.....	20
3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
3.6.1 Oligonucleótidos cebadores.....	21
3.6.2 Condiciones de la PCR	21

3.7 PCR diagnóstica.....	22
3.8 Electroforesis de DNA.....	22
3.9 Envejecimiento acelerado	23
3.10 Tinción de la capa de mucílago con rojo de rutenio.....	23
3.11 Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán	23
3.12 Tinción de permeabilidad	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Tamaño de la semilla	29
4.2 Envejecimiento	31
4.3 Mucílago	34
4.4 Suberina.....	35
4.5 Permeabilidad.....	37
5. CONCLUSIONES	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Erosión genética

Los humanos, después del último periodo glacial, cambiaron su estilo de vida de tipo nómada a sedentario. Este cambio supuso el inicio de procesos de domesticación tanto de plantas como de animales. En el caso de las plantas, se escogieron aquellas que presentaban una mejor adaptación a las condiciones ambientales de la época. Este proceso de selección y domesticación fue denominado como “Primera Revolución Verde”, que supuso una reducción importante de la variabilidad genética puesto que muchas variedades no eran interesantes para el cultivo (van de Wouw *et al.*, 2009).

En el siglo XX, durante la década de los 40, ya se poseían un gran número de variedades de cultivos tradicionales de todas aquellas especies que podían tener impacto o interés en la agricultura. Fue entonces cuando se produjo la “Segunda revolución Verde”. Esto supuso un aumento del 50% de los rendimientos de producción por el uso de fertilizantes, implantación de sistemas mecánicos de recolección, la utilización de sustancias químicas para prevenir enfermedades y plagas, y la entrada de cultivos derivados de la mejora genética vegetal. Estas nuevas variedades introducidas destinadas al uso comercial eran bastante homogéneas a nivel genético y se adaptaban mucho mejor tanto a las técnicas de producción como a la comercialización agrícolas, lo que provocó grandes beneficios para una población en constante crecimiento. Sin embargo, la utilización de este tipo de variedades todavía redujo más la variabilidad genética existente por el abandono de variedades que no cumplían con determinados estándares de producción (Iriondo, 2009).

La biodiversidad es la totalidad de la variación hereditaria en todos los niveles de organización biológica, desde los genes a los individuos, poblaciones, especies, comunidades y ecosistemas (Wilson EO, 1988). Además, es esencial tanto para que se produzca la especiación como para que las especies puedan sobrevivir en un entorno cambiante que les es desfavorable.

La erosión genética se puede definir como la pérdida de biodiversidad (www.redandaluzadesemillas.org). La selección artificial clásica que se ha llevado a la praxis desde la Primera Revolución Verde, una economía globalizada, las costumbres y hábitos alimenticios cada vez más homogéneos y las nuevas técnicas de selección genética encaminadas a satisfacer las necesidades de los consumidores y productores, han intensificado los efectos de la erosión genética. Las variedades mejoradas a nivel de estabilidad y de producción, el desplazamiento de cultivos tradicionales, la destrucción de ecosistemas

naturales que han provocado la desaparición de muchas especies, han provocado una fuerte reducción de la variabilidad genética. El estrechamiento genético entre especies puede suponer un problema muy grave en un futuro próximo.

El estrechamiento genético provoca una gran susceptibilidad en las especies a nuevos patógenos. Un ejemplo de la gravedad de este hecho es la conocida como “hambruna de la patata” que se produjo en Irlanda en el siglo XIX en la que todos los cultivos de patata presentaban uniformidad genética varietal y eran susceptibles al hongo *Phytophthora infestans* que destruyó la gran mayoría de los cultivos. Sus efectos provocaron que millones de irlandeses emigraran a EE.UU. Desgraciadamente, esta situación no es la única que se conoce. De hecho, una cepa de *Helminthosporium maydis*, en 1970, destruyó la mitad de los maizales situados al sur de EE.UU. puesto que procedían de semillas híbridas obtenidas a partir de una única variedad.

En el siglo XIX, en los años cincuenta, se reconoció que la pérdida de biodiversidad era un problema serio que afectaba tanto a la agricultura más avanzada como a los propios ecosistemas. Esto condujo a la implantación de medidas para la conservación de las fuentes de variabilidad genética. Concretamente, la FAO, en 1961, convocó una reunión denominada “Plant Exploration and Introduction” con la finalidad de determinar la situación, conservación, empleo, exploración, etc., de los recursos fitogenéticos disponibles. A partir de esta reunión, un gran número de conferencias, asociaciones y organizaciones se han encargado de preservar, conservar y proteger las fuentes de variabilidad genética. La Figura 1 muestra las variaciones de la diversidad con el tiempo:

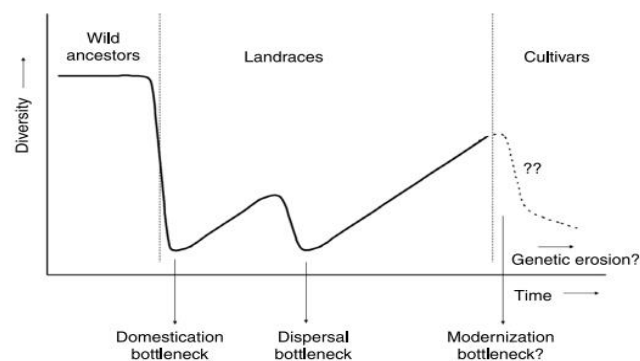


Fig. 1. Evolución de la diversidad de la especies vegetales durante la historia de la humanidad, adaptado de van de Wouw *et al.* (2009).

1.2 Conservación de los recursos fitogenéticos

Se pueden definir los recursos fitogenéticos como “el material hereditario que posee un valor científico, social y económico que está contenido en las diferentes especies” (FAO, 1983). Estos recursos están contenidos en el reino vegetal y tienen una especial relevancia para las próximas generaciones. Por tanto, los recursos fitogenéticos corresponderían a cualquier material hereditario de origen vegetal que tiene la capacidad de propagar y reproducir las diferentes especies de plantas (<http://snics.sagarpa.gob.mx>).

Actualmente, es posible trabajar sobre especies que poseen un interés potencial referido a la su conservación fitogenética, también sobre las especies ornamentales y de importancia agronómica puesto que se han desarrollado distintas estrategias para poder gestionar la conservación a nivel de ecosistema, de individuos o a nivel génico. Sin embargo, la falta de bancos de DNA capaces de preservar la conservación provoca que tanto la conservación ecológica como la de organismos sean las más relevantes. Básicamente existen dos tipos distintos de conservación: *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* hace referencia al mantenimiento de las especies y variedades vegetales en hábitat originario y natural favoreciendo a que los procesos evolutivos originen nuevas fuentes de variación. A pesar de esto, la conservación *ex situ* es la más habitual y consiste en tomar las plantas, partes de ellas o sus semillas y mantenerlas fuera de su hábitat natural en bancos de conservación. Esta estrategia permite coleccionar una gran cantidad de recursos fitogenéticos con un bajo coste, pero no permite obtener nuevas fuentes de variación y se pueden producir pérdidas de material vegetal. Los bancos de germoplasma constituyen el método más utilizado en la conservación a largo plazo.

Las semillas constituyen una forma muy interesante de propagación de las especies vegetales puesto que son capaces de mantener su viabilidad durante largos lapsos de tiempo, son unidades diseminativas individuales y, al recibir los estímulos específicos, pueden dar lugar a la germinación sin sufrir cambios genéticos importantes. Por estas razones constituyen el modelo más idóneo para formar los bancos de conservación y además poseen en general un tamaño bastante pequeño por lo que en un espacio relativamente reducido es posible concentrar muchas entradas de diferentes especies y variedades (Pita-Villamil y Martínez-Laborde, 2001).

1.3 Longevidad de semilla

La longevidad de las semillas es un factor importante para medir la viabilidad, regeneración, documentación y distribución de las semillas. Además, constituye una medida de la calidad de los bancos de semillas. La longevidad de las semillas se define como aquel periodo de tiempo en el cual la semilla es capaz de mantener su poder de germinación. Básicamente, existen dos tipos de semillas: las ortodoxas (semillas capaces de conservar la viabilidad en condiciones de baja humedad) y las recalcitrantes (semillas que germinan inmediatamente después de su dispersión o diseminación y que no toleran descensos en la humedad). Las semillas ortodoxas permiten alargar la capacidad de germinación cambiando las condiciones de humedad y temperatura.

No obstante, a pesar de todas las precauciones que existen, las semillas van perdiendo viabilidad con el paso del tiempo. Por ello son necesarios controles periódicos de la viabilidad así como programas de regeneración de las especies cuando su viabilidad se encuentre por debajo del 85% (Martín, 2011).

1.4 Factores que afectan a la longevidad de la semilla

El mejor sistema para la propagación de las plantas son las semillas. A pesar de esto, aunque se puedan almacenar bajo determinadas condiciones en los bancos de germoplasma, pierden viabilidad con el tiempo. Este fenómeno se denomina envejecimiento y se debe tanto a factores genéticos como ambientales (Rajjou and Debeaujon, 2008; He *et al.*, 2014). La importancia del estudio de los factores moleculares que intervienen tanto en el desarrollo como en la longevidad de las semillas es clave para la obtención de cultivos mejorados y para la conservación de la biodiversidad durante largos periodos de tiempo.

Existe un complejo entramado de rutas metabólicas implicadas en el desarrollo de las semillas. Esta red se articula gracias a la acción de factores de transcripción específicos como LEC1, LEC2, FUS3 y de hormonas de crecimiento como las auxinas y giberelinas en la primera fase de la morfogénesis; en la segunda fase de la maduración, actúan hormonas de estrés como el ácido abscísico y el factor de transcripción activado por el ácido abscísico ABI3 (Holdsworth *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 2007; Barybrook and Harada, 2008; Suzuki and McCarty, 2008). Se ha observado que los individuos que poseen mutaciones en estos factores de transcripción generan semillas con una menor longevidad (Clerkx *et al.*, 2004). Tanto la formación de la cubierta de la semilla, durante la etapa de la morfogénesis, como la acumulación de moléculas protectoras frente al estrés que se acumulan durante la

maduración, son necesarias para la longevidad en semillas (Rajjou and Debeaujon, 2008). Aunque existan muchos estudios relacionados con el estudio de la inducción de defensas celulares frente al estrés (Gutierrez *et al.*, 2007; Kotak *et al.*, 2007) y de los mecanismos implicados contra la desecación y el estrés oxidativo (Bailly, 2004; Sattler *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2012; Chatelain *et al.* 2013), es poco lo que se conoce sobre los mecanismos implicados en la formación de la cubierta de las semillas

Uno de los principales factores de pérdida de viabilidad en semillas es el estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) están presentes en cada etapa del desarrollo de las semillas: desde que ocurre la desecación hasta la germinación. Las ROS son compuestos químicos extremadamente reactivos que pueden inactivar y alterar DNA, lípidos, RNA, proteínas... Además pueden provocar daños celulares, alterando así la capacidad germinativa de las semillas. Por tanto, el desarrollo por parte de la planta de nuevas estrategias dirigidas a la eliminación y la reducción de estos compuestos tóxicos o la paliación de los daños generados, han cobrado una relevancia importante. Por ejemplo, la síntesis de vitaminas o enzimas que reparen el daño oxidativo como la vitamina E que actúa como un antioxidante lipofílico (Sattler *et al.*, 2004), la metionilsulfoxido reductasa que repara las proteínas oxidadas (Châtelain *et al.*, 2013), la DNA glicosilasa apurínica/apirimidínica liasa que actúa sobre el DNA oxidado (Chen *et al.*, 2012) o la L-isoaspartil metiltransferasa que repara las proteínas que han sufrido una degradación química (Ogé *et al.*, 2008). Otro factor que parece estar implicado en la longevidad es el Heat Shock Factor A9 (Kotak *et al.*, 2007) que es capaz que aumentar la concentración de proteínas “Heat Shock” y aumentar la longevidad de las semillas (Prieto-Dapena *et al.*, 2006).

El aumento de compuestos antioxidantes, las proteínas LEA, los carbohidratos y la cubierta de las semillas son esenciales para aumentar la longevidad. Especialmente, la cubierta juega un papel muy importante en el mantenimiento de la viabilidad y por tanto de la longevidad de las semillas.

1.5 La cubierta de las semillas

1.5.1. Origen, desarrollo y diferenciación de la cubierta

Diez días después de la fecundación, las células de los tegumentos del óvulo se diferencian en células especializadas. Esta especialización da lugar a las células del endotelio, las células empalizadas y la epidermis. Por estas razones la cubierta de las semillas tiene origen

materno. Las células que se encuentran en la capa más próxima al endotelio, son capaces de sintetizar proantocianidinas (PA), también llamadas taninos condensados. Estos compuestos se engloban dentro de la familia de los flavonoides y son compuestos antioxidantes. Esta cualidad es muy importante para la protección de la semillas durante el su envejecimiento, puesto que son capaces de mitigar el efecto de las ROS. Hay muchos genes implicados en esta ruta que llevan la información necesaria para la biosíntesis de los flavonoides.

La cubierta de la semilla en *Arabidopsis* se forma a partir de dos tegumentos epidérmicos, externo e interno, que envuelven el óvulo maduro. Durante la antesis, el tegumento interno está formado, en general, por una capa de tres células, mientras que el tegumento externo está formado por dos capas de células, células epidérmicas y células de la empalizada (Gasser and Robinson-Beers, 1993; Robinson-Beers *et al.*, 1992; Schneitz *et al.*, 1995). Las células de la epidermis son productoras de mucílago y en las células de la empalizada se produce la deposición de suberina (Haughn, G. y Chaudhury, A., 2005). El mucílago es una pectina, es decir, un polisacárido hidrofílico y soluble formado por unidades de ramnosa y ácido galacturónico (Goto, 1985). Este polisacárido juega un papel muy importante tanto en la dispersión como en la germinación de las semillas.

El siguiente paso en el proceso de maduración de las semillas consiste en la acumulación de gránulos de almidón. Estos gránulos se depositan muy cerca de las paredes externas e internas de las capas celulares adyacentes que forman la cubierta. Aunque el almidón se acumule en ambas capas celulares, sólo la capa externa es capaz de transformar el almidón en mucílago para depositarlo entre la pared primaria celular y la membrana plasmática de estas células. Por esta razón, a nivel metabólico, es posible diferenciar estas dos capas. La acumulación de mucílago provoca una reducción del protoplasma, lo que provoca que éste se encuentre formando una especie de columna situada en el centro de la célula llamada columela. Como consecuencia de esta reducción, la vacuola de la célula tiende a fragmentarse o a desaparecer (Windsor, J.B. *et al.*, 2000).

Las células más externas refuerzan la pared exterior de la cubierta. Más tarde, después que se haya formado la columna de protoplasma en el centro de las células, empieza la degradación del almidón. A su vez, también se empieza a reforzar la columna protoplasmática mediante la formación de la pared secundaria. El proceso de refuerzo continúa hasta que el protoplasma queda completamente reforzado por la celulosa y el almidón ya no sea detectable.

A medida que las células externas producen mucílago, los gránulos de almidón rompen la vacuola en dos o tres vacuolas más pequeñas. Esto provoca que esta segunda capa de células genere más compresión contra la capa de células externa, de manera que a medida que los gránulos de almidón van degradándose se produce un refuerzo de las paredes de las células internas.

Después de que se haya formado el mucílago y tanto la degradación del almidón como el refuerzo de las paredes celulares se hayan completado, el mucílago se seca mediante su compresión contra una capa delgada de la superficie de la semilla. Por tanto, en las semillas maduras, la capa del mucílago deshidratado aparece rodeando la columna protoplasmática. Cuando las semillas maduras entran en contacto con el agua, rápidamente se produce la imbibición por parte del mucílago, lo que provoca un aumento de su volumen.

En un principio se pensaba que el almidón era el precursor de la capa de mucílago. Para poder determinar el papel que jugaba el almidón en la cubierta de las semillas, se crearon algunos individuos mutantes que tenían truncada alguna parte de la ruta metabólica implicada tanto en la formación como en la degradación del almidón. SEX1 (Starch EXcess1) es un mutante que no puede degradar el almidón (Caspar *et al.*, 1985; Caspar *et al.*, 1991). No obstante, se observó que este mutante era capaz de producir mucílago, por lo que tenía que existir alguna ruta alternativa relacionada con la producción de mucílago. Sin embargo, lo que sí se determinó en este mutante es que la columela no tenía la misma forma ni densidad en los individuos mutantes que en los individuos silvestres. Entonces se propuso que el papel que juega el almidón es clave para la formación de polisacáridos usados en el refuerzo de las paredes celulares (Windsor, J.B. *et al.*, 2000). Por el contrario, en este trabajo se muestra que la enzima SEX1 sí que podría estar implicada en la síntesis del mucílago. A su vez, la suberina y el mucílago presente en la capa externa también podían ejercer alguna función en la longevidad.

1.5.2 Suberina

La suberina uno de los principales poliésteres lipídicos en plantas y se puede encontrar en tejidos tanto externos como internos en regiones específicas durante el crecimiento (Kolattukudy, 2001; Bernards, 2002; Nawrath, 2002; Kunst *et al.*, 2005; Stark and Tian, 2006). Sin embargo, también se ha encontrado en la cubierta de las semillas (Espelie *et al.*, 1980; Ryser and Holloway, 1985; Moire *et al.*, 1999). Uno de los monómeros más importantes de la suberina es el glicerol (Croteau and Kolattukudy, 1974). El glicerol se encuentra unido covalentemente a los dominios alifáticos y aromáticos de la suberina (Moire *et al.*, 1999; Graça

and Pereira, 2000) y esterificado con ácidos grasos (Graça *et al.*, 2002). Estos hechos influyen marcadamente en la estructura del polímero ya que los monómeros alifáticos de la suberina pueden producir polímeros lineales, mientras que la presencia del glicerol permite la formación de polímeros entrecruzados y ofrece la posibilidad de formar estructuras tridimensionales poliméricas (Beisson *et al.*, 2007). En la raíz, por ejemplo, la suberina es la responsable de formar la banda de Caspari (Schreiber *et al.*, 1994) que disminuye el flujo de iones y agua hacia el apoplasto, permitiendo a la raíz tener un control sobre la toma de nutrientes (Sattelmacher, 2001; Enstone *et al.*, 2003; Ma and Peterson, 2003). A nivel subcelular suele localizarse dentro de las paredes de las células vegetales, aunque también puede localizarse entre la membrana plasmática y la parte interna de la pared (Bernards, 2002). No obstante, es poco lo que se conoce sobre las rutas de biosíntesis implicadas en su formación, incluidas las reacciones donde participan las aciltransferasas.

Como se ha descrito, el glicerol juega un papel clave para la formación del poliéster. A su vez, el Acil-CoA también es importante en este proceso como precursor de los grupos acilo (Croteau and Kolattukudy, 1974). Eso sugiere que debe existir una glicerol aciltransferasa dependiente de Acil-CoA, un tipo de aciltransferasa, implicada en la biosíntesis (Beisson *et al.*, 2003). El conocimiento relacionado con las funciones específicas de las aciltransferasas es útil para entender el movimiento de las cadenas de acilo y determinar tanto la síntesis como el transporte de lípidos. La generación de individuos mutantes nulos en una enzima específica puede ayudar a esclarecer la función y los efectos que produce. Un ejemplo es la glicerol-3-fosfato aciltransferasa5 (Beisson *et al.*, 2007). Mutantes en esta enzima mostraban algunas características fenotípicas distintas en comparación con los individuos silvestres como un aumento de la permeabilidad de las semillas, un descenso de la tasa de germinación y un crecimiento anormal de las raíces. Esto sugiere que la enzima es clave para las células productoras de suberina, así como para garantizar que la semilla funcione correctamente (Beisson *et al.*, 2007).

1.5.3 Giberelinas

Hormonas del crecimiento como las giberelinas pueden tener un papel importante para el aumento de la longevidad de las semillas. El mutante *isl1-1D* posee una sobreexpresión en el factor de transcripción ATHB25 localizado en el cromosoma 5. Este factor es capaz de aumentar la expresión de la ácido gliberélico-3 oxidasa2. Esta enzima está implicada en la ruta de biosíntesis de giberelinas y se observó que las concentraciones de las giberelinas activas (GA1 y GA4) eran superiores en los individuos mutados que en los silvestres. Además, líneas

antisentido con reducción de expresión en los factores de transcripción ATHB25, ATHB22 y ATHB31 manifestaban una menor longevidad de las semillas. Las semillas tratadas con GAs y las provenientes de la línea mutante DELLA con una señalización constitutiva de GAs son más tolerantes al envejecimiento (Bueso *et al.*, 2014).

En el laboratorio de Ramón Serrano, aparte de los factores de transcripción HOMEBOX, los resultados de otro rastreo mostraron que los factores de transcripción DOF también poseen un papel fundamental en el desarrollo de la cubierta.

1.6. Factores de transcripción DOF

Estudios genómicos comparativos entre *Caenorhabditis*, *Drosophila melanogaster*, levadura y *Arabidopsis* han determinado que las proteínas DOF (DNA-BINDING ONE ZINC FINGER) son factores de transcripción exclusivos de las plantas (Yanagisawa, 2002) y los presentan las plantas inferiores como el musgo *Physcomitrella patens* o como el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, angiospermas y gimnospermas. Además, presentan un dominio de unión al DNA formado por 52 aminoácidos muy conservados entre especies. La secuencia aminoacídica es la siguiente: CX₂CX₁₂CX₂C, y, al unirse un átomo de zinc (Zn²⁺), adquiere la conformación característica de “dedo de zinc”. Este dominio está localizado cerca del extremo N-terminal. En la siguiente figura se muestra un esquema gráfico de su estructura:

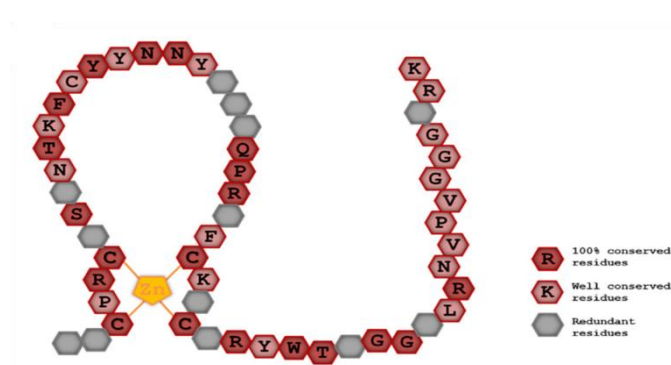


Fig. 2. Estructura de los factores de transcripción DOF, adaptado de Noguero *et al.* (2013).

Tal y como se observa en la imagen, existen cuatro cisteínas que son clave para la unión del átomo de zinc. Los enlaces formados con el átomo de zinc y la conservación del aminoácido triptófano en el extremo C-terminal, son esenciales para que la proteína adquiera el motivo específico de unión al DNA tanto *in vivo* como *in vitro* (Yanagisawa, 2001). Las secuencias que reconocen los factores DOF son CTTT o AAAG y pueden unirse a aquellos promotores que posean una o varias de estas secuencias (Kisu, *et al.*, 1998; Yanagisawa y

Schmidt, 1999). El resto de la proteína DOF posee gran variabilidad aminoacídica entre los extremos N y C-terminal por lo que sea estas diferencias las que marquen la especificidad de unión a otras proteínas, al DNA o, incluso, a otros factores de transcripción (Yanagisawa, 2001).

Los factores DOF están involucrados en una gran variedad de procesos y funciones biológicas. Debido a que están presentes solamente en plantas, regulan aspectos biológicos inherentes de las plantas como la germinación, la respuesta a la luz o el desarrollo de la semilla. Por tanto, estos procesos biológicos pueden clasificarse en regulación del metabolismo, desarrollo y germinación de la semilla y diferenciación de tejidos. Además, los factores DOF pueden desempeñar funciones redundantes entre los distintos grupos y, de algunos no se conoce todavía su función.

El mutante *isl5-1D* posee una sobreexpresión del gen COG1 que codifica para el factor de transcripción DOF1.5. Esta sobreexpresión provoca un refuerzo de la cubierta de la semilla aumentando así su tolerancia hacia el envejecimiento.

1.7. Enzimas relacionadas con el desarrollo de la cubierta

Existen diversas enzimas involucradas en la síntesis de la cubierta de la semilla de *Arabidopsis*. En el presente trabajo se va a abordar el estudio de longevidad de las semillas en los mutantes nulos para las enzimas peroxidasa 25 (*prx25*), glicerol-3-fosfato aciltransferasa 5 (*gpat5*) y alfa-glucano diquinasa mediada por agua: SEX1 (*sex1*).

Tanto las rutas de síntesis de la lignina como de la suberina, poseen enzimas comunes y una de ellas es la PRX25. Esta enzima tiene la función de polimerizar los monómeros responsables de la formación de lignina y/o suberina (Shigeto, J. *et al.*, 2013). La glicerol-3-fosfato aciltransferasa5 está involucrada en la biosíntesis de poliésteres como la suberina de la cubierta de las semillas (Beisson, R. *et al.*, 2007). Y, por último la SEX1 está involucrada en la fosforilación de las glucosas que forman parte de la amilopectina para que se pueda realizar la hidrólisis parcial del almidón (Tien-Shin, Y. *et al.*, 2001) y, posteriormente, la desfosforilación e hidrólisis completa del almidón, aunque estas últimas funciones corresponden a otras enzimas.

1.8 Antecedentes del proyecto

Una de las líneas de investigación del laboratorio del Dr. Ramón Serrano tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares relacionados con la longevidad de semillas. En los siguientes apartados, se detallan los resultados previos que condujeron a plantear la realización de este trabajo.

1.8.1 Rastreo de mutantes con semillas más longevas

Con el objetivo de aislar mutantes con mayor longevidad de semilla, el Dr. Eduardo Bueso y el Dr. Francisco Campos realizaron dos búsquedas independientes del conjunto de mutantes “activation tagging” de W. Scheible y C. Somerville. Para la identificación de estos mutantes, se utilizó un método de envejecimiento acelerado conocido como CDT (Controlled Deterioration Treatment) (Tesnier *et al.*, 2002). Las semillas inmersas en agua se estratificaron a 4°C durante 48 h. Posteriormente, se incubaron durante 48h a 42 °C. En la primera búsqueda o rastreo de mutantes, se analizaron unas 150.000 semillas que provenían de 30.000 líneas distintas. Mientras que en la segunda búsqueda, se sembraron unas 300.000 semillas provenientes de 60.000 líneas diferentes. Una vez realizadas, se preseleccionaron 290 individuos candidatos de la primera búsqueda y 387 de la segunda. La descendencia de los candidatos se analizó posteriormente. Una vez realizado el análisis de la siguiente generación, se pudo identificar el mejor individuo de cada búsqueda. Los mutantes seleccionados presentaban una inserción de copia única de T-DNA que co-segregaba con su mayor longevidad.

1.8.2 Localización de la inserción en los mutantes seleccionados

El Dr. Eduardo Bueso y el Dr. Francisco Campos recuperaron el plásmido presente en el T-DNA con las secuencias flanqueantes de los mutantes seleccionados con el objetivo de determinar la posición en dónde se había producido la inserción del T-DNA. En el primer mutante *isl1-1D* por “improved seed longevity”, la inserción se produjo en el cromosoma 5, concretamente entre los genes At5g65410 y At5g65420. El gen At5g65410 se le denomina ATHB25 ya que codifica para el factor de transcripción HOMEBOX25 en *Arabidopsis*.

Mientras que en el segundo mutante *isl5-1D*, la inserción se produjo en el cromosoma 1, concretamente entre los genes At1g29160 y At1g29170. El gen anterior a la inserción de At1g29160 (COG1) pertenece a una familia de factores de transcripción DOF, concretamente

codifica para el factor DOF1.5. Este factor, actúa regulando negativamente la señalización por luz de los fitocromos (PhyA y PhyB).

1.8.3 Análisis de la expresión de los genes adyacentes en los mutantes

En el caso de *isl5-1D*, se pudo determinar por qRT-PCR que la expresión de *COG1* era 6 veces mayor. En el caso de *isl1-1D*, comparando el genotipo silvestre con el genotipo mutado por RT-PCR semicuantitativa, se pudo determinar que la sobreexpresión sólo afectaba al gen *ATHB25*.

1.8.4 Recapitulación del fenotipo mediante líneas de sobreexpresión

Con la intención de comprobar si *COG1* y *ATHB25* regulan la longevidad de semillas en *Arabidopsis*, se llevó a cabo la obtención de plantas transgénicas sobreexpresoras de los cDNA de ambos factores transcritos. Tras la obtención de las semillas T3, se seleccionaron las líneas homocigotas y posteriormente fueron sometidas a envejecimiento acelerado. Estas líneas resultaron resistentes al tratamiento comparándolas con el genotipo silvestre. Por otra parte, mutantes dobles de pérdida tanto de *ATHB25* como de *ATHB22* (factor de transcripción más próximo a *ATHB25*) resultaron sensibles al envejecimiento acelerado. Las mismas conclusiones se obtuvieron mediante líneas amiRNA que reducían la expresión de los transcritos de *COG1* y *CDF4* (factor de transcripción más próximo a *COG1*).

1.8.5 COG1 y ATHB25 regulan la capa de suberina de la cubierta de la semilla

Mediante cruces recíprocos se comprobó que la resistencia a envejecimiento de las líneas sobreexpresoras de *COG1* y *ATHB25* tenía herencia materna, lo que significaba que la modificación de la cubierta debería ser la explicación más probable de esta resistencia. Se realizaron diferentes cortes histológicos y tinciones que condujeron a averiguar que la modificación de la cubierta era esencialmente a nivel de la capa de suberina en la capa más superficial de la cubierta. La modificación de esta capa producía a una impermeabilización de las semillas que sobreexpresan *COG1* y *ATHB25* como se pudo demostrar tras incubación en sales de tetrazolio, que al penetrar y ser reducidas metabólicamente forman un depósito rojo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El presente trabajo final de grado tiene el objetivo principal, el comprobar que la resistencia a envejecimiento en semillas de mutantes sobreexpresores de los factores de transcripción ATHB25 y COG1 viene mediada por una modificación de la cubierta.

2.2 Objetivos específicos

- Identificación de líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1 obtenidas por transformación de mutantes de pérdida de función de la peroxidasa 25 (*prx25*).
- Identificación de líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1 obtenidas por transformación de mutantes de pérdida de función de la glicerol-aciltransferasa 5 (*gpat5*).
- Identificación de líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1 obtenidas por transformación de mutantes de pérdida de función de la alfa-glucano-agua diquinasa (*sex1*).
- Estudio del tamaño de semilla en los mutantes de pérdida de función *prx25*, *gpat5* y *sex1* en líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1.
- Análisis de la longevidad de las semillas en los mutantes de pérdida de función *prx25*, *gpat5* y *sex1* en líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1.
- Tinción de componentes de la capa externa de la cubierta de la semilla en los mutantes de pérdida de función *prx25*, *gpat5* y *sex1* en líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1.
- Determinación de la permeabilidad de las semillas a tetrazolio en los mutantes con pérdida de función *prx25*, *gpat5* y *sex1* en las líneas sobreexpresoras de los factores de transcripción ATHB25 y COG1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención de mutantes

- La línea mutante seleccionada para la glicerol-3-fosfato aciltransferasa5 (*gpat5*) es la SALK_142456.
- La línea mutante seleccionada para la peroxidasa25 (*prx25*) es la GABI_716G12.
- La línea mutante seleccionada para la glucano-agua dikinasa (*sex1*) es la SALK_062752.

3.2 Esterilización húmeda de semillas

Se preparó una solución de etanol al 70% a la que se le añadió un 0,5% de Tritón X-100. Seguidamente, se preparó una solución de hipoclorito sódico al 2,5% (esto se consigue diluyendo a la mitad la lejía comercial con un 4% de cloro activo) a la que se le añadió un 0,5% de Tritón X-100. A continuación, se introdujeron 100 semillas aproximadamente de *A. thaliana* en un microtubo de 1,5 ml y se le agregó 1 ml de la solución de etanol con Tritón. El tubo se dejó en agitación durante 15 minutos. Posteriormente, se eliminó la solución de etanol con Tritón empleando una micropipeta y se agregó la solución de hipoclorito de sodio con Tritón. Las semillas se dejaron en agitación durante 8 minutos. Por último, en la campana de flujo laminar y en condiciones asépticas, se eliminó la solución de hipoclorito sódico y se realizaron 4 lavados con 1ml de volumen de agua *milli* Q estéril empleando una micropipeta y puntas estériles. Después del cuarto lavado se dejaron las semillas en agua durante 48 horas a 4°C con la finalidad de romper la etapa de latencia o estratificación antes de sembrarlas.

3.3 Cultivo en medio sólido Murashige-Skoog (MS)

Para el cultivo y germinación in vitro de las plantas se usaron placas Petri de 9 cm de diámetro a las que se les añadió 25 ml de medio de cultivo estándar MS en condiciones asépticas. Se empleó una solución comercial de sales de MS en polvo de la empresa Sigma-Aldrich (ref. M-5524) para la preparación del medio sólido en una proporción de 4,3 g/l, junto a sacarosa al 1%, tampón MES al 0,1% y agar al 1% ajustando el pH a 5,7 empleando KOH 1M. Este medio fue suplementado cuando fue necesario seleccionar plantas resistentes con:

- Sulfadiazina con una concentración de 75 µg/ml, Kanamicina con una concentración de 25 µg/ml, BASTA con una concentración de 50 µg/ml e Higromicina a una concentración de 25 µg/ml.

El medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y a una atmósfera de presión. Cuando se tuvo que añadir las sustancias termolábiles (antibióticos,

en este caso) se esperó hasta que la temperatura descendió hasta 50-60°C para evitar su descomposición. Las placas Petri se sellaron con cinta porosa (Micropore) y se incubaron en una cámara a una temperatura (23°C) y fotoperiodo (día largo: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) controlados con una intensidad lumínica de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.4 Cultivo en invernadero

Las plantas de *A. thaliana* se cultivaron en una mezcla de 2:1 de turba (Biolan): vermicuta exfoliada (Asfaltex). Las macetas se colocaron en bandejas y se irrigaron 2 veces de semana. Las condiciones para el crecimiento en el invernadero son de día largo: 23°C de temperatura, 70% de humedad relativa y una intensidad lumínica de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.5 Aislamiento de DNA genómico

Para el aislamiento del DNA genómico se utilizó una adaptación de la metodología del detergente catiónico CTAB descrita en McKinney *et al.* en 1995. Esta consiste en la toma de 1 g de tejido vegetal que se homogeniza en un mortero empleando nitrógeno líquido. Este homogeneizado se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se le añadió 400 μl de CTAB al 2% (2% p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl y 1% p/v PVP Mr 40.000) precalentado a 65°C y se incubó durante 20 minutos a 65°C. A continuación se añadieron 400 μl de cloroformo y se mezclaron usando el vórtex. Posteriormente, se realizó un centrifugado de 4 minutos a 5.000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a otro tubo eppendorf. Se añadió un volumen igual de isopropanol y, posteriormente, se centrifugó durante 4 minutos a 12.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 70% al precipitado. A continuación, se eliminó el etanol y se dejó secar el precipitado. Una vez seco, se añadieron 50 μl de agua *milli Q* estéril. Por último se añadieron 0,5 μl de RNAasa en una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se dejó en incubación durante 20 minutos a 37°C.

3.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.6.1 Oligonucleótidos cebadores

- Los cebadores empleados para el mutante GPAT5 son:

LP ATTCGGTCGTGTCAGAGTTTG

RP ATACCACAGGGTCCATTAGGG

- Los cebadores empleados para el mutante PRX25 son:

LP ATTGGTTTTCTTTGCCAACC

RP CTGCTGCACACATCACATACC

- Los cebadores empleados para el mutante SEX1 son:

LP TAAACTGTGTTGGCACTCCC

RP TGGGTCAAGTCGGTTAACAAG

- El cebador empleado para la detección del inserto de T-DNA en la línea SALK es:

lbb1.3: ATTTTGCCGATTCGGAAC

- El cebador empleado para la detección del inserto de T-DNA en la línea GABI es:

o2588: CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG

3.6.2 Condiciones de la PCR

Las dos reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en placas de 96 pocillos en los que se añadieron los siguientes reactivos:

- 1 μ l de DNA genómico.
- 2 μ l Tampón PCR 10x.
- 2 μ l dNTPs 10 mM.
- 1 μ l Cebador sentido (0,1 μ g/ μ l).
- 1 μ l Cebador antisentido (0,1 μ g/ μ l).
- 1 μ l Polimerasa (*Taq*) 1 U/ μ l.
- Agua *milli* Q estéril hasta completar un volumen de 20 μ l.

Las dos reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf) con las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de desnaturalización a 95°C.
- 40 ciclos:
 - 30 segundos de desnaturalización a 95°C.
 - 30 segundos de hibridación de los cebadores utilizando una temperatura de anillamiento de 3°C inferior a la T_m (“*melting temperature*”) de los cebadores.
 - Una extensión a 72°C durante 1 minuto por cada kb que se pretenda amplificar.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.7 PCR diagnóstica

Para poder identificar a los mutantes homocigotos que poseen la inserción del T-DNA de los mutantes heterocigotos y de aquellos que poseen el alelo silvestre, se realizaron dos reacciones de PCR diagnósticas empleando dos cebadores (RP y LP) que hibridan con el DNA genómico de *A. thaliana*, uno a cada lado del T-DNA, y un tercer cebador (LB) que hibrida con el inserto de T-DNA. Después de la amplificación, las líneas que poseían sólo la banda correspondiente a la combinación LP y LB eran homocigotos mutantes, los que poseían además la banda correspondiente a la combinación de cebadores LP y RP eran heterocigotas, mientras que aquellas líneas que sólo poseían la banda de la combinación de cebadores LP y RP eran silvestres.

3.8 Electroforesis de DNA

Para realizar una comprobación y determinar el genotipo de las líneas tomadas de *A. thaliana* se emplearon geles de agarosa a una concentración de agarosa del 0,7% (p/v). Esta agarosa se fundió en tampón de electroforesis TBE 0,5x (45 mM TrisBase, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Tanto el tampón de electroforesis como el gel contenían 0,05% (p/v) de bromuro de etidio. La visualización de las bandas de DNA de los geles de agarosa se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda.

El tampón de carga empleado fue Tampón 6x naranja (50% v/v glicerol, 60 mM Tris-HCl pH8, 6 mM EDTA y 0,35% p/v Orange G). El marcador de tamaño y peso molecular se empleó el patrón comercial 1Kb y λ /HindIII.

3.9 Envejecimiento acelerado

El protocolo de envejecimiento acelerado empleado en este trabajo fue una modificación del “basal thermotolerance assay” de Tejedor-Cano *et al.* (2012). Las semillas se dispusieron en agua, se estratificaron en agua durante dos días a 4°C y se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 42°C y una humedad relativa del 100% (en agua).

3.10 Tinción de la capa de mucílago con rojo de rutenio

Las semillas se dispusieron en agua durante 3 minutos antes de la aplicación de una solución acuosa de rojo de rutenio a una concentración de 0,2 % (p/v) durante 15 minutos. Las fotografías se tomaron empleando el microscopio Nikon's Eclipse E600.

3.11 Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán

El solución de rojo Sudán se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas por Bundrett *et al.* (1991):

- Reactivos:
 - Fat Red 7B: MP Biomedicals 15803.
 - PEG-300: Wako 164-09055.
- Solución de tinción:
 - Se disolvieron 55 mg de Fat Red 7B en 25 ml de PEG-300.
 - Se incubó durante una hora a 90°C y posteriormente se enfrió.
 - Se añadió un volumen igual de glicerol al 90%.
 - Se almacenó a temperatura ambiente.

Las semillas se incubaron a temperatura ambiente en una solución de agua con Tritón X-100 al 0,01% (p/v) y lejía comercial al 10% (v/v) para eliminar los pigmentos de las semillas. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos con agua destilada y etanol absoluto y se incubaron durante 30 minutos con una solución de cloroformo:metanol (2:1, v/v). A continuación, se lavaron con etanol 100% y se dejaron secar. Finalmente, se añadió la solución de Rojo Sudán 7B y se incubaron las semillas a temperatura ambiente entre 1 a 4 horas. Las fotos fueron tomadas por el microscopio Nikon's Eclipse E600.

3.12 Tinción de permeabilidad

La tinción de permeabilidad se llevó a cabo según las condiciones descritas por Debeaujon *et al.* (2000). Las semillas de *A. thaliana* se incubaron en oscuridad con una solución al 1% (p/v) de rojo de tetrazolio (2,3,5-trifeniltetrazolio) a 30°C durante 48 horas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos que se llevaron a cabo en este trabajo final de grado se enfocaron con la intención de determinar si la mayor longevidad de los mutantes que sobreexpresan ATHB25 y COG1 viene mediada por la modificación de la cubierta. Con tal fin, se realizaron los cruces con mutantes en componentes importantes de la cubierta como son *PRX25*, *GPAT5* y *SEX1* para determinar si existe epistasia ,es decir que la ganancia de función de los factores de transcripción no mejora la longevidad en estos mutantes. En concreto:

- *athb25-1D x gpat5*
- *cog1-2D x gpat5*
- *athb25-1D x prx25*
- *athb25-1D x sex1*

Las plantas F1 se crecieron en el invernadero y, posteriormente se recogieron las semillas de la F2.

Para distinguir los individuos que no poseían la sobreexpresión ATHB25 y COG1 de los que sí que la poseían, las semillas se germinaron en medios con glufosinato de amonio (resistencia proporcionada por la inserción del plásmido “activation tagging”).

De esta forma, los individuos que no poseían la mutación dominante no podían crecer ya que no poseían el gen de resistencia específico para el herbicida. Para conocer el genotipo homocigoto o heterocigoto de los individuos con las mutaciones recesivas en los genes *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR con los individuos que crecieron en herbicida. Estas reacciones se llevaron a cabo empleando cebadores específicos para los genes *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*.

En el caso de la primera reacción, dado el tiempo de extensión de la PCR, sólo podía existir amplificación en el caso de los individuos que poseían los alelos silvestres para los genes *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*. Por tanto, sólo se observa presencia o ausencia de banda. Si no hay banda es porque el individuo posee el inserto de T-DNA. Las siguientes imágenes muestran un esquema de la primera PCR y los resultados en gel de agarosa de los individuos *athb25-1D gpat5* de ésta, respectivamente:

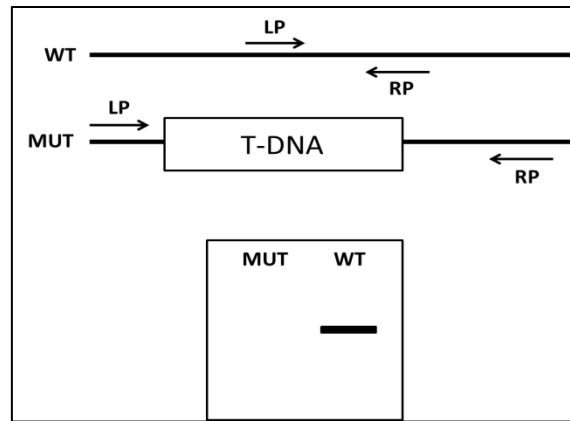


Fig. 3. Esquema de la PCR para la detección del alelo silvestre.

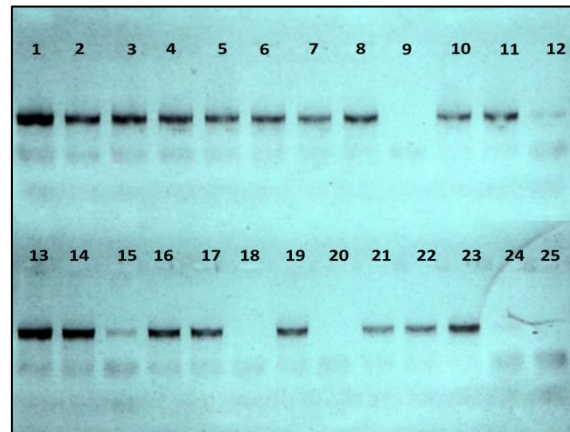


Fig. 4. Resultado de la PRC1 en gel de agarosa para el genotipo *athb25-1D gpat5*. Los individuos 9, 18, 20 y 24 son candidatos a ser mutantes dobles homocigotos.

Posteriormente, se llevó a cabo una segunda PCR con la finalidad de poder genotipar a los individuos para las mutaciones en los genes *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*. En esta PCR se emplearon cebadores específicos del inserto de T-DNA de manera que la presencia de banda indicaba que el individuo poseía un alelo con el inserto, el alelo mutante, y si no había presencia de banda era porque el individuo poseía el alelo silvestre y, por tanto, no tenía el inserto de T-DNA. En las siguientes imágenes se muestran el esquema de la segunda reacción de PCR y los resultados en gel de agarosa de los individuos *athb25-1D gpat5*, respectivamente:

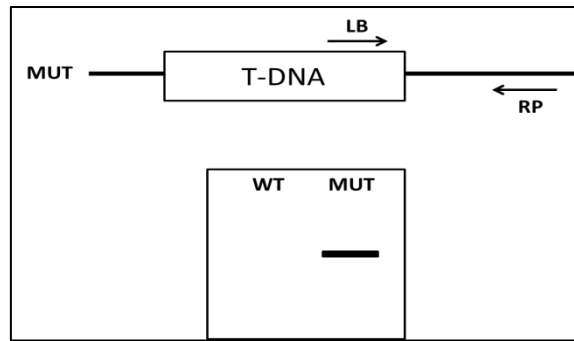


Fig. 5. Esquema de la PCR para la detección del alelo mutante.

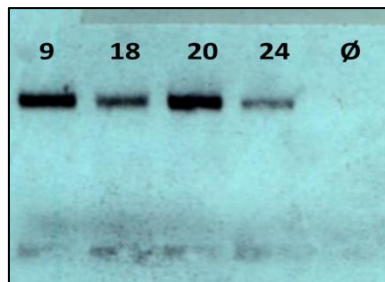


Fig. 6. Resultado de la PCR2 en gel de agarosa para el genotipo *athb25-1D gpat5*. Se comprueba que son mutantes dobles homocigotos.

Juntando los resultados de las dos PCRs existen tres combinaciones posibles que permiten establecer el genotipo de los individuos para los genes *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*, tal como se muestra en la siguiente tabla:

PCR1	PCR2	RESULTADO
+	+	HETEROCIGOTO
-	+	HOMOCIGOTO
+	-	SILVESTRE

Tabla. 1. Tabla resumen con los posibles resultados del genotipado por PCR.

Una vez seleccionados por PCR los individuos homocigotos mutantes para *SEX1*, *GPAT5* y *PRX25*, se recogieron las semillas de la F3 y se crecieron en presencia de antibiótico para seleccionar aquellos individuos homocigotos para las mutaciones en los genes *ATHB25* y *COG1*.

La lista de los individuos homocigotos mutantes caracterizados por las dos reacciones de PCR y la siembra en antibiótico, se muestra en la siguiente tabla:

Genotipo	Mutantes dobles homocigotos	Azigotos para la mutación recesiva
<i>athb25-1D gpat5</i>	L.18, L.20, L.24	L.1
<i>athb25-1D prx25</i>	L.3, L.4, L.14	L.7
<i>athb25-1D sex1</i>	L.4, L.22, L.23	L.17
<i>cog1-2D gpat5</i>	L.18,L.22	L.17, L.24

Tabla. 2. Tabla con las líneas seleccionadas como mutantes dobles homocigotas y azigotas para la mutación recesiva en los distintos genotipos.

Con la finalidad de determinar si existían características distintas en la descendencia de los distintos cruces, se llevó a cabo un estudio fenotípico que engloba tanto el tamaño de la semilla, como la resistencia que presentan al envejecimiento, la posible alteración de la capa de mucílago y las posibles modificaciones de la capa de suberina.

4.1 Tamaño de la semilla

En el caso del tamaño de las semillas, se tomaron muestras de las distintas líneas y se realizaron fotografías representativas con el microscopio óptico.

Posteriormente, se determinó el área proyectada por la semilla usando del programa *imageJ*. En las representaciones gráficas se muestran tanto la media y como la desviación estándar correspondientes para los distintos genotipos:

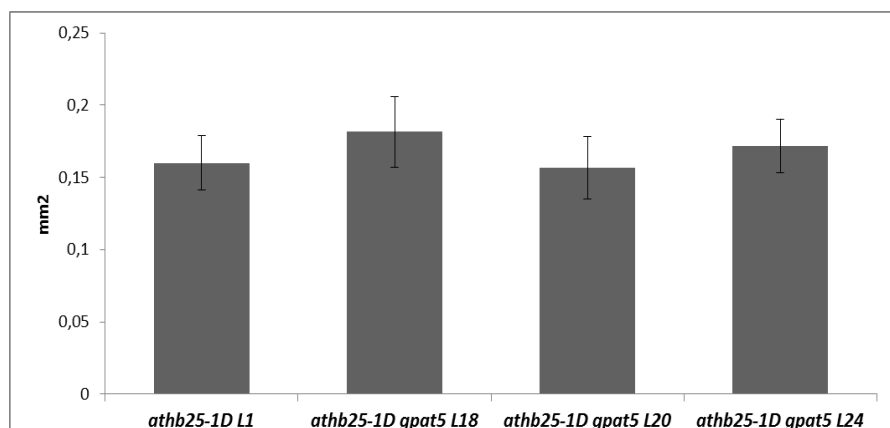


Fig. 7. Tamaño semilla en mm² del genotipo *athb25-1D gpat5*

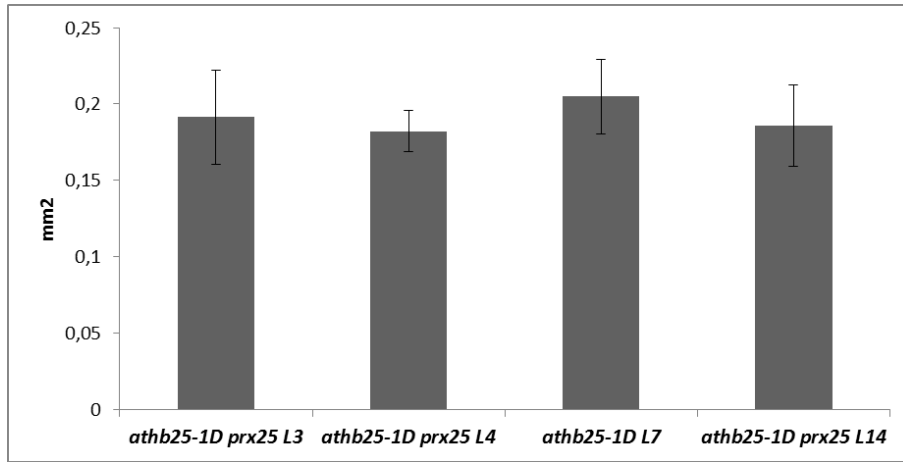


Fig. 8. Tamaño semilla en mm² del genotipo *athb25-1D prx25*.

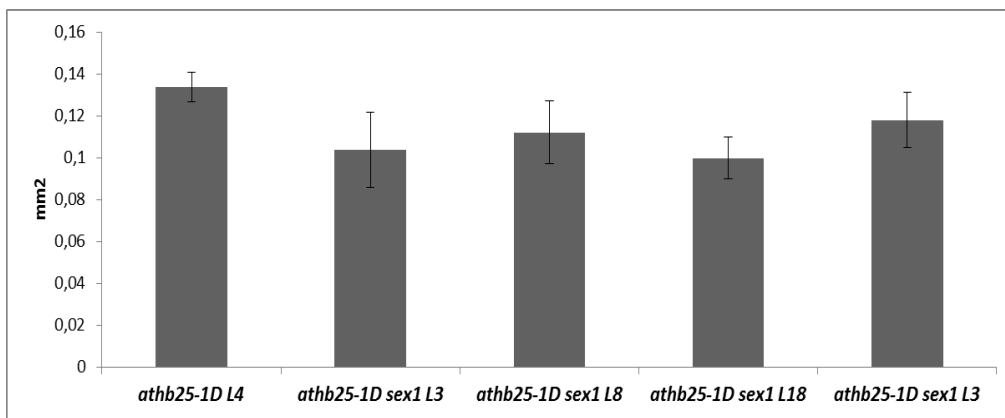


Fig. 9. Tamaño semilla en mm² del genotipo *athb25-1D sex1*

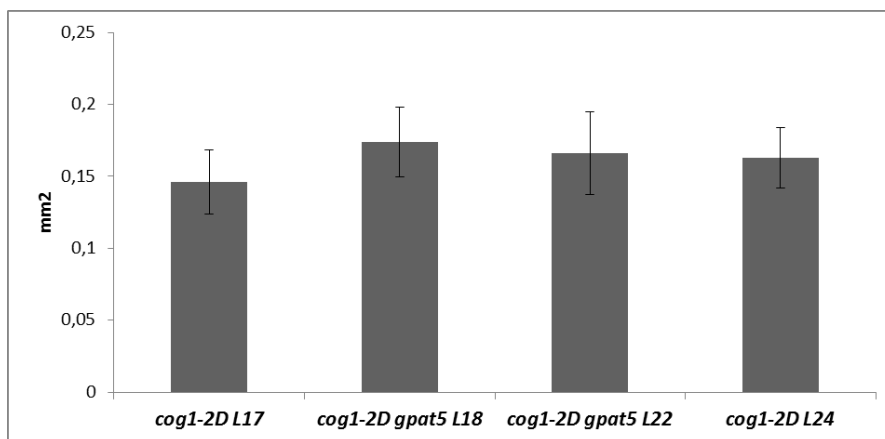


Fig. 10. Tamaño semilla en mm² del genotipo *cog1-2D gpat5*.

Tal y como se observa en los gráficos, los resultados obtenidos muestran que mutaciones en enzimas importantes para la formación de la cubierta no afectan al tamaño de las semillas de *A. thaliana*.

4.2 Envejecimiento

Las semillas de líneas F3 aisladas se sometieron a un tratamiento de envejecimiento acelerado. Por una parte se germinaron en MS sin tratamiento para comprobar que las líneas no tenían defecto en su germinación. Por otra, tras envejecimiento la semillas se sembraron en MS y se contabilizó la germinación tras varios días desde su siembra.

La siguiente imagen muestra las diferencias entre las muestras tratadas con el tratamiento de envejecimiento acelerado frente a las muestras no tratadas:

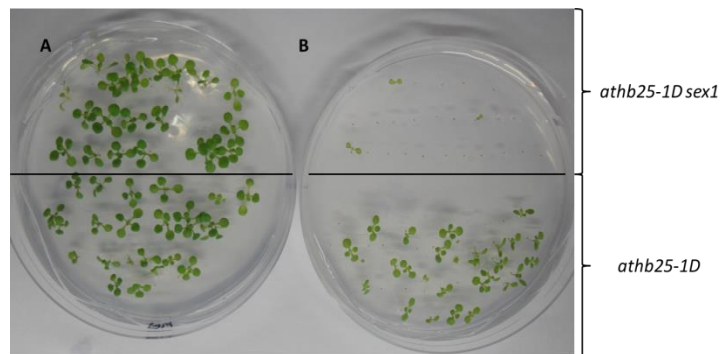


Fig. 11. Imagen tomada que muestra la comparación entre los genotipos *athb25-1D sex1* (parte superior) y el genotipo *athb25-1D* (parte inferior) cuando no han sido tratadas (A) y cuando han sido sometidas al tratamiento del envejecimiento acelerado (B).

Los resultados obtenidos para la tasa de germinación de los distintos genotipos corresponden a la fracción de semillas que han germinado frente a las totales que había en las placas. Los datos fueron tomados en los días 0, 3, 6 y 9 desde su siembra en medio MS. Los resultados obtenidos son los siguientes:

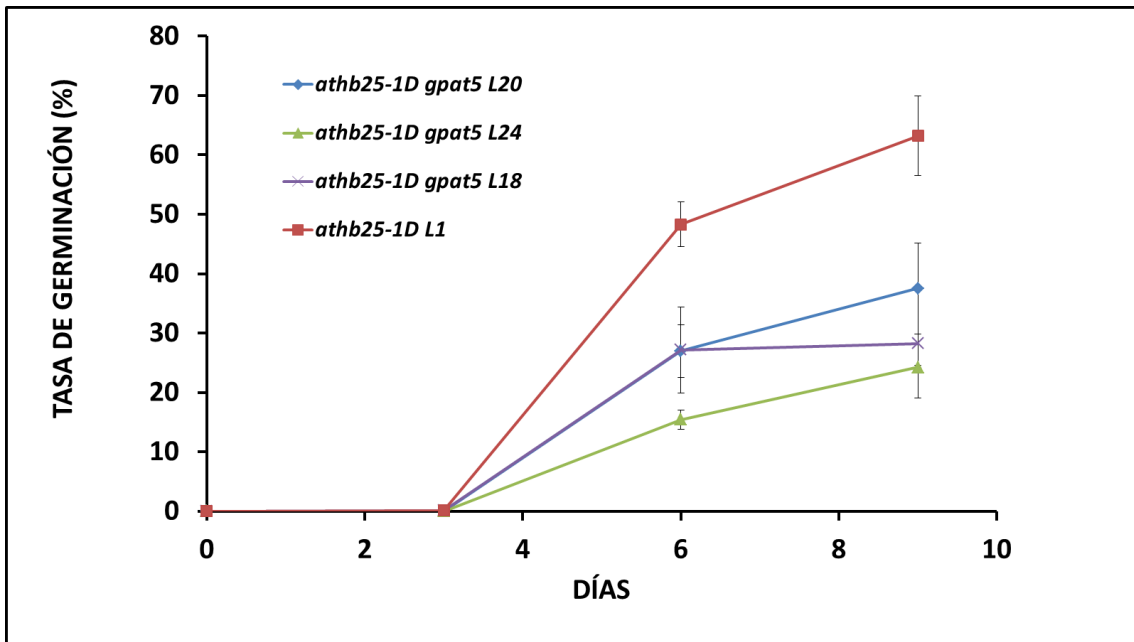


Fig. 12: Tasa de germinación del genotipo *athb25-1D gpat5* después del envejecimiento acelerado.

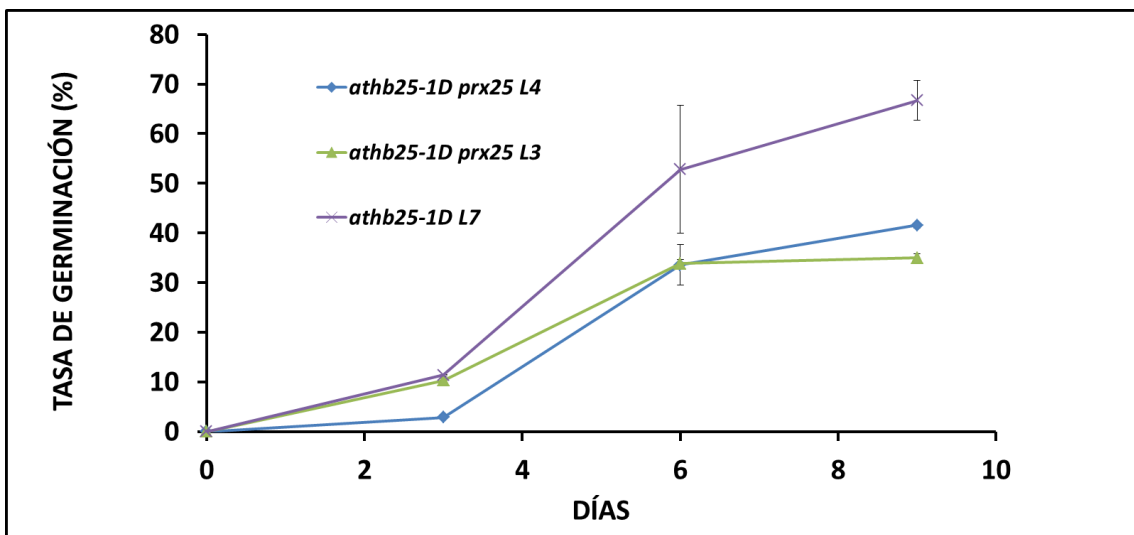


Fig. 13: Tasa de germinación del genotipo *athb25-1D prx25* después del envejecimiento acelerado.

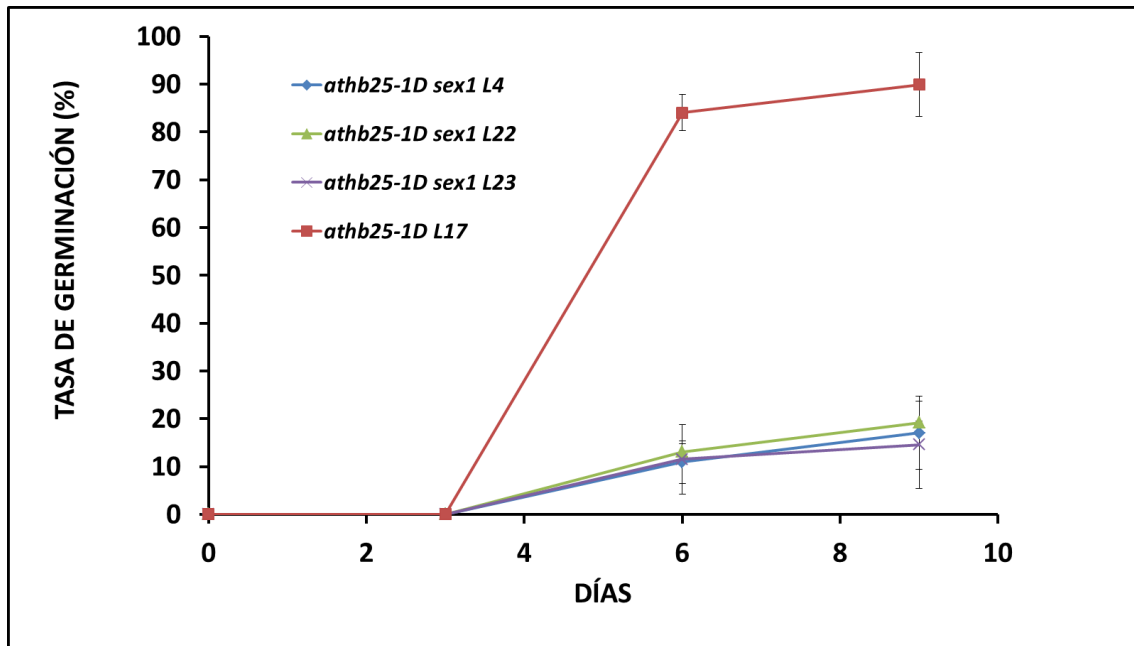


Fig. 14. Tasa de germinación genotipo *athb25-1D sex1* después del envejecimiento acelerado.

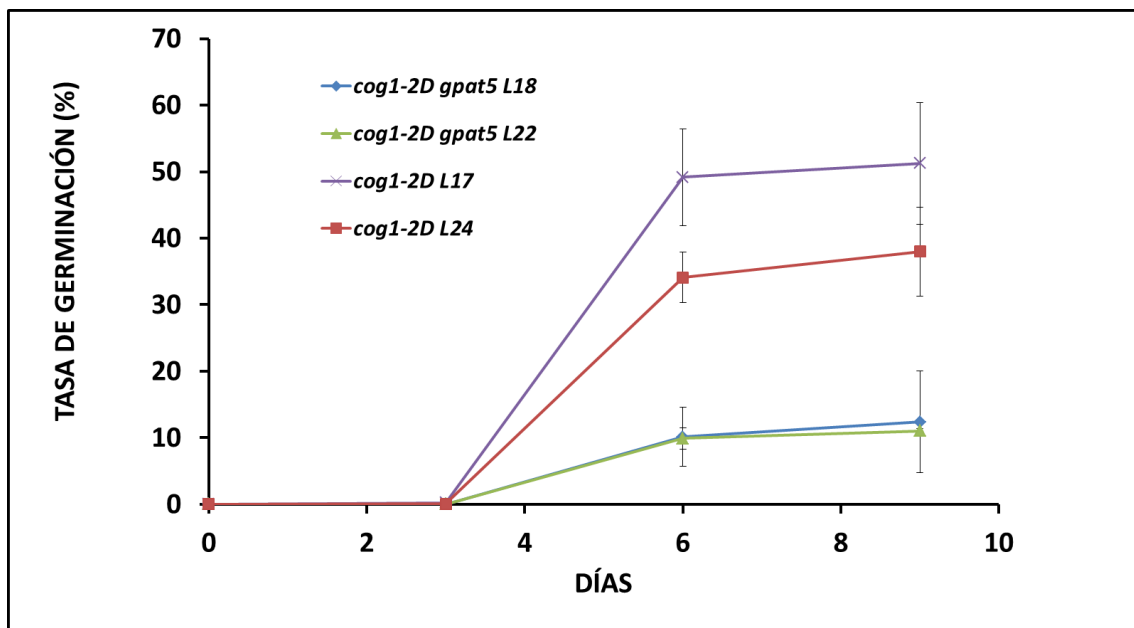


Fig. 15. Tasa de germinación al envejecimiento acelerado del genotipo *cog1-2D gpat5* después del envejecimiento acelerado.

Las gráficas obtenidas para la tasa de germinación muestran que las mutaciones introducidas en los distintos genotipos anulan el efecto de la sobreexpresión de los factores de transcripción que están implicados en la longevidad de las semillas. Esto se adecua a la hipótesis de que estos factores de transcripción ejercen un papel fundamental en la formación de la cubierta proporcionando una mayor longevidad a las semillas de *A. thaliana*. Sin embargo, no se conocen las partes de la cubierta que se ven afectadas por estas mutaciones.

4.3 Mucílago

La capa de mucílago se determinó mediante una tinción con rojo de ruterio y las imágenes se tomaron en el microscopio óptico.

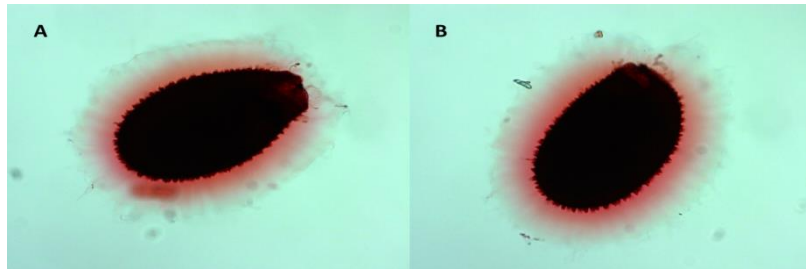


Fig. 16. Tinción de la capa de mucílago con rojo de Ruterio. La imagen A corresponde a la línea 1 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 18 de genotipo *athb25-1D gpat5*.

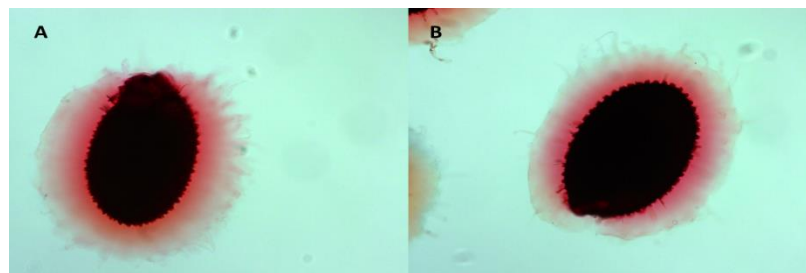


Fig. 17. Tinción de la capa de mucílago con rojo de Ruterio. La imagen A corresponde a la línea 7 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 14 de genotipo *athb25-1D prx25*.

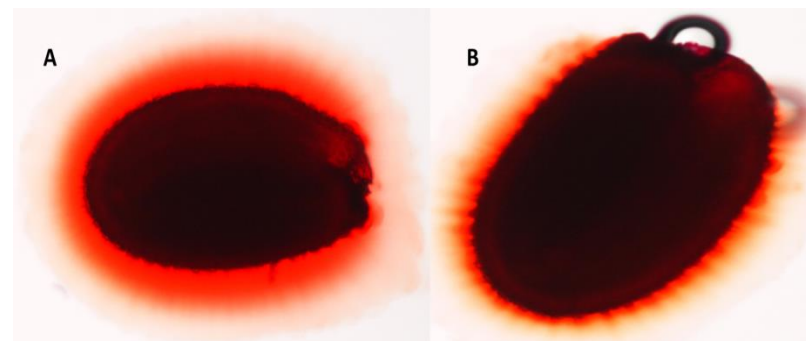


Fig. 18. Tinción de la capa de mucílago con rojo de Ruterio. La imagen A corresponde a la línea 17 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 22 de genotipo *athb25-1D sex1*.

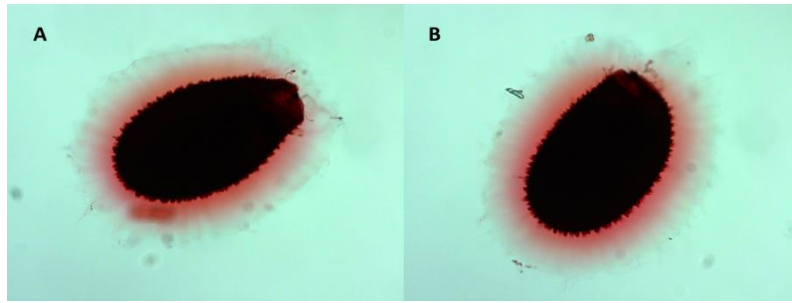


Fig. 19. Tinción de la capa de mucílago con rojo de Rutenio. La imagen A corresponde a la línea 24 (*cog1-2D*) y la imagen B corresponde a la línea 18 de genotipo *cog1-2D gpat5*.

Como muestran las imágenes, los dobles mutantes *athb25-1D gpat5*, *athb25-1D prx25*, *cog1-2D gpat5*, no muestran ninguna alteración en la capa de mucílago cuando son comparados los individuos mutantes dobles homocigotos y los individuos azigotos para las mutaciones recesivas. No obstante, el genotipo *athb25-1D sex1* sí que muestra una reducción significativa de la capa de mucílago, lo que pone en evidencia el papel fundamental de la enzima SEX1 en la hidrólisis de los gránulos de almidón para la formación de esta capa.

4.4 Suberina

La capa de suberina se visualizó empleando una tinción con Sudán rojo y las imágenes fueron tomadas en el microscopio óptico.

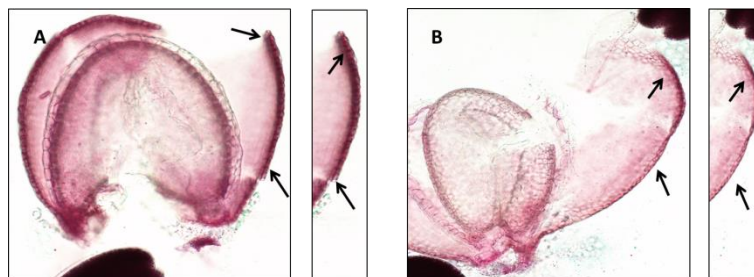


Fig. 20. Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán. La imagen A corresponde a la línea 1 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 24 de genotipo *athb25-1D gpat5*.

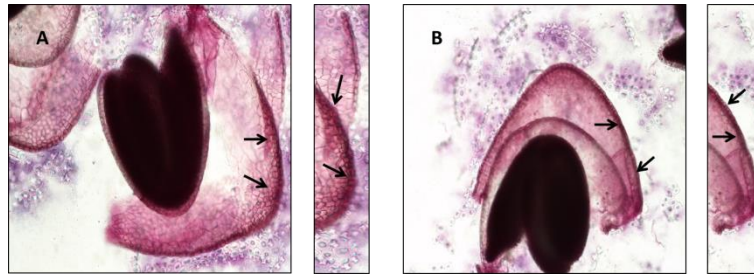


Fig. 21. Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán. La imagen A corresponde a la línea 7 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 14 de genotipo *athb25-1D prx25*.

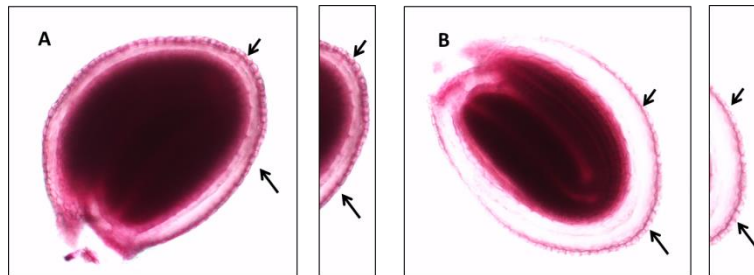


Fig. 22. Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán. La imagen A corresponde a la línea 17 (*athb25-1D*) y la imagen B corresponde a la línea 4 de genotipo *athb25-1D sex1*.

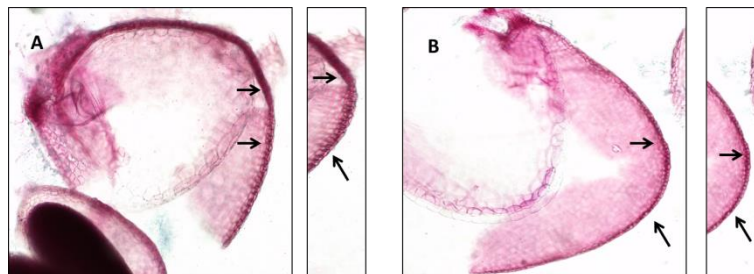


Fig. 23. Tinción de la capa de suberina con rojo Sudán. La imagen A corresponde a la línea 24 (*cog1-2D*) y la imagen B corresponde a la línea 22 de genotipo *cog1-2D gpat5*.

Las imágenes obtenidas para la tinción capa de suberina muestran que la falta de la enzima GPAT5 impide una mayor deposición de suberina en los mutantes que sobreexpresan tanto ATHB25 como COG1. En el caso de *PRX25* sólo se ve afectada la longevidad ya que la capa de suberina no parece existir diferencias entre los individuos mutantes dobles homocigotos y los individuos azigotos para las mutaciones recesivas, por lo que es de esperar que exista otra peroxidasa controlada por el factor de transcripción que supliría el papel de

PRX25 en la biosíntesis de suberina. En el caso de los genotipos *athb25-1D sex1* se observa que tanto la capa de mucílago, como la capa de suberina así como la longevidad se ven afectadas.

4.5 Permeabilidad

La permeabilidad de la semilla se midió utilizando sales de tetrazolio. Estas sales cuando entran en contacto con el embrión y penetran en las células se reducen metabólicamente para formar formazán (un compuesto insoluble de tonalidad rojiza) de manera que aquellas semillas que posean una tonalidad más roja son más permeables puesto que han permitido una mayor entrada de tetrazolio.

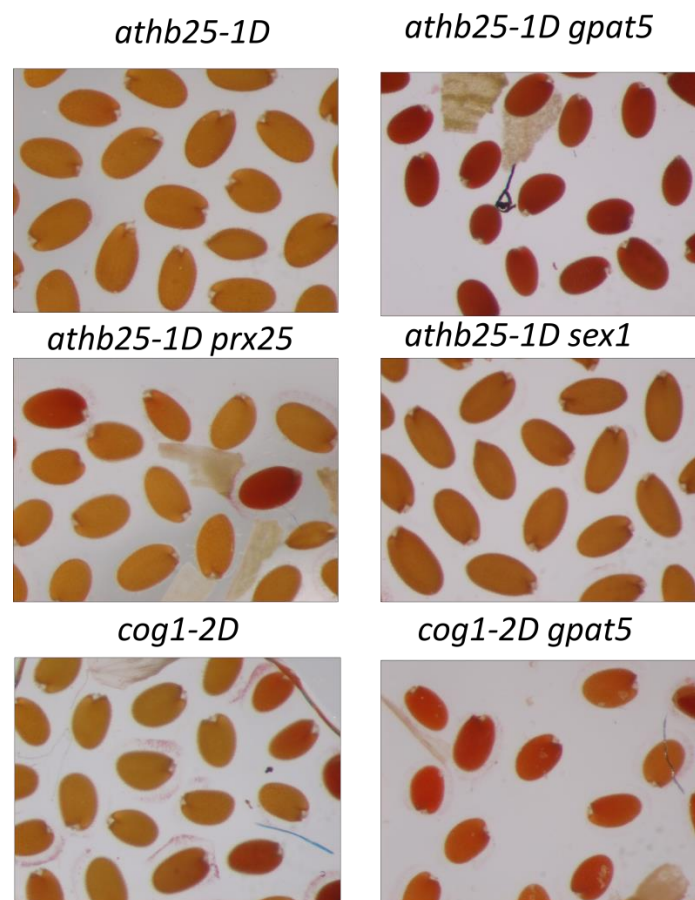


Fig. 24. respuesta de las semillas de los distintos genotipos a la sales de tetrazolio.

Como se muestra en la figura, la permeabilidad entre los individuos azigotos para la mutación recesiva y los mutantes dobles homocigotos no varía en el caso del genotipo *athb25-1D sex1*. En el caso de los otros genotipos sí que se observan variaciones en la permeabilidad cuando se comparan los individuos mutantes dobles homocigotos *gpat5* y *prx25* con las líneas sobreexpresoras *athb25-1D* y *cog1-2D*, puesto que poseen cambios importantes a nivel de la

cubierta de la semilla. En el caso de *sex1* es posible que el embrión no tenga el suficiente poder reductor como para reducir las sales de tetrazolio a formazán. Sin embargo, se debe seguir trabajando para esclarecer qué está sucediendo.

5. CONCLUSIONES

- Se aislaron individuos homocigotos mutantes para las enzimas SEX1, GPAT5 y PRX25 con sobreexpresión de ATHB25.
- Se aislaron individuos homocigotos mutantes para la enzima GPAT5 con sobreexpresión COG1.
- El tamaño de semilla no fue alterado al introducir las mutaciones en las enzimas GPAT5, PRX25 y SEX1 en las plantas con sobreexpresión de ATHB25, ni en las mutaciones introducidas en la enzima GPAT5 en las plantas con sobreexpresión de COG1.
- La resistencia al envejecimiento fue menor que el control en los individuos mutantes homocigotos para las enzimas GPAT5, PRX25 y SEX1 con sobreexpresión de ATHB25 así como en los individuos homocigotos mutantes para la enzima GPAT5 con sobreexpresión de COG1.
- El mucílago fue alterado los individuos homocigotos mutantes para la enzima SEX1 con sobreexpresión de ATHB25; sin embargo, no fue alterado en los individuos homocigotos mutantes para las enzimas GPAT5 y PRX25 con sobreexpresión de ATHB25 y tampoco fue alterado en los individuos homocigotos mutantes para la enzima GPAT5 con sobreexpresión de COG1. Esto muestra el papel fundamental de la enzima *SEX1* en la formación de este polisacárido.
- La mayor deposición de suberina en los mutantes con sobreexpresión de ATHB25 y COG1 fue revertida en los individuos homocigotos mutantes para las enzimas GPAT5. También se vio revertida en el caso de los individuos homocigotos mutantes para la enzima SEX1 en el fondo con sobreexpresión de ATHB25. No obstante, no se vio revertida en los individuos homocigotos mutantes para la enzima PRX25 en el fondo de sobreexpresión de ATHB25.
- Se observó una mayor permeabilidad en los individuos homocigotos mutantes para las enzimas GPAT5 y PRX25 en el fondo con sobreexpresión de ATHB25. La permeabilidad también fue mayor en los individuos homocigotos mutantes para la enzima GPAT5 en el fondo con sobreexpresión de COG1. Sin embargo, la permeabilidad no fue alterada en los individuos homocigotos mutantes para la enzima SEX1 en el fondo con sobreexpresión de ATHB25.

Conclusión general

Mediante el aislamiento y análisis de los mutantes homocigotos para las enzimas GPAT5, PRX25 y SEX1 en los mutantes de sobreexpresión *athb25-1D* y *cog1-2D*, este trabajo demuestra que la resistencia al envejecimiento obtenida por sobreexpresión de los factores de transcripción ATHB25 y COG1 viene mediada por una modificación de la cubierta de la semilla. Concretamente, por una mayor deposición de suberina en la capa de empalizada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14: 93-107.
- Beisson, F., Yonghua, L., 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*. *Plant Cell* 19: 351-368.
- Bernards, M.A. (2002) Demystifying suberin. *Can J Bot* 80: 227-240.
- Braybrook, S.A., Harada, J.J., (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci* 13: 624-630.
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., Serrano, R. (2013). *Arabidopsis thaliana* homeobox25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiol* 164: 999-1010.
- Bundrett, M.C., Kendrick, B., and Peterson, C.A. (1991). Efficient lipid staining in plant material with Sudan red 7B or Fluorol yellow 088 in polyethylene glycol-glycerol. *Biotech. Histochem.* 66: 111–116.
- Caspar, T., Huber, S.C., Someville, C.R. (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol* 79: 11-17.
- Caspar, T., Lin, T-P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., Someville, C.R. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol* 95: 1181-1188.
- Châtelain, E., Satour, P., Laugier, E., Ly Vu, B., Payet, N., Rey, P., Montrichard, F. (2013). Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3633-3638.
- Chen, H., Chu, P., Zhou, Y., Li, Y., Liu, J., Ding, Y., Tsang, E.W., Jiang, L., Wu, K., Huang, S. (2012). Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 63: 4107-4121.
- Clerkx, E.J., Blankestijn-De Vries, H., Ruys, G.J., Groot, S.P.C., Koorneef, M. (2004). Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol Plant* 121: 448-461.
- Croteau, R., Kolattukudy, P. (1974). Biosynthesis of hydroxyfatty acid polymers-Enzymatic synthesis of cutin from monomer acids by cell-free preparations from epidermis to *Vicia faba* leaves. *Biochemistry* 13: 3193-3202.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., Koorneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 403-414.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F. (2003). Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.* 21: 335–351.

Espelie, K.E., Davis, R.W., Kolattukudy, P.E. (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of the grapefruit (*Citrus paradise* Macfed.) *Planta* 149: 498-511.

Gasser, C.S., Robinson-Beers, K. (1993). Pistil development. *Plant Cell* 5: 1231-1239.

Goto, N. (1985). A mucilage polysaccharide secreted from testa of *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv* 22: 143-145.

Graça, J., Pereira, H. (2000a). Methanolysis of bark suberin, Analysis of glycerol and acid monomers. *Phytochem Anal* 11: 45-51.

Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M., Bellini, C. (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci* 12: 294-300.

Haughn, G., Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 10: 472-477.

Haughn, G., Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trend Plant Sci* 10: 472-477.

Holdsworth, M., Kurup, S., McKibbin, R. (1999). Molecular and genetic mechanisms regulating the transition from embryo development to germination. *Trends Plant Sci* 4: 275-280.

http://www.fao.org/docrep/x5563E/X5563e0a.htm#e_plant_genetic_resources_follow_up_of_conference_resolution_681 (FAO 1983) 22-Mayo-2015.

Iriondo, J.M., (2001): Conservación de recursos fitogenéticos In: Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos, pp 15-31. Eds.: González-Andrés F and Pita JM. Publicaciones I.N.E.A.

Kisu, Ono, Y., Shimofurutani, T.N., Suzuki, M., Esaka, M. (1998). Characterization and Expression of a New Class of Zinc Finger Protein That Binds to Silencer Region of Ascorbate Oxidase Gene. *Plant Cell Physiol* 39: 1054-1064.

Kolattukudy, P.E. (2001). Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71: 1-49

Kotak, S., Vierling, E., Bäumlein, H., von Koskull-Döring, P. (2007). A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of *Arabidopsis*. *Plant cell* 19: 182-195.

Kunst, L., Samuels, A.L., Jetter, R. (2005). The plant cuticle: Formation and structure of epidermal surfaces. In *Plant Lipids-Biology, Utilisation and Manipulation*, D. murphy, ed (Oxford, UK: Blackwell) 270-302.

Martín, I. (2001). Conservación de recursos fitogenéticos. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Hojas divulgadoras, 2114. 28 p. ISBN: 84-491-0505-6.

McKinney, E.C., Nazeem, A., Traut, A., Kenneth, A., Feldmann, D.A. Belostotsky, McDowell, J.M., Meagher, R.B. (1995). Sequence-Based Identification of T-DNA Insertion Mutations in *Arabidopsis* Actin Mutants Act2-1 and Act4-1, *Plant J* 8: 613-622.

- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., Ryser, U. (1999). Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for and old hypothesis. *Plant Physiol* 119: 1137-1146.
- Nawrath, C. (2002). The biopolymers cutin and suberin. In *The Arabidopsis Book*, Someville, C.R., Meyerowitz, E.M. (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), doi/10.1199/tab.0021, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
- Noguero, M., Atif, R.M., Ochatt, S., Thompson, R.D. (2013). The Role of the DNA-Binding One Zinc Finger (Dof) Transcription Factor Family in Plants." *Plant Sci* 209: 32-45.
- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.P., Job, D., Jullien, M., Grappin, P. (2008). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3022-3037.
- Pita Villamil, J. M., Martínez-Laborde, J.B, (2001). Bancos de Semillas. In González-Andrés, F. & Pita Villamil, J. M. (Eds.). *Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos*. Publicaciones I.N.E.A. Valladolid, España.
- Prieto-Dapena, P., Castaño, R., Almoguera, C., Jordano, J. (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol* 142: 1102-1112.
- Rajjou, L., Debeaujon, I. (2008). Seed Longevity: Survival and Maintenance of High Germination Ability of Dry Seeds." *C R Biol* 331: 796-805.
- Robinson-Beers, K., Pruitt, R.E., Gasser, C.S. (1992). Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell* 4: 1237-1249).
- Ryser, U., Holloway, P.J. (1985). Ultrastructure and chemistry of soluble and polymeric lipids in cell walls from seed coats and fibres of *Gossypium* species. *Planta* 163: 151-163.
- Sattelmacher, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol* 149: 167–192.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M., DellaPenna, D. (2004). Vitamine E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16: 1419-1432.
- Schneitz, K., Hülkamp, M., Pruitt, R.E. (1995). Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7: 731-749.
- Schreiber, L., Breiner, H-W., Riederer, M., Duggelin, M. (1994). The Casparian strip of *Clivia miniata* Reg. roots: Isolation, fine structure and chemical structure. *Bot. Acta* 107: 353–361.
- Shigeto, J., Kiyonaga, Y., Fujita, K., Kondo, R., Tsutsumi, Y. (2013). Putative cationic cell-wall-bound peroxidase homologues in *Arabidopsis*, AtPrx2, AtPrx25 and AtPrx71 are involved in lignification. *J Agric Food Chem* 61: 3781-3788.
- Stark, R.E., and Tian, S. (2006). The cutin biopolymer matrix. In *Biology of the Plant Cuticle*, Vol. 23, M. Riederer, ed (Oxford, UK: Blackwell Publishing), pp. 126–144.
- Suzuki, M., McCarty, D.R. (2008). Functional symmetry of the B3 network controlling seed development. *Curr Opin Plant Biol* 11: 548-553.

Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., Carranco, R., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Jordano, J. (2010). Loss of Function of the Hsfa9 Seed Longevity Program. *Plant Cell Environ* 33: 1408-1417.

Tesnier, K., Strookman-Donkers, H.M., van Pijlen, J.G., van der Geest, A.H., Bino, R.J., Groot, S.P. (2002). A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Sci Technol* 30: 149-165.

van de Wouw, M., Kik, C., van Hintum, T., van Treuren, R., Visser, B. (2009) Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 8(1); 1–15 doi:10.1017/S1479262109990062.

Wilson E.O., Frances M.P. (1988). *Biodiversity*, Capítulo 1. Washington (DC): National Academies Press (US) (1988).

Windsor, J.B., Symonds, V.V., Mendenhall, J., Lloyd, A.M. (2000). *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J* 22: 483-493.

Yanagisawa, S. (2001). The Transcriptional Activation Domain of the Plant-Specific Dof1 Factor Functions in Plant, Animal, and Yeast Cells. *Plant Cell Physiol* 42: 813-822.

Yanagisawa, S. (2002) The Dof Family of Plant Transcription Factors. *Trends Plant Sci* 7: 555-560.

Yanagisawa, S., Schmidt, R.J. (1999). Diversity and Similarity among Recognition Sequences of Dof Transcription Factors. *Plant J* 17: 209-214.

Yu, T-S., Kofler, H., Häusler, R.E., Hille, D., Flügge, U-I., Zeedman, S.C., Smith, A.M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W-L., Chen, J., Weber, A. (2001). The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13: 1907-191