

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS**  
**IBMCP-"Eduardo Primo Yúfera"**



**Clonaje del promotor *TT19* y estudio de la longevidad de semillas en diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Titulación:**

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

**Presentado por:**

Alex Vladimir Villca Aramayo

**Dirigido por:**

Dr. Ramón Serrano Salom

Dr. Eduardo Bueso Ródenas

Dr. Jesús Muñoz Bertomeu

Valencia, Enero de 2016

## RESUMEN

La conservación de los recursos fitogenéticos es el método más efectivo y eficiente para la protección de los hábitats. En diversas especies se emplean semillas para la conservación de la especie. Por lo tanto, la longevidad de las semillas tiene importancia no sólo para su conservación sino también para la agricultura, la biodiversidad y la economía. También las semillas son consideradas como el sistema más eficiente para la propagación de las plantas.

La importancia de estudiar los factores moleculares que intervienen en la longevidad de las semillas es clave para la obtención de cultivares y/o variedades mejoradas y también para la conservación de la biodiversidad durante largos periodos de tiempo.

En la primera parte del trabajo del proyecto se ha clonado el promotor del gen *pTT19* junto a los genes reporteros *GUS-GFP*. *TT19* es un gen que codifica una glutatión S-transferasa y es un transportador de proantocianidinas y antocianinas del citosol al interior de la vacuola. En el análisis *GUS-GFP*, este gen se expresa específicamente en el endotelio y la chalaza, que corresponden a la capa más interna de la cubierta de la semilla y durante las etapas: pre-globular, globular, corazón y cotiledón linear.

Posteriormente, se realizó con 16 ecotipos ensayos relacionados a la longevidad de semillas. Las semillas de todos los ecotipos, se sometieron a un tratamiento de envejecimiento acelerado (se remojaron semillas en agua, a 40°C por 24 horas), al analizar los resultados, se determinó que existe una variabilidad natural en la longevidad de los distintos ecotipos. El ecotipo más longevo, el Shakdara que tiene una ausencia total de mucílago obtuvo el 60% de germinación, el ecotipo Enk-T, el ecotipo menos longevo obtuvo el 2% de germinación después del tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas. En el ensayo de suberina, se determinó la correlación entre la longevidad y el contenido de suberina, corroborando los resultados obtenidos por otros investigadores.

### **Palabras clave:**

Recursos filogenéticos, hábitat, biodiversidad, ecotipos, longevidad. mucílago, suberina.

***DEDICATORIA***

**AL DIOS DE LA BIBLIA, A QUIEN DESDE QUE LE CONOCI  
CAMBIO MI VIDA PARA SIEMPRE,  
A MIS PAPAS, MIS HERMANOS, SOBRINITOS  
Y MI FAMILIA EN CRISTO.**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Aunque este primer párrafo se repita en la mayoría de los trabajos, es porque es una manifestación sincera... muchas personas han colaborado en este trabajo, directa e indirectamente.

En primer lugar agradecer al DIOS de la BIBLIA, por haber concedido un deseo de mi corazón (Salmos 37:4) al haberme permitido estar aquí en Valencia (Isaías 45:1-9). Sin su mano poderosa obrando a lo largo de este largo viaje, nada de esto habría sido posible.

A mi Padre Narciso Villca A. por su amor, apoyo incondicional y oraciones durante este tiempo. A mi Madre Sofía Aramayo, por su gran amor y paciencia durante el tiempo que nos acompañó. A mis hermanos Geidy, Elmer, Fanny y Coris por su amor y apoyo incondicional. A mis tres sobrinitos Ayelen, Royer y Gael.

A mi querida amiga Mari Jaita, a la Hna Marina y Jeny, Vedula, Fernando, Sergio, Jhonny J., José F., María Luisa, a todos mis hermanos de la Iglesia, que a pesar de la distancia han estado apoyandome con sus oraciones, muchas gracias.

Al Dr. Ramón Serrano y su esposa Mariche por su ayuda, paciencia durante todo este tiempo y permitirme formar parte de su familia. Al Dr. Eduardo, Gaetano y Jesús por su dosis extra de abundante paciencia, por su amistad y enseñanzas que perduraran en el tiempo. A Marcos Caballero, a Irene, Joan y Lola por sus ánimos y su amistad.

A mis compañeros del Máster Antonio, David, Betlem, Mireya por su amistad, ánimos, por su colaboración durante el curso.

A todos los profesores del Máster y administrativos.

**DIOS LES BENDIGA MUCHO!!!**

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Erosión genética	1
1.2.	Conservación de los recursos genéticos	2
1.3.	Conservación de semillas	2
1.4.	Longevidad.	3
1.5.	Factores que afectan a la longevidad de las semillas.	3
1.6.	La Semilla de Arabidopsis	6
1.6.1.	Función, estructura y composición	6
1.6.2.	Mucílago	7
1.6.3.	Suberina	8
2.	ANTECEDENTES	11
3.	OBJETIVOS	12
3.1.	Objetivos Generales:	12
3.2.	Objetivos Específicos	12
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.	13
4.1.	Clonaje del promotor del gen <i>TT19</i> .	13
4.1.1.	Extracción de DNA genómico de Arabidopsis.	13
4.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.	13
4.2.2.	Consideraciones preliminares:	14
4.2.3.	Purificación del inserto <i>pTT19</i> y el plásmido pMDC32.	14
4.2.4.	Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.	15
4.2.5.	Lavado de la membrana de sílice.	15
4.2.6.	Membrana de sílice seco	15
4.2.7.	Eluido de ADN	15
4.2.8.	Digestión del promotor <i>proTT19</i>	16
4.2.9.	Digestión del plásmido pMDC32	16
4.2.10.	Purificación del promotor <i>pTT19</i> y del plásmido pMDC32 digeridos con <i>HindIII</i> y <i>KpnI</i> .	16
4.2.11.	Ligación del promotor <i>pTT19</i> y el plásmido pMDC32.	17
4.2.12.	Transformación de <i>E.coli</i> .	17
4.2.13.	Extracción de plásmido de <i>E. coli</i> .	18
4.2.14.	Aislamiento del enhancer <i>enh2X35S</i> del plásmido pMDC32.	19
4.2.15.	Ligación del plásmido pMDC32- <i>pTT19</i> con el activador transcripcional <i>enh2x35S</i> .	20

4.2.16. PCR del gen <i>GUS-GFP</i> del plásmido pCambia 1303.	20
4.1.18. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	21
4.1.19. Transformación de plantas.	21
4.1.20. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.	22
4.2. Segunda Parte: Ensayos de longevidad de semillas en ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
4.2.1. Determinación del nivel de expresión de los genes <i>ATHB25</i> y <i>COG1</i> .	22
Ajuste las condiciones de unión de ARN	23
Enlazar ARN	23
Lavar la membrana de sílice y secar.	23
Análisis de la expresión génica.	24
qRT-PCR	24
4.2.2. Ecotipos para realizar ensayos relacionados a la longevidad de semillas.	25
4.2.3. Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	25
4.2.4. Envejecimiento acelerado de las semillas.	25
4.2.5. Tinción del mucílago con rojo de rutenio.	26
4.2.6. Tinción de la suberina con rojo de Sudán.	26
4.2.7. Tinción con sales de tetrazolio.	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
5.1. Análisis de expresión mediante la reacción histoquímica GUS-GFP.	28
5.2. Estudio de la cubierta de la semilla en ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
5.2.1. Tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas de distintos ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	35
5.3. Ensayo con rojo de rutenio para determinar el contenido de mucílago en la cubierta de la semilla en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	37
5.4. Ensayo con rojo de sudan de la suberina en la cubierta de la semilla.	38
5.5. Ensayo de permeabilidad de semillas.	40
5.6. Nivel de expresión de los genes <i>ATHB25</i> y <i>COG1</i> .	41
6. CONCLUSIONES:	43
7. BIBLIOGRAFÍA.	44

## FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la cubierta de la semilla de Arabidopsis. ....	6
Figura 2. Organización esquemática de una semilla madura de Arabidopsis.....	7
Figura 3. Modelo de la epidermis en la cubierta de la semilla (SCE). ....	7
Figura 4. Estructura hipotética de la suberina. Bernards (2002). ....	9
Figura 5. Sitio de biosíntesis de proantocianidinas en la cubierta de Arabidopsis.....	10
Figura 6. Esquema del promotor pMDC32, empleado en la generación de las líneas transgénicas. Qi <i>et al.</i> , (2009). ....	16
Figura 7. Esquema del plásmido Pcambia 1303. ....	20
Figura 8. Amplificación y digestión del promotor pTT19 mediante enzimas de alta fidelidad. ....	28
Figura 9. Digestión del plásmido pMDC32 que tiene el promotor pTT19. ....	29
Figura 10. A. Aislamiento por digestión y electroforesis del activador transcripcional enh2x35S (672 pb). B. Aislamiento del plásmido lineal de la construcción pMDC32-pTT19 con la enzima Stul. ....	29
Figura 11. Ensayo de restricción del vector pMDC32-pTT19-2xenh35S (12 181 pb). ....	30
Figura 12. Análisis in silico del gen TT19. ....	32
Figura 13. Análisis de la actividad del gen GUS con la construcción enh2x35S-pTT19::GUS durante el desarrollo de semillas de Arabidopsis. ....	33
Figura 14. Análisis de la actividad del gen GFP con el activador transcripcional y el promotor enh2x35S-pTT19 en el desarrollo de semillas Wild-Type de Arabidopsis. ....	33
Figura 15. Análisis de la actividad del gen GUS junto con el promotor <i>pTT19</i> en el desarrollo de semillas Wild-Type de Arabidopsis. ....	34
Figura 16. Análisis de la actividad GFP junto con el promotor pTT19 en el desarrollo de semillas Wild-Type de Arabidopsis. ....	34
Figura 17. Tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas de 16 ecotipos. ....	35
Figura 19. Germinación de ecotipos, después del tratamiento de envejecimiento acelerado. ....	36
Figura 20. Germinación al día 9 y después de tratamiento de envejecimiento acelerado (24 Hrs). ....	36
Figura 18. Germinación en ecotipos de Arabidopsis. ....	36
Figura 21. Clasificación de ecotipos, según el contenido de mucílago en la cubierta de la semilla en Arabidopsis. ....	38
Figura 22. Visualización de la capa de suberina de la cubierta de la semilla de Arabidopsis. ....	39
Figura 23. Absorción a 490MM de sales de tetrazolio reducidos a formazán. ....	41

Figura 24. Nivel de expresión relativa del gen <i>ATHB25</i> en ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	41
Figura 25. Nivel de expresión relativa del gen <i>COG1</i> en ecotipos de <i>Arabidopsis Thaliana</i> . .....	42

## TABLAS

Tabla 1. PCR del promotor del gen TT19 .....	14
Tabla 2. Digestión del promotor TT19.....	16
Tabla 3. Digestión del plásmido pMDC32.....	16
Tabla 4. Ligación del promotor <i>pTT19</i> y el plásmido <i>pMDC32</i> .....	17
Tabla 5. Aislamiento del enhancer 2X35S del plásmido pMDC32.....	19
Tabla 6. Rellenado del activador transcripcional 2x35S.....	19
Tabla 7. Digestión del plásmido pMDC32-pTT19.....	19
Tabla 8. Ligación de la construcción pMDC32- <i>pTT19</i> con el activador transcripcional <i>enh2x35S</i> .....	20
Tabla 9. PCR del gen GUS-GFP del plásmido pCambia 1303.....	21
Tabla 10. Recombinación para obtener la construcción el plásmido.....	21
Tabla 13. Porcentaje de germinación de 16 ecotipos 9 días después de la siembra.....	36

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Erosión genética.

La gran revolución verde iniciada en la década de los años 40 del siglo XX, fue posible gracias al desarrollo de un paquete tecnológico constituido por semillas mejoradas, el desarrollo de nuevas técnicas de cultivo, el riego tecnificado y el uso de agroquímicos que han permitido reducir el daño de las enfermedades. Este paquete tecnológico ha permitido mejorar los rendimientos y la calidad de la producción.

Las señales de alarma de erosión genética comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas (Alegría *et al.*, 2001)

Las variedades mejoradas que fueron obtenidas durante y después de la revolución verde tenían rendimientos de hasta 10 veces más altos que los cultivares tradicionales. Estas nuevas variedades eran mucho más resistentes a enfermedades, de ciclo corto y fueron desarrolladas para satisfacer las necesidades de consumidores y productores. La superioridad de las variedades mejoradas ocasionó el rápido desplazamiento de las variedades locales y su desaparición sería inevitable de no ser conservadas. Esto conduciría a la pérdida de biodiversidad, también denominada como erosión genética.

Diversidad biológica es el término atribuido a la variabilidad de los genes entre individuos de una misma población o de diferentes poblaciones de una misma especie (Pedroni *et al.*, 2002).

En Irlanda en los años 1845-1849 se dio un suceso con consecuencias catastróficas, donde se perdieron los cultivos de patata a causa del ataque del hongo *Phytophthora infestans* y donde por la falta de alimentos murieron aproximadamente un millón de personas. La tragedia no quedó en solo esos años, sino que los efectos de la hambruna dejaron marca en la sociedad Irlandesa, provocando el fenómeno de las emigraciones masivas y millón y medio de personas emigraron principalmente a los Estados Unidos, Gran Bretaña y Australia (Bernal y Chegue 2010).

Durante el siglo XIX, en los años cincuenta, se reconoció que la pérdida de la biodiversidad era ya un problema serio, que afectaba a la agricultura y a los ecosistemas. Esto llevo a la implementación de medidas para la conservación de la biodiversidad. Concretamente, la FAO, en 1961, convocó a una reunión denominada "*Plant Exploration and Introduction*" con la finalidad de determinar la situación, conservación, empleo, exploración, etc., de todos los recursos fitogenéticos disponibles. A partir de dicha reunión las asociaciones y

organizaciones se han encargado de preservar, conservar y proteger la biodiversidad genética (FAO 2011).

### **1.2. Conservación de los recursos genéticos**

La conservación de los recursos genéticos se puede definir como la gestión de la utilización humana de la biosfera para que pueda aportar el máximo beneficio sostenible a las generaciones presentes, al tiempo de mantener su potencial para satisfacer las necesidades y aspiraciones de las generaciones futuras (Alegría *et al.*, 2001). Por lo que su interés no sólo se trata del puro interés científico que puede aportar.

La percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta (Maxted *et al.*, 1997). La preocupación por la pérdida de la biodiversidad vegetal y la necesidad de tomar medidas para frenarla quedó especialmente patente en la firma del Convenio sobre Diversidad Biológica con ocasión de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo celebrada en Río de Janeiro UNCED (1992). La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de medidas para la conservación de los recursos fitogenéticos.

### **1.3. Conservación de semillas**

La conservación de los recursos fitogenéticos universalmente es el método más efectivo y eficiente para la conservación y protección de los hábitats (Conway 1988). La conservación *ex situ* implica la recolección de muestras representativas de la variabilidad genética y su mantenimiento, también consta de elementos esenciales: el almacenamiento o preservación del germoplasma y el desarrollo de métodos que posibiliten su propagación (Humer 1999).

Los programas de conservación *ex situ*, permiten realizar estudios que permitan el conocimiento de las características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del material almacenado, también proporcionan material genético propágulos y semillas para su utilización en programas educativos, programas de mejora genética de especies cultivadas y en planes de reforzamiento, reintroducción o introducción (McNeely *et al.*, 1990).

Durante la conservación de semillas, la capacidad de germinación cambia durante la vida útil, aún en condiciones de almacenamiento en seco. En una primera fase después de la cosecha, las semillas quedan en dormancia, luego tienen que pasar por un periodo en el cual pierden gradualmente su dormancia; finalmente después de este tiempo de maduración post-cosecha las semillas adquieren capacidad de germinación por completo. A partir de entonces, las semillas secas se deterioran lentamente y pierden vigor durante el almacenamiento, lo que resulta en última instancia en la incapacidad para la germinación. Esto tiene relevancia

ecológica y agronómica para entender los mecanismos que rigen la pérdida de vigor de la semilla durante el envejecimiento (Nguyen *et al.*, 2015).

El mantenimiento de la viabilidad de las semillas es una función esencial de los bancos de germoplasma. Para ello se desarrollan protocolos y normativas de almacenamiento, en función de las especies a conservar. Hay distintos tipos de conservación adecuados según el equipamiento y recursos disponibles de los bancos y según los distintos tipos de semillas.

La baja temperatura y bajo contenido de humedad de semillas prolonga la vida útil de semillas durante el almacenamiento (Walter 1998).

#### **1.4. Longevidad.**

La longevidad de semillas se define como su capacidad de mantener la viabilidad después del almacenamiento en seco. La longevidad tiene repercusiones en el aspecto ecológico, agronómico y económico (Nguyen *et al.*, 2012).

#### **1.5. Factores que afectan a la longevidad de las semillas.**

Se ha evidenciado que las semillas pierden gradualmente su viabilidad durante el almacenamiento y la tasa de envejecimiento es fuertemente influenciada por factores ambientales y genéticos (Rajjou & Debeaujon *et al.*, 2008). La importancia de estudiar los factores moleculares que intervienen tanto en el desarrollo como en la longevidad de las semillas es clave para la obtención de cultivares y/o variedades mejoradas y también para la conservación de la biodiversidad durante largos periodos de tiempo.

La acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y radicales libres son considerados como uno de los factores más importantes que influyen en el envejecimiento de semillas (Bailly 2004). Las ROS son altamente reactivas y son capaces de modificar e inactivar proteínas, lípidos, DNA, RNA e inducir disfunciones celulares, alterando el poder germinativo de la semilla. La acumulación de proteínas oxidadas en la semilla seca se asocia con el envejecimiento y podría inducir la pérdida de la función de las proteínas y enzimas.

Durante el almacenamiento de semillas el ADN es sometido a daños e inestabilidad del genoma, que son considerados la causa principal de la reducción de la germinación después del envejecimiento (Nguyen *et al.*, 2015). Por lo tanto, la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que resultan en estrés oxidativo y mantenimiento de la homeostasis redox son cruciales para el vigor de la semilla (Rajjou & Debeaujon 2008) y la longevidad.

Los mutantes defectuosos en la cubierta de las semillas (testa) produjeron semillas menos latentes y mostraron una disminución de la capacidad para la germinación después del almacenamiento a largo plazo. Entre ellos destacan los mutantes con defectos en la

biosíntesis de proantocianidinas (PAs, taninos condensados que dan color marrón a las semillas) como *transparent testa (tt4, tt12)*, *transparent testa glabra (ttg1)*, *banyuls (ban)* y *aberrant testa shape (ats)* que tienen reducida longevidad de las semillas (Debeaujon *et al.*, 2000; Winkel-Shirley 2001). Estos datos apoyan la hipótesis del papel de PAs y las paredes celulares secundarias gruesas en longevidad (Clerkx *et al.*, 2004; Haughn & Chaudhury 2005).

La mayoría de los mutantes de cubierta tienen semillas significativamente más permeables que los de tipo salvaje y también produjeron semillas menos latentes y mostraron una disminución en su capacidad para la germinación después del almacenamiento a largo plazo.

La síntesis de ARN podría ser necesaria para la germinación de semillas envejecidas. La baja abundancia de *ARN POLYMERASE II (AT2G15430)*, 1.6 veces menos abundante después del envejecimiento de semillas puede haber contribuido a la reducción de la germinación después del almacenamiento (Nguyen *et al.*, 2015). También el mantenimiento de un complejo de reparación del ADN es esencial para la supervivencia a largo plazo de las semillas y el producto del gen *SENSITIVE23D RADIACIÓN (RAD23D)* colabora en la reparación del daño del ADN (Sturm *et al.*, 1998).

Mutaciones en genes de la maduración de la semilla y de latencia, tales como *leafy cotyledon1 (lec1)* que es un regulador esencial de la embriogénesis tardía y de la identidad del cotiledón en *Arabidopsis* y *abscisic acid insensitive3 (abi3)*, conducen a la reducción dramática de la viabilidad de la semilla (Sugliani *et al.*, 2009).

Se ha identificado *GAAS* o *DOG1 (GERMINATION ABILITY AFTER STORAGE)* que regula los procesos de latencia de la semilla en *Arabidopsis* colabora en la señalización del ácido abscísico. El mutante *dog1* muestra fenotipo de longevidad reducida (Nguyen *et al.*, 2012).

*DNA LIGASE 4* y *6* son necesarias para mantener la integridad del genoma, según lo revelado por la alta sensibilidad de los mutantes *lig6* y *lig6-lig4* doble mutante (Waterworth *et al.*, 2010), revisado por (Nguyen *et al.*, 2015).

Las modificaciones post-traduccionales (PTM) de proteínas en semillas secas juega un papel central en la liberación de la latencia, la reanudación, el metabolismo y los procesos de envejecimiento (Arc *et al.*, 2011).

Los mutantes defectuosos de desarrollo epidérmico en la cubierta de la semilla se han identificado principalmente a través de una disminución en la cantidad o composición química del mucílago extruido cuando la semilla se expone al agua, por ejemplo estos mutantes: *mucilage modified (mum)*, *ttg*, proteína myb 61 (*myb61*), *apetala2 (ap2)*, *glabra2 (gl2)*,

*enhancer of glabra3 (egl3)* y *tt8* (Haughn & Chaudhury 2005). Mutantes con reducida cantidad de mucílago tienen una menor capacidad para germinar en condiciones de disponibilidad limitada de agua (Nesi *et al.*, 2002).

Muchas proteínas de semillas funcionan como buffer de oxidación en la longevidad de semillas. Son proteínas relacionadas con la traducción y el metabolismo energético (vías glucolíticas y ciclo del ácido tricarboxílico), y la síntesis de la vitamina E (*vte1*). (Nguyen *et al.*, 2015).

La mayoría de los mutantes de la capa de semillas probados, incluyendo aquellos específicamente defectuosos en la biosíntesis de PAs (por ejemplo, *prohibition*) y las células de paredes secundarias de las capas exteriores (por ejemplo, *AP2*), pero no los específicamente defectuosos en la biosíntesis de mucílago (por ejemplo *GL2*), tenían cubiertas que fueron significativamente más permeables que los de tipo salvaje. Además, la mayoría de los mutantes produjeron semillas que eran menos latentes y mostraron una disminución de la capacidad para la germinación después del almacenamiento a largo plazo. Varios mutantes (*tt4*, and *ttg1* y *tt12*) germinan más fácilmente en respuesta a los tratamientos de ácido giberélico (Clerkx *et al.*, 2004).

Estos datos apoyan la hipótesis acerca del papel de PAs como antioxidantes y de la epidermis como barrera para restringir el intercambio de gases y fluidos entre el medio ambiente y la semilla, prolongando la vida del embrión en estado latente, así como su protección y la prevención de la germinación hasta que las condiciones sean favorables. (Haughn & Chaudhury 2005).

La sobreexpresión de la *PROTEÍNA-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE1 (PIMT1)* mejora la longevidad de la semilla y el vigor de germinación en *Arabidopsis*. Las (*PIMT1*) combate el mal plegamiento de proteínas derivados de la formación de grupos L-isoaspartyl (Oge *et al.*, 2008).

Hasta ahora los mutantes aislados que afectan a la longevidad en realidad afectan al desarrollo de la semilla y no a la longevidad en si (Nguyen *et al.*, 2012).

El mutante de *Arabidopsis is1-1D*, tiene una sobreexpresión del factor de transcripción *ATHB25 (HOMEBOX25/ZINC FINGER PROTEIN DOMAIN)* y exhibió una mayor longevidad de la semilla debido a que incrementa la expresión de la giberelina 3 oxidasa 4, que aumenta el contenido de GA1 y GA4 en las semillas, lo que produce el refuerzo de la cubierta de la semilla (Bueso *et al.*, 2014).

Varios resultados sugieren que la permeabilidad y el espesor de la testa se ven afectados por mutantes que modifican los compuestos químicos y elementos estructurales, y que tienen efectos sobre la germinación. También aberraciones estructurales en una capa o capas epidérmicas también afectan los niveles de latencia y la permeabilidad (Debeaujon *et al.*, 2000).

## 1.6. La Semilla de Arabidopsis.

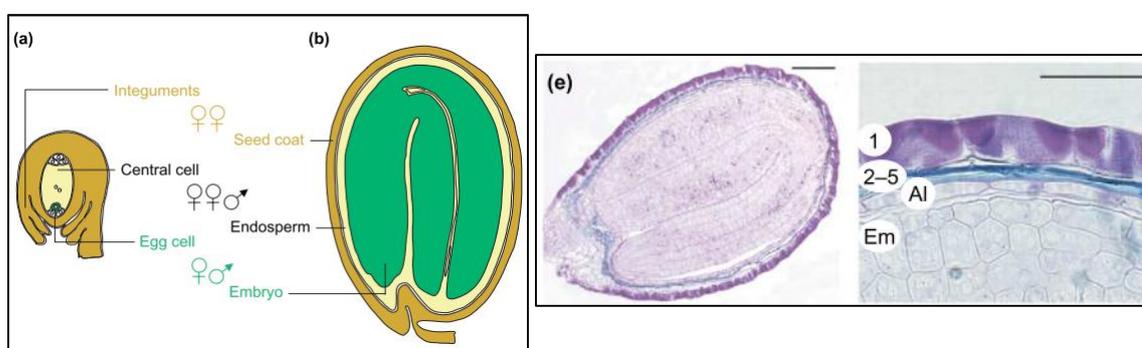
### 1.6.1. Función, estructura y composición.

Los efectos protectores de la cubierta de la semillas son muy importantes para la longevidad de las semillas (Rajjou & Debeaujon 2008), también la cubierta de la semilla es importante para la protección del embrión, la dispersión (Dean *et al.*, 2011) y contribuye a la latencia de las semillas (Haughn & Chaudhury 2005).

La cubierta ejerce su acción restrictiva de germinación la mayoría del tiempo por ser impermeable al agua y/o oxígeno o por su resistencia mecánica a la protrusión de la radícula. Incluso en la muerte, los tipos de células especializadas imparten protección, mejorar la latencia, la germinación, y la dispersión de semillas (Haughn & Chaudhury *et al.*, 2005).

La composición de la cubierta en semillas es también de interés para el sector agrícola, ya que impacta el valor nutricional para el ser humano y el ganado por igual (Dean *et al.*, 2011). En las angiospermas, la fertilización resulta en la formación de la semilla desde el óvulo (Figura 1). Esta notable transformación implica la activación y la coordinación de las vías de desarrollo de distintas partes y que conducen a la formación de embriones, endospermo y cubierta de la semilla (Haughn & Chaudhury 2005).

La cubierta deriva del tejido ovular es de origen materno y está compuesto por distintas capas celulares, rodea el embrión y los tejidos nutritivos (Figura 2) (Rajjou & Debeaujon 2008). La cubierta juega un papel importante en la nutrición del embrión durante el desarrollo de las semillas y en la protección contra agentes perjudiciales del entorno (Weber *et al.*, 1996).



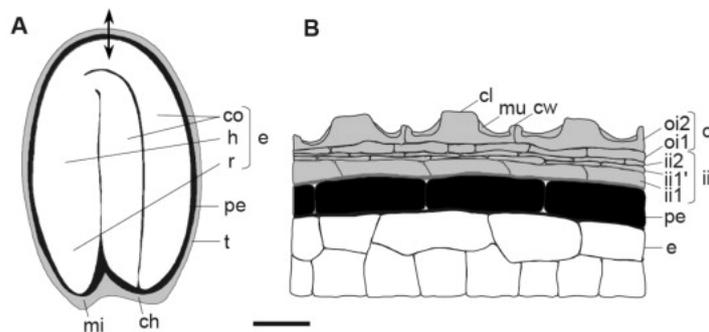
**Figura 1. Desarrollo de la cubierta de la semilla de Arabidopsis.**

La semilla se obtiene a partir del óvulo (a). Los núcleos de huevo y el espermatozoides se fusionan para formar el cigoto diploide que se desarrolla en el embrión (b). Una segunda célula de espermatozoides se fusiona con la célula central diploide, iniciando el desarrollo del endospermo triploide (b). Estos

acontecimientos de fertilización inducen las células diploides maternas a integumento diferenciarse en una cubierta de la semilla (b). Madurez de las semillas (15 días) (e), las células de todas las capas están muertas y juntos han sido aplastados, a excepción de la epidermis, la forma en que se mantiene por la pared celular secundaria de espesor de la columnela. El tegumento externo comprende: la epidermis (1) y empalizada (2). Al tegumento interno corresponden las capas 3, 4 y la aleurona que es la capa más interna del endotelio capa 5 sintetiza compuestos flavonoides: proantocianidinas (PAs). (Haughn & Chaudhury 2005).

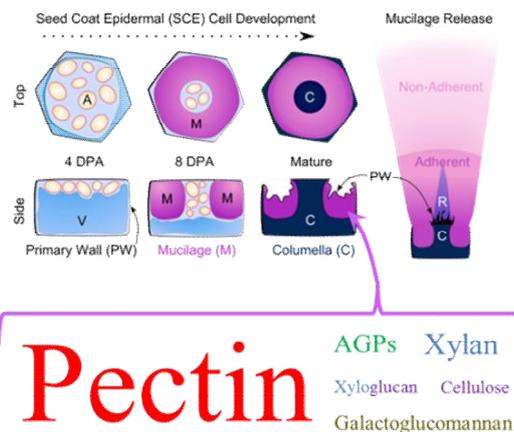
**1.6.2. Mucílago.**

La capa epidérmica (Figura 2 y Figura 3) se diferencia en células con paredes radiales engrosadas y elevaciones centrales conocidas como productoras de columnela y mucílago (Rajjou & Debeaujon, 2008). El mucílago es un polisacárido hidrofílico y soluble formado por unidades de ramnosa y ácido galacturónico (Goto 1985), que brota de las células epidérmicas durante la imbibición para rodear la semilla.



**Figura 2. Organización esquemática de una semilla madura de Arabidopsis.**

Sección longitudinal (A) de la semilla. En Arabidopsis, el embrión está encerrado en el endospermo en capas uno celdas (endosperma periférico o la capa de aleurona) estrechamente asociado con la testa. (B) Ampliación de una sección transversal cubierta de la semilla (en el nivel de la doble flecha en A). Cinco capas de células forman los dos tegumentos. Las capas II1 y OI 1 acumulan flavonoides (proantocianidinas y flavonoles, respectivamente) y la capa OI2 contiene mucílago. ch, Chalaza; cl, columnela; co, cotiledón; cw, pared celular; e, embrión; h, hypocotilo; ii, tegumento interno; mi, micropilo; mu, mucílago; oi, tegumento exterior; pe, endospermo periférico (capa de aleurona); r, la radícula; t, testa. Barra = 100 micras de (A) y 10 micras en (B). Adaptado de (Rajjou & Debeaujon 2008).



**Figura 3. Modelo de la epidermis en la cubierta de la semilla (SCE).**

Deposición de la pared celular y la estructura del mucílago extruido. Las células jóvenes contienen amiloplastos (A) y una gran vacuola (V). Cada célula SCE produce un anillo de mucílago, seguido por una columnela (C). La hidratación de la semilla seca hace que estalle el mucílago, la ruptura de la pared primaria y la formación de una cápsula de dos capas y una estructura de rayos-como (R) (Voiniciuc 2015).

Después de la formación del mucílago, la degradación del almidón y el refuerzo de las paredes secundarias se han completado. La maduración del mucílago consiste en la acumulación de gránulos de almidón en las capas de la epidermis en la cubierta. En esta capa se transforma el almidón en mucílago para depositarlo entre la pared primaria celular y la pared plasmática de estas células. La reducción del mucílago provoca la reducción del protoplasma, lo que provoca que este se encuentre formando una especie de columna situada en el centro de la célula llamada columnela (Windsor *et al.*, 2000). 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 externas, de manera que a medida que los gránulos de almidón van degradándose se produce un refuerzo de las paredes de las células internas.

Al finalizar la maduración de la semilla, el mucílago se seca haciéndose una capa delgada que se despliega solamente cuando entra en contacto con agua (Goto 1985).

Se ha determinado que el mucílago juega un papel muy importante en la germinación acelerada de la semilla, ya que permite absorber más agua y acelerar los procesos de germinación en comparación a los ecotipos deficientes de mucílago (Nguyen *et al.*, 2015).

En semillas de *Arabidopsis* la germinación comienza con la absorción de agua por la semilla seca y termina con el alargamiento del eje embrionario. Cuando la semilla entra en contacto con agua, el mucílago es rápidamente hidratado forzando la ruptura de la pared celular primaria que rodea por completo a la semilla (Bethke *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis*, tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*), se ha demostrado que las paredes de las células de la cubierta de la semilla y el endospermo constituyen un componente importante de la latencia de las semillas y que la regulación de la cubierta de la semilla es un factor crítico en la regulación de la germinación en sí (Penfield *et al.*, 2014).

### 1.6.3. Suberina.

La suberina está compuesta principalmente de glicerol unido a un ácido, los ácidos grasos de cadena muy larga, ácidos dicarboxílicos, alcoholes, ácidos grasos hidroxilados, y ácido ferúlico (Yadav *et al.*, 2014). La suberina es insoluble en agua y disolventes orgánicos y actúa como barreras para los patógenos (Enstone *et al.*, 2002).

La suberina es uno de los principales poliésteres lipídicos en las plantas. Uno de los monómeros más importantes de la suberina es el glicerol. El glicerol se encuentra unido covalentemente a dominios alifáticos y aromáticos de la suberina y se encuentra esterificado

con ácidos grasos. 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).

La suberina se encuentra en la cubiertas de las semillas (Molina *et al.*, 2009), específicamente en las células subepidérmicas del tegumento exterior forman una pared celular engrosada en el lado tangencial interno conocida como la empalizada (Dean *et al.*, 2011) (Figura 2).

La suberina también puede encontrarse en tejidos tanto externos como internos en regiones específicas durante el crecimiento. En la raíz, la suberina es la responsable de formar la banda de Caspari que disminuye el flujo de iones y agua hacia el apoplasto, permitiendo a la raíz tener un control sobre la toma de nutrientes (Enstone *et al.*, 2002) y también de gases, contribuyendo a la resistencia de la pared celular (Ranathunge *et al.*, 2011). La suberina se encuentra dentro de las paredes celulares, en la cara interior de la pared celular a la que está unido y la parte interna de la pared. Tiene un papel crítico en la supervivencia de las plantas protegiéndolo contra diversos estreses bióticos y abióticos.

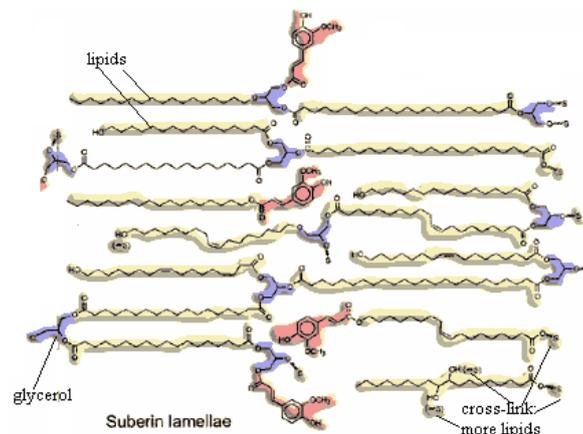


Figura 4. Estructura hipotética de la suberina. Bernards (2002).

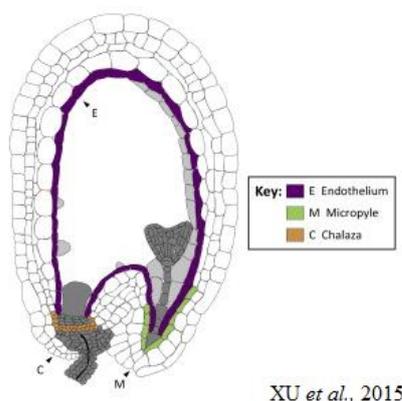
#### 1.6.4. Proantocianidinas.

En *Arabidopsis*, las capas de células tegumentarias tienen diferentes destinos. La capa más interna o endotelio (capa II1) que acumula proantocianidinas (PAs) (Figura 2 y Figura 5) también llamados taninos condensados. Las proantocianidinas se encuentran específicamente en las vacuolas de las células del endotelio (Bethke *et al.*, 2007; Kitamura *et al.*, 2010). Estos flavonoides poliméricos se acumulan en vacuolas como compuestos incoloros durante el desarrollo temprano de la semilla y tienden a oxidarse en pigmentos marrones por la lacasa polifenol oxidasa *TRANSPARENTE TESTA (TT) 10* durante la desecación de semillas (Pourcel *et al.*, 2005).

Las proantocianidinas son polímeros que constan de flavan-3-oles tales como catequinas y epicatequinas, que son sintetizados por leucoantocianina reductasa (LAR) y antocianidina reductasa (ANR), respectivamente, como unidades de monómero (Kitamura 2010).

Muchas de las funciones implicadas en el metabolismo de flavonoides se han identificado por un enfoque basado en la detección mutante visual para los cambios en color de la semilla, de color marrón pálido a amarillo (Lepiniec *et al.*, 2006).

La región de la calaza también compromete la biosíntesis de PAs en una pocas células específicas y la deposición suberina hidrofóbica en el hilium (Beisson *et al.*, 2007).



**Figura 5. Sitio de biosíntesis de proantocianidinas en la cubierta de Arabidopsis.**

Representación esquemática de una semilla de Arabidopsis en desarrollo. La acumulación de PAs se localiza en las capas celulares más interiores de los tegumentos, es decir, E, endotelio; C, chalaza; y M, área de micropilo. (Xu *et al.*, 2015)

## 2. Antecedentes.

Anteriormente, con el objetivo de aislar mutantes con mayor longevidad de semillas, se realizaron búsquedas de semillas 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).

Los mutantes seleccionados presentaban una inserción de copia única de T-DNA que cosegrega con su mayor longevidad. Se recuperó el plásmido presente en el T-DNA con las secuencias flanqueantes de los mutantes seleccionados con el objetivo de determinar la posición en donde 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. Al gen AT5G65410 se lo denominó *ATHB25* y codifica el factor de transcripción HOMEBOX25 en Arabidopsis.

En el segundo mutante *isl5-1D*, la inserción se produjo en el cromosoma 1, concretamente en 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).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Generales

El objetivo general del presente trabajo es el clonaje del promotor *pTT19* en el plásmido pMDC32, para determinar la zona de la expresión en la cubierta de la semillas durante las diferentes fases del desarrollo y realizar distintos ensayos relacionados con la longevidad de semillas en varios ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Clonar el promotor del gen *TT19* en el plásmido pMDC32 y llevar a cabo la transformación genética de *Arabidopsis thaliana*.
- Identificar las zonas y etapas de expresión, durante el desarrollo de las semillas del gen promotor *pTT19::GUS-GFP* que se expresa en la cubierta de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.
- Realizar varios ensayos relacionados con la longevidad de semillas en un grupo de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* del proyecto 1001 genomas secuenciados.
- Determinar los niveles de expresión de los genes *ATHB25* y *COG1* en los distintos ecotipos de estudio de *Arabidopsis*.

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

El siguiente trabajo de investigación, por cuestiones prácticas se ha dividido en dos partes. En la primera parte se ha realizado el clonaje del promotor del gen *TT19*, y en la segunda parte del proyecto con ecotipos seleccionados se realizaron diferentes ensayos relacionados a la longevidad de semillas.

##### **4.1. Clonaje del promotor del gen *TT19*.**

###### **4.1.1. Extracción de DNA genómico de *Arabidopsis*.**

Para la extracción de DNA genómico se ha seguido el protocolo de Muñoz (2011). Se toma un disco de hoja joven y se deposita en un microtubo. Con pequeños pistilos de plástico se tritura las hojas sin tampón. Posteriormente se añade 400  $\mu\text{L}$  del tampón de extracción, luego se agita durante 5 segundos (en este paso las muestras se pueden dejar a temperatura ambiente hasta una hora; hasta tener todas las muestras extraídas). Luego centrifugar de 2-4 min. a 13 000 rpm y transferir 300  $\mu\text{L}$  de sobrenadante a un tubo nuevo evitando tomar el precipitado. Se añadió 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol, mezclado y dejado a temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13 000 rpm para formar un precipitado de DNA. Eliminar el sobrenadante volcando el tubo, realizar un spin y con ayuda de una pipeta elimina el resto de líquido. Secar el precipitado y añadir 100  $\mu\text{L}$  de agua MiliQ y tomar 1  $\mu\text{L}$  por 25-30  $\mu\text{L}$  de reacción de PCR (Tabla 1).

###### **4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR.**

La reacción en cadena de la polimerasa, más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar millones de veces pequeñas cantidades de DNA, en el transcurrir de pocas horas e *in vitro*.

La PCR en su forma más sencilla consiste en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta veces. La muestra se calienta, en el primer paso, hasta lograr la separación de las dos cadenas que constituyen el DNA, hecho que se conoce como “desnaturalización”. En el segundo paso, la temperatura se reduce a permitir la unión de los cebadores con las hebras separadas del DNA molde. Para que pueda producir la unión, cada uno de los cebadores debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en cadenas separadas del DNA molde. En el tercer lugar, la enzima DNA polimerasa extiende los cebadores, en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del DNA molde.

Al cabo del segundo ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento y extensión) el tramo de DNA elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra

disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos da lugar a la amplificación exponencial del segmento de DNA delimitado por los cebadores.

Dado que el DNA genómico que se utiliza como molde es muy grande normalmente antes de realizar los ciclos de amplificación se realiza una desnaturalización inicial más larga (5-10 min.), y tras el último ciclo de amplificaciones se suele poner un paso de elongación de la cadena de unos 7-10 min.

#### 4.2.2. Consideraciones preliminares:

Es muy importante evitar la contaminación. Debido a la amplificación a gran escala que se realizara de cualquier fragmento de DNA, es muy posible que se produzcan contaminaciones. Es recomendable trabajar con el segmento que se va a amplificar en una zona no habitual de trabajo para evitar la contaminación de DNA ambiental.

Para la reacción de 50  $\mu$ L se utilizan las cantidades siguientes:

**Tabla 1. PCR del promotor del gen TT19**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Agua MiliQ		-	29,5 $\mu$ L
DNA genómico	50 ng/ $\mu$ L	50 ng	1,0 $\mu$ L
Tampón	5X	1x	10,0 $\mu$ L
dNTPs	10 mM	-	4,0 $\mu$ L
Cebador directo	100 $\mu$ M	-	2,5 $\mu$ L
Cebador reverso	100 $\mu$ M	-	2,5 $\mu$ L
DNA polimerasa	20 000 units/ml		0,5 $\mu$ L
Volumen Total			50,0 $\mu$ L

Los ciclos utilizados fueron los siguientes:

Un primer ciclo de desnaturalización de 5 min. a 95°C.

30 repeticiones de los siguientes ciclos:

- 30 segundos a 95°C (desnaturalización).
- 20 segundos a 60°C (anillamiento).
- 1 min. a 70°C (elongación).
- Un ciclo final de desnaturalización de min. a 70°C.

Los cebadores utilizados son:

pTT19 KpnI Rev: 5'-cggGGTACCtctataagtttacaataactttgttacgaa-3'

ptt19 HindIII Stul For: 5'-cccAAGCTTgaAGGCCTgcttgtaaagcacgtaggttag-3'

#### 4.2.3. Purificación del inserto *pTT19* y el plásmido *pMDC32*.

La comprobación y posterior aislamiento del promotor *pTT19* y se realizó en gel de agarosa 0,7% y TBE (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico y 2 mM EDTA) x 0,5. Añadiendo a cada 5  $\mu$ L de muestra de DNA (amplificado), 1  $\mu$ L de LBx6 (40% sacarosa, 0,25% azul de bromofenol y 0,1 M EDTA). La electroforesis se desarrollo durante 30 min. Aproximadamente a 90-100 voltios.

Las bandas se han visualizado con un transluminador de luz ultravioleta con cámara fotográfica e impresora térmica para la captación de imágenes. Se calculó la cantidad de DNA por referencia con las bandas del patrón.

#### **4.2.4. Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.**

Para la purificación del inserto del gel se utilizó un kit comercial de la firma de Marcheney y Nagel y se siguió el siguiente procedimiento.

Antes de iniciar la extracción. Comprobar si NT3 tampón de lavado se preparó de acuerdo con el artículo 3 (del manual) para solubilizar los fragmentos de ADN. Nota: Minimizar el tiempo de exposición a rayos UV para evitar dañar el ADN. Tomar un bisturí limpio para cortar el fragmento de ADN a partir de un gel de agarosa. Remover todo el exceso de agarosa. Pesar un microtubo limpio, añadir la rodaja de gel y restar el peso del microtubo para tener el peso de la rodaja de gel. Por cada 100 mg de gel de agarosa <2% añadir 200 µL Buffer NTI. Se debe incubar la muestra durante 5 a 10 min a 50°C. Agitar la muestra brevemente cada 2-3 minutos hasta que el corte de gel se disuelva por completo. Depositar la solución en la columna PCR Clean-up (colocada en un tubo de colección; cargar hasta 700 µL de muestra). Centrifugar durante 1 minuto a 5 000 x g. Desechar eluido y colocar la columna de nuevo en el tubo de recogida. Cargar muestra restante y repita el paso de centrifugación.

#### **4.2.5. Lavado de la membrana de sílice.**

Añadir 700 µL de tampón NT3 al gel NucleoSpin y PCR columna de limpieza. Centrifugar durante 30s a 11 000 x g. Desechar el eluido y colocar la columna en el tubo de recogida. Es recomendable repetir el paso de lavado anterior para minimizar daños con la sal caotrópico y tener posteriormente un bajo ratio A260/230 (ver sección 2.7 para obtener información detallada).

#### **4.2.6. Membrana de sílice seco**

Centrifugar durante 1 minuto a 11 000 x g para eliminar por completo el Buffer NT3. Asegúrese de que la columna de centrifugación no entre en contacto con el flujo mientras se retira de la centrifuga y el tubo de recogida.

El etanol residual de Buffer NT3 podría inhibir las reacciones enzimáticas. El etanol puede ser eliminado por incubación de las columnas de 2 a 5 min a 70°C antes de la elución.

#### **4.2.7. Eluido de ADN**

Colocar el gel NucleoSpin y la columna de PCR de limpieza en un nuevo tubo de microcentrifuga 1,5 mL. Añadir 15-30 µL Buffer NE e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) durante 1 min. Centrifugar durante 1 min a 11 000 x g. La recuperación de ADN de los fragmentos más grandes (>1000 bp) se puede aumentar mediante múltiples etapas de

elución con tampón fresco, calentando a 70°C e incubación durante 5 min. Luego se realizó la cuantificación en nanodrop.

#### 4.2.8. Digestión del promotor *proTT19*

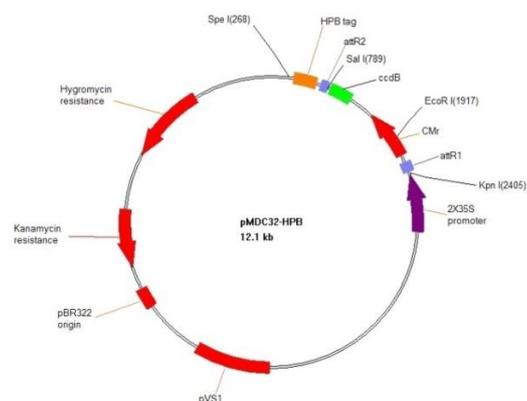
Después de la purificación del inserto se realizó una digestión con las enzimas *HindIII* y *KpnI*. La digestión se incubó a 37°C por 3 horas (Tabla 2).

**Tabla 2. Digestión del promotor TT19**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Agua MiliQ	-	-	21 $\mu$ L
Tampón M	10X	1x	3 $\mu$ L
DNA	1000 ng/ $\mu$ L	4000 ng	4 $\mu$ L
<i>HindIII</i>	20 000 units/ml	-	1 $\mu$ L
<i>KpnI</i>	20 000 units/ml	-	1 $\mu$ L
Volumen Final			30 $\mu$ L

#### 4.2.9. Digestión del plásmido pMDC32

El plásmido pMDC32 (Figura 6) contiene dos promotores juntos del virus 35S (2X35S) que será eliminado para poder realizar la construcción que se necesita para el presente trabajo (Tabla 3). Para tal fin se emplearon las enzimas *KpnI* y *HindIII*. La temperatura de la digestión fue de 37°C durante 2-3 horas.



**Figura 6. Esquema del promotor pMDC32**, empleado en la generación de las líneas transgénicas. Qi *et al.*, (2009).

**Tabla 3. Digestión del plásmido pMDC32**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Agua MiliQ	-	-	18,75 $\mu$ L
Tampón M	10X	1X	3,00 $\mu$ L
DNA	0,8 $\mu$ g/ $\mu$ L	5000 ng	6,25 $\mu$ L
Enzima <i>HindIII</i>	20 000 units/ml		1,00 $\mu$ L
Enzima <i>KpnI</i>	20 000 units/ml		1,00 $\mu$ L
Volumen Final			30,00 $\mu$ L

#### 4.2.10. Purificación del promotor *pTT19* y del plásmido pMDC32 digeridos con *HindIII* y *KpnI*.

La comprobación y posterior aislamiento de promotor *pTT19* y del plásmido PMDC32 se realizó en gel de agarosa 0,7% y TBE x 0,5. Añadiendo a cada 2  $\mu$ L de muestra de DNA, 6  $\mu$ L DE H<sub>2</sub>O Y 2  $\mu$ L de LBx6. La electroforesis se desarrollo durante 30 minutos y entre 90 y

100 voltios. Las bandas se han visualizado con un transluminador de luz ultravioleta, que incluye cámara fotográfica e impresora térmica para la captación de imágenes.

Para la purificación del inserto *pTT19* y del plásmido del gel se utilizó un kit de purificación comercial de la firma Marcheney-Nagel. Tras la purificación se cuantifico la concentración mediante el NANO-Drop.

#### 4.2.11. Ligación del promotor *pTT19* y el plásmido *pMDC32*.

El plásmido *pMDC32* sin el promotor *pTT19* tiene un tamaño de 10 967 pb y el tamaño del promotor *pTT19* es de 542 pb. Para hacer una ligación es una regla que el inserto debe de estar en una concentración molar 3 veces superior que el plásmido, para esto se utiliza la formula siguiente:

Ratio=Plásmido/Inserto Ratio =  $10.962/542 = 20,23$  veces.

(Para 100 ng/ratio)\*3 =  $(100/20,23)*3 = 14,83$  ng inserto.

Para 100 ng de plásmido hay que poner 13,68 ng de inserto.

Como es necesario 100 ng de inserto y está a 34 ng/ $\mu$ L se añaden 2,94  $\mu$ L.

Como es necesario 13,68 ng/ $\mu$ L de plásmido y está a 49 ng/ $\mu$ L se necesita 0,28  $\mu$ L.

La incubación fue a 22°C durante una hora.

Los detalles de la ligación se describen en la siguiente tabla (Tabla 4).

**Tabla 4. Ligación del promotor *pTT19* y el plásmido *pMDC32***

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Plásmido <i>pMDC32</i>	34 ng/ $\mu$ L		2,94 $\mu$ L
Inserto <i>pTT19</i>	49 ng/ $\mu$ L		0,28 $\mu$ L
Tampón	10X	1X	2,00 $\mu$ L
Enzima Ligasa	20 000 units/ml		2,00 $\mu$ L
Agua MiliQ			13,78 $\mu$ L
Volumen Final			20,00 $\mu$ L

#### 4.2.12. Transformación de *E.coli*.

La cepa de *E. coli* que se utilizó durante los experimentos destinados a la obtención de nuevos plásmidos es *F<sup>-</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galUgalKrpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupGfhuA::IS2*

Se extraen del congelador de -80°C microtubo con células competentes de *E. coli*, y se ponen en hielo por 5 a 30 minutos. En cabina de flujo laminar añadir la decima parte del volumen del DNA. Agitar con la mano y volver al hielo rápidamente. Someter a un choque de temperatura (termobloques) a 42°C por 90 segundos. Poner los microtubo en hielo por 5 minutos. Se añade 0,5 mL de medio SOC y se lleva por una hora a incubar a 37°C en cámara de

incubación y agitando. Sembrar en placas petri en medio LB con Kanamicina (el plásmido pMDC32 tiene un gen de resistencia a este producto).

Se sembró de la siguiente manera, en la primera placa se puso una gota, en la siguiente cinco gotas y en la tercera el resto. Se puso cuatro bolas de vidrio y agito de adelante hacia atrás y de izquierda hacia la derecha hasta obtener una distribución homogénea del cultivo, luego reposar las placas abiertas hasta que el agua del medio se haya evaporado, cerrar las placas sin sellar, incubar boca abajo a 37°C por 24 horas.

Después se realiza el recuento de número de colonias regeneradas en un medio de cultivo, por medio de una PCR-colony de colonias numeradas al azar y de algunas seleccionadas al azar determinar si tienen el transgen. Una vez comprobado mediante PCR las colonias que tienen el inserto, se seleccionan algunas colonias y se cultivan en medio LB en agitación constante a 27°C por una noche para luego extraer el plásmido.

#### **4.2.13. Extracción de plásmido de *E. coli*.**

El protocolo seguido fue una modificación del descrito por (Sambrook 2001), basado en que una disolución de un detergente anicónico fuerte y pH elevado, rompe las células y desnaturaliza tanto las proteínas como el DNA cromosómico, y la subsiguiente centrifugación de la suspensión permite recuperar el DNA plasmídico en el sobrenadante (Birnboim y Doly 1979).

Las colonias aisladas en las transformaciones de *E. coli* se cultivaron durante 12-16 horas en 5 mL de LB con los respectivos antibióticos. Seguidamente, se procedió a la centrifugación (2500 rpm durante 15 min. a 4°C) de 4 mL de ese cultivo y a la resuspensión del precipitado celular en 200 µL de la solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 y 10 mM EDTA, pH 8,0); inmediatamente después, se añadieron 300 µL de la solución alcalina recién preparada (0,2N NaOH, 1% SDS; Solución II), se agitó manualmente y la mezcla se colocó en hielo.

A continuación se añadieron 300 µL de la solución III (60 mL acetato potásico, 11,5 mL de ácido acético glacial y 28,5 mL de agua). La mezcla se agitó manualmente y se mantuvo en hielo otros 5 minutos. El sobrenadante resultante de la centrifugación (13 000 rpm durante 10 min. a 4°C) se transfirió a un nuevo microtubo (unos 700-750 µL) y se añadió 2 µL de RNasa al 1%. La mezcla se agitó y se incubó a 37°C durante 20 minutos.

Trascurrida la incubación a 37°C se realizó un lavado con cloroformo para eliminar proteínas del extracto. A 400 µL del extracto se añadió 400 µL de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Este paso se repitió una segunda vez. Se recogió la fase superior acuosa que contiene el DNA y se le añadió 1 volumen de isopropanol. La mezcla se agitó y se mantuvo en hielo 10 minutos. A continuación, se

centrifugó (13 000 rpm, 15 minutos) y se lavó el precipitado, para la eliminación de sales, con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones. Por último se dejó secar el precipitado y cuando estuvo totalmente seco, se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua MiliQ, y para comprobar que la extracción se había realizado correctamente, se realizó la cuantificación en nanodrop y una electroforesis con 2  $\mu$ L del plásmido.

#### 4.2.14. Aislamiento del enhancer *enh2X35S* del plásmido pMDC32.

Mediante un alineamiento de secuencias entre el plásmido pMDC32 y pSKI015 que se realizó con el programa informático ClustalW se evidenció que el plásmido pMDC32 tenía seguidos dos activadores transcripcionales. Para el aislamiento de los activadores transcripcionales se realizó una digestión con las enzimas *HindIII* y *EcoRV* (Tabla 5).

**Tabla 5. Aislamiento del enhancer 2X35S del plásmido pMDC32.**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
H2O MiliQ	-	-	11 $\mu$ L
Tampón M	10X	1X	2 $\mu$ L
<i>HindIII</i>	20 000 units/ml	-	1 $\mu$ L
<i>EcoRV</i>	20 000 units/ml	-	1 $\mu$ L
DNA	800 ng/ $\mu$ L	5 $\mu$ g	5 $\mu$ L
Volumen Final			20 $\mu$ L

EL activador transcripcional del promotor 35S tiene un tamaño de 672 pb que tiene un extremo *HindIII* y el otro romo (*EcoRV*). Para obtener un inserto con extremos romo-romo, el extremo cohesivo se rellenó con la ayuda de la enzima Klenow. La reacción con la enzima Klenow se hizo a 30°C y durante 15 minutos. Los detalles de la reacción se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6. Rellenado del activador transcripcional 2x35S**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Agua miliQ	-	-	29,0 $\mu$ L
DNA	200 ng/ $\mu$ L	600 ng	3,0 $\mu$ L
Tampón	10X	1X	6,0 $\mu$ L
dNTP Mix 2mM	0,05 mM		1,5 $\mu$ L
Klenow	10 units/ $\mu$ L		3,0 $\mu$ L
Volumen Final			60,0 $\mu$ L

Posteriormente se hizo una digestión del plásmido pMDC32-*pTT19* con la enzima *StuI* para dejar los extremos romos. Los componentes de la reacción se describen en la Tabla 7.

**Tabla 7. Digestión del plásmido pMDC32-pTT19**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
H2O MiliQ	-	-	14,4 $\mu$ L
Tampón M	10X	1X	2,0 $\mu$ L
DNA	0,7 $\mu$ g/ $\mu$ L		1,8 $\mu$ L
<i>StuI</i>	10 000 unit/ml		1,8 $\mu$ L
Volumen Final			20,0 $\mu$ L

#### 4.2.15. Ligación del plásmido pMDC32-*pTT19* con el activador transcripcional *enh2x35S*.

La ligación del plásmido pMDC32-*pTT19* (previamente digerido y con extremos romos) y el inserto que corresponde al activador transcripcional *enh2x35S*, se realizó con la enzima Ligasa. Los componentes y volúmenes de la ligación se describen en la Tabla 8.

**Tabla 8. Ligación de la construcción pMDC32-*pTT19* con el activador transcripcional *enh2x35S***

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Plásmido pMDC32	34 ng/μL	99,96 ng	2,94 μL
Inserto <i>proTT19</i>	49 ng/μL	13,72 ng	0,28 μL
Tampón	10X	1X	2,00 μL
Enzima Ligasa	-	-	2,00 μL
Agua MiliQ	-	-	12,78 μL
Volumen Final			20,00 μL

Hasta aquí se tiene las dos construcciones siguientes:

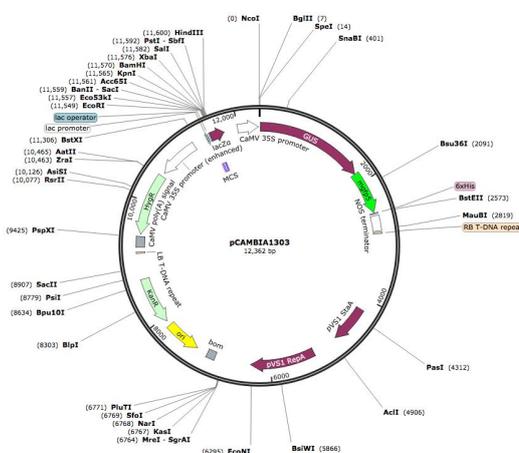
- pMDC32- *pTT19*- *ccdB* (gen letal) y
- pMDC32-2xEnh35S-*pTT19*-*ccdB* (gen letal).

#### 4.2.16. PCR del gen *GUS-GFP* del plásmido pCambia 1303.

El plásmido pCambia1303 tiene el gen *GUS-GFP*, que formará parte de las construcciones del presente trabajo (Figura 7). Se diseñaron cebadores y amplificó por PCR, se insertó en el vector TOPO, se transformó *E. coli* (cepa *DH5α*, ya que este plásmido no tiene el gen letal), y luego por recombinación se introdujo en las dos construcciones antes descritas.

De las colonias transformadas con la reacción de recombinación (también en la cepa *DH5α* por que el plásmido recombinado que queremos ya no tendrá el gen letal) se han extraído los plásmidos para realizar ensayos de restricción y seleccionar

las colonias con el inserto con la dirección correcta. Estas últimas colonias se cultivaron en medio líquido para luego extraer y purificar sus plásmidos. La reacción de la recombinación de los plásmidos se detalla en la Tabla 9. La temperatura de incubación de la reacción fue de 25°C y el tiempo de incubación cuatro horas.



**Figura 7. Esquema del plásmido Pcambia 1303.**

Este plásmido ha sido empleado para realizar PCR del gen *GUS-GFP*, para la construcción del nuevo plásmido.

**Tabla 9. PCR del gen GUS-GFP del plásmido pCambia 1303**

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Plásmido pMDC32-pTT19-ColB	50 ng/μL		1 μL
Plásmido TOPO::GUS-GFP	50 ng/μL		1 μL
TE buffer pH 8			2 μL
Recombinasa LR clonasa	-		1 μL
Volumen Total			5 μL

La temperatura de la recombinación fue de 25°C y por cuatro horas. La siguiente construcción fue la que se ha obtenido e pMDC32-*enh2x35S-pTT19::GUS-GFP*.

**Tabla 10. Recombinación para obtener la construcción el plásmido pMDC32-*enh2x35S-pTT19::GUS-GFP***

Componente	Concentración de Stock	Concentración o cantidad requerida en la mezcla de incubación	Volumen a Añadir
Plásmido pMDC32-pTT19- <i>Enh2x35S</i> -ColB	150 ng/μL	15 ng	1 μL
Plásmido TOPO::GUS-GFP	50 ng/μL	0,05 μg	1 μL
TE buffer pH 8			8 μL
Recombinasa LR clonase	-		2 μL
Volumen Total			12 μL

#### 4.1.18. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* se siguió un protocolo modificado del método de congelación/descongelación de Holsters *et al.*, (1978), que consiste en añadir unos microlitros de la solución del plásmido a una alícuota de 50 μL de células competentes. La mezcla se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se preincuba durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se añaden 0,5 mL de medio SOC y se incuba a 28°C durante 4 horas con agitación a 200 rpm. Finalmente, se extiende todo el volumen en medio LB sólido selectivo con la ayuda de perlas de vidrio.

#### 4.1.19. Transformación de plantas.

Se emplearon 10 plantas de *A. thaliana* cultivadas en sustrato (en maceta de 10 cm de diámetro). A plantas de aproximadamente 10 cm de longitud se les cortó la inflorescencia primaria para promover la aparición de inflorescencias secundarias y tener mayor cantidad de capullos florales. Unos 7 días después de que rebrotaran los escapos florales, se realizó la transformación. Inicialmente se agregó 1 mL de cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés a 200 mL de medio con los agentes de selección apropiados, y se incubó en agitación a 28°C durante unas 12-16 horas, hasta alcanzar una OD600 de 0,6-1. Transcurrido ese tiempo, las células se recogieron por centrifugación en frío a 4000 rpm durante 20 minutos, y se resuspendieron en 400 mL de solución de transformación compuesta por

5%(p/v), sacarosa, 0,02% (v/v), detergente Silwet L-77 (Lehle Seeds), 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 g/L de MES.

La solución de transformación se colocó en un recipiente donde se ha sumergido la parte aérea de las plantas durante 1 minuto. Luego, se cubrieron las plantas con bolsas de plástico para mantener la humedad y aumentar la eficiencia de la transformación. Después de 2 días se retiraron las bolsas y se mantuvieron las macetas en el invernadero hasta recoger la población de semillas transgénicas T1.

Selección de líneas transgénicas y obtención de homocigotos. Las semillas transgénicas T1 se sembraron en placas de cultivo de 14 cm de diámetro con medio MS y vitaminas al 50%, 0,5% de sacarosa, 25 mg/L de higromicina y pH 5,7 (el T-DNA del plásmido pMDC32 otorga tolerancia a higromicina). Después de 7-10 días, las plántulas resistentes (T1) a la higromicina se trasplantaron a macetas para obtener la generación T2. Las semillas T2 se cultivaron en el mismo medio anteriormente descrito. De aquellas líneas transgénicas cuyas semillas mostraron una segregación 3:1 (resistentes: sensibles, que tendrán una inserción), se aclimataron 4 plántulas de cada línea resistentes para obtener la generación T3, donde se podrán seleccionar las plantas homocigotas con el transgen (100% resistentes a higromicina).

#### **4.1.20. Ensayo histoquímico para la detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.**

Para los ensayos de actividad de la glutatión S-transferasa, los órganos de las plantas a revelar se sumergieron en el tampón de reacción GUS [fosfato de sodio (100 mM), EDTA (10 mM), Tritón X-100 (0,1%), ferricianuro de potasio (0,5 mM), ferrocianuro de potasio (0,5 mM) y 2 mM X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil glucurónido) a pH 7,0) durante 8 horas a 37°C. El XGlcA es utilizado por la  $\beta$ -glucuronidasa para crear un precipitado azulado (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo) que permite localizar la expresión de la proteína. Posteriormente, los fragmentos de las plantas se destiñeron mediante lavados sucesivos con etanol al 70%.

Una vez destiñidos las muestras se montaron en portaobjetos y tras poner el cubreobjetos se observaron con un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600) con cámara digital DS-Ri 1 o con una lupa binocular (Nikon SMZ800) con cámara digital Color View 12.

## **4.2. Segunda Parte: Ensayos de longevidad de semillas en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.**

### **4.2.1. Determinación del nivel de expresión de los genes *ATHB25* y *COG1*.**

Para determina los niveles de expresión de los genes *ATHB25* y *COG1* se ha utilizado el kit de extracción de la firma Marcherey-Nagel, con una breve modificación al principio. El protocolo utilizado se describe a continuación:

**Purificación de RNA a partir de tejidos cultivados.****Homogenizar la muestra.**

Se ha extraído RNA de plantas cultivadas *in vitro* de los distintos ecotipos de 7 a 10 días. Las plantas han sido tomadas de las placas e inmediatamente han sido puestas y homogenizadas en un mortero con nitrógeno líquido. Las muestras aún congeladas fueron puestas en un microtubo previamente numerado, luego en nitrógeno líquido y almacenadas en -80°C hasta su utilización.

**Lisado de células**

Se añadió 700 µL de Buffer RA1 y 7µL β-ME (1 β-mercaptoetanol) al sedimento celular y se agitó vigorosamente. Luego se ha centrifugado y puesto el sobrenadante en un nuevo microtubo. Por una segunda vez se ha centrifugado y transferido el sobrenadante a un nuevo microtubo.

**Ajuste las condiciones de unión de ARN**

Para ajustar las condiciones de unión de ARN se añadió 700 µL de etanol (70%), luego se mezcló pipeteando de arriba a abajo (5 veces). Después de la adición de etanol se convirtió en un precipitado fibroso visible, eso no afectó el aislamiento de ARN. También se tomó en cuenta el desagregar cualquier precipitado y cargar la totalidad del precipitado en la columna. No se centrifugó el lisado etanólico antes de cargarlo en la columna con el fin de evitar la granulación el precipitado.

**Enlazar ARN**

Para enlazar el ARN se tomó una columna NucleoSpin® ARN (anillo azul claro) y se colocó en un microtubo de recogida. Se pipeteo el lisado de arriba a abajo 2-3 veces y se cargó el lisado en la columna. Se centrifugó durante 30s a 11.000 x g. Luego se colocó la columna en un nuevo tubo de recogida de 2 ml. Se repitió el procedimiento ya que el volumen a procesar era mayor.

**Membrana de sílice para desalar.**

Se agregó 350 µL de MDB (Buffer de Membrana de desalación) y centrifugo a 11.000 xg durante 1 min para secar la membrana.

**Digestión de ADN.**

Se preparó en un tubo estéril de microcentrifuga de 1,5 ml una mezcla de reacción de DNasa: A cada aislamiento, se añadió 10 µL de DNasa reconstituida, y 90 µL de tampón de reacción para rDNasa. Luego se agitó de arriba y abajo el contenido del tubo. Se agregó 95 µL de la mezcla de reacción de DNasa directamente sobre la centro de la membrana de sílice de la columna y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Lavar la membrana de sílice y secar.

Primer lavado, Se agregó 200  $\mu$ L de buffer raw2 al NucleoSpin® ARN a la columna. Se centrifugó durante 30 s a 11.000 x g. Luego se colocó la columna en un nuevo tubo de recogida (2 ml). El buffer raw2 inactiva la rDNase.

Segundo lavado, se añadió 600  $\mu$ L Buffer RA3 a la Columna NucleoSpin® ARN. Se centrifugó durante 30 s a 11.000 x g. Se desechó el flujo y colocó la columna en un tubo de recogida. Asegurándonos de que el búffer residual de los pasos anteriores se eliminó por lavado con Tampón RA3, especialmente si el lisado ha estado en contacto con el borde interior de la columna durante la carga del lisado en la columna. Para el lavado eficiente del borde interior se lavó con Buffer RA3.

Tercer lavado, Se añadió 250  $\mu$ L Buffer RA3 a la columna ARN NucleoSpin®. Luego se centrifugó durante 2 min a 11.000 x g para secar la membrana por completo. Se colocó la columna en un tubo libre de nuclease.

### **Elución de ARN**

Por último se realizó la elución con 60  $\mu$ L de agua MiliQ libre de RNasa y se centrifugó a 11.000 x g. durante 1 min. 4.1.1.3.

### **Análisis de la expresión génica.**

#### **Síntesis de cDNA para PCR semicuantitativa y a tiempo real.**

Para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario de los ARNs extraídos en el aislamiento de ARN de Arabidopsis, se utilizó el kit de Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Ref. K1641). En cada reacción se añadió el volumen necesario para contener 1pg-5 $\mu$ g de ARN, 2 $\mu$ L de tampón, 1 $\mu$ L de la enzima retrotranscriptasa, y el volumen de agua necesario hasta completar un volumen final de 20 $\mu$ L. Se mezcló suavemente y luego se centrifugó. Se incubó en un termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C, seguido de un paso final de 5 minutos a 85°C. Terminado el proceso se agregó 20 $\mu$ L de agua MiliQ a cada tubo de reacción y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **qRT-PCR**

La PCR cuantitativa (en inglés, quantitative polymerase chain reaction; Qpcr o Q-PCR) o PCR en tiempo real (en inglés real time PCR).

La qRT-PCR o PCR cuantitativa a tiempo real se emplea para amplificar y cuantificar los niveles de ARN mensajeros de los genes de interés de forma absoluta. Se adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo y emplea un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, y que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos.

Se utilizó el kit de Cultek Molecular Bioline “PyroTaq PROBE qPCR Mix Plus. En un microtubo, se agrega 4  $\mu$ L de 5x Pyro Taq PROBE Qpcr Mix Plus. 1  $\mu$ L del primer forward del gen ATHB25 (10 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L primer reverse del gen ATHB25 (10 pmol/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de cDNA molde para la amplificación y como testigo se ha añadido el gen “C” y se ha completado con agua miliQ hasta 20  $\mu$ L. Cada reacción fue realizada por triplicado. Las condiciones para la reacción de la Qrt-PCR fueron, inicio de la desnaturalización 95°C por un tiempo y 1 ciclo, desnaturalización 95°C por 15-20 segundos, alineamiento de 60-65°C y elongación de 72°C.

#### **4.2.2. Ecotipos para realizar ensayos relacionados a la longevidad de semillas.**

Los ecotipos utilizados para realizar ensayos de longevidad de semillas fueron los siguientes: Can-0, Ak-1, Shakdara (Sha), Cvi-0, Enkheim-T, Van-0 parental line for RI lines, Nd-1, Ler-2 (Landsberg erecta), Kin-0, Cen-0, Nw-1, Li-2:1, Er-0, N78777, Fr-2, y Ms-0. Estos ecotipos se encuentran en el grupo de 1001 genomas secuenciados.

#### **4.2.3. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*.**

El cultivo in vitro de *Arabidopsis thaliana* se realizó en placas petri de 15 cm. de diámetro. El medio de cultivo fue el medio basal y las vitaminas propuesto por Murashige & Skoog (1962) de la empresa Duchefa (Ref. M0222), a razón de 4,2 g/L., junto con sacarosa 3% MES 0,09%, AGAR 0,7% y ajustado el pH a 5,7 con KOH o ClH.

Se distribuyó semillas de todos los ecotipos en microtubos de 1,5 ml. Para la desinfección se agregó 1 ml. de etanol 70° GL con 0,05% triton X-100 y se pusieron los microtubos a agitar durante 10 minutos, este tratamiento se realizó dos veces consecutivas. El tiempo y la concentración del producto para la esterilización dependerán de si las semillas serán sembradas en medio de cultivo semi-sólido o líquido. En cabina de flujo laminar se quitó el etanol con una micropipeta y puntas estériles y se realizó tres lavados consecutivos con agua miliQ estéril que consistía en añadir 1 ml de agua y agitar el microtubo, al finalizar se agregó 1 ml de agua miliQ estéril y las semillas fueron puestas a 4°C a estratificarlos, durante 3-4 días para romper la dormancia.

La aclimatación y el cultivo en tierra se realizó en pequeñas macetas cuadradas de polipropileno, con una mezcla de vermiculita exfoliada (“verlite”, vermiculita y derivados S.L.) y turba (Prolifubstrat Gramoflor Vertriebs) (1:1 v/v), dispuestas en el interior de una bandeja, ha sido regada periódicamente cada 3 o 4 días, las condiciones del invernadero han sido de 22°C con 16 Hrs. de luz (130 uE/m<sup>2</sup>/s.) y 8 horas de obscuridad.

#### **4.2.4. Envejecimiento acelerado de las semillas.**

Para estudiar los mecanismos de la pérdida de vigor de la semilla durante el almacenamiento, el tratamiento de semillas conocido como tratamiento controlado de deterioración (CDT) se utiliza ampliamente (Tesnier *et al.*, 2002).

Para realizar el tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas, se realizó la distribución de semillas de cada ecotipo en microtubos, aproximadamente unas 100 semillas tomando como referencia la línea próxima a la base del microtubo. Después de la desinfección y estratificación (protocolo descrito anteriormente), los microtubos se incubaron a 42° durante 24 horas. (Bueso, *et al.*, 2014). Después de la incubación la siembra se realiza en placas petri y la evaluación del porcentaje de germinación se realiza a partir del tercer día al noveno y con la ayuda de un contador automático. Luego de haber obtenido los resultados de envejecimiento acelerado, se seleccionó los ecotipos de los dos extremos, es decir los que obtuvieron mayor y menor porcentaje de germinación. Estos ecotipos fueron los que se sometieron al resto de los tratamientos de envejecimiento acelerado de semillas.

#### **4.2.5. Tinción del mucílago con rojo de rutenio.**

Para el ensayo de tinción del mucílago con rojo de rutenio. Se depositó aproximadamente 100 semillas en un microtubo de 1.5 ml, las semillas se remojaron en agua durante 3 minutos y luego se eliminó el agua. Se agregó una solución de 0,2% (w/v) de rojo de rutenio y el remojo duró 15 min. Transcurrido este tiempo se realizó el lavado con agua estéril milliQ dos veces y luego se agregó 1 ml de agua. Las fotografías fueron tomadas con microscopio investigación eclipse e600 de nikon (Bueso *et al.*, 2014).

#### **4.2.6. Tinción de la suberina con rojo de Sudán.**

La 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 3-5% (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.

#### 4.2.7. Tinción con sales de tetrazolio.

Para el ensayo de permeabilidad se pesaron 0,0250 gr de semillas de los distintos ecotipos y se depositaron en microtubos de 1,5 ml. Se preparó una solución acuosa al 2% de sales de tetrazolio, se agitó y añadió 1 ml de esta solución a los microtubo y se puso a incubar a 30°C durante 96 horas (4 días). Transcurridos este tiempo, se eliminó la solución de sales de tetrazolio y se hizo dos lavados sucesivos cada vez con 1 ml de agua miliQ. Con una micropipeta se eliminó el agua y se añadió 1000µL de etanol absoluto (95° GL), se agitó y con la micropipeta se extendió el etanol con las semillas sobre el papel filtro, se esperó hasta que el etanol haya sido evaporado por completo. Se pusieron las semillas en mortero de porcelana, luego se agregó nitrógeno líquido y se machacaron por completo. Con la ayuda de una espátula se trasvasó las semillas machacadas a un microtubo y se añadió 1 ml de etanol absoluto. Para disolver el formazan los microtubo se pusieron a agitar por 15 minutos y luego fueron centrifugados a 13000 rpm. Con mucho cuidado se recuperó 1 ml para realizar la medición en el espectrómetro a 490MM. Del volumen anterior se trasvasó 670 µL a microtubos del mismo volumen para poder realizar fotografías para su posterior análisis.

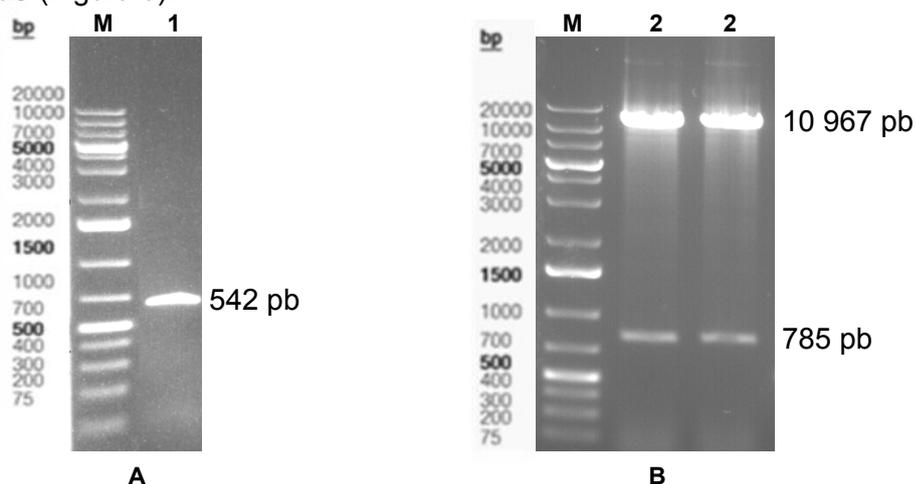
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Análisis de expresión mediante la reacción histoquímica GUS-GFP.

Utilizando la base de datos de secuencias del TAIR obtuvimos la secuencia que incluía la región del gen *TT19* y la introdujimos en el programa Jellyfish (Jellyfish es una herramienta muy utilizada que sirve para controlar, diseñar cebadores, sitios de restricción y PCR). Se identificó la zona que corresponde al promotor y se diseñaron los cebadores: directo incluyendo los sitios de corte *HindIII* y *StuI*, y reverso con el sitio *KpnI*. Se realizó la PCR y se amplificó la región comprendida entre los pares de bases -1 a - 542 respecto al ATG del gen (siendo la adenina el nucleótido+1). A tiempo de diseñar los cebadores y teniendo en cuenta que las enzimas de restricción que vamos a utilizar son endonucleasas se añadieron algunos nucleótidos en los extremos, para que los sitios de corte estuvieran en el interior del cebador (los nucleótidos añadidos fueron seleccionados utilizando la tabla proporcionada en [https://www.neb.com/~media/NebsUs/Files/Chart%20image/cleavage\\_olignucleotides\\_old.pdf](https://www.neb.com/~media/NebsUs/Files/Chart%20image/cleavage_olignucleotides_old.pdf)).

Una vez amplificado el promotor *pTT19* a partir de DNA genómico de plantas silvestres (Col 0) de *Arabidopsis* mediante polimerasas de alta fidelidad para no introducir mutaciones, se purificó la banda correspondiente al cebador (por si existían otros amplificados no específicos (Figura 8) y se digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *KpnI* y se volvió a purificar el inserto a partir del gel de agarosa.

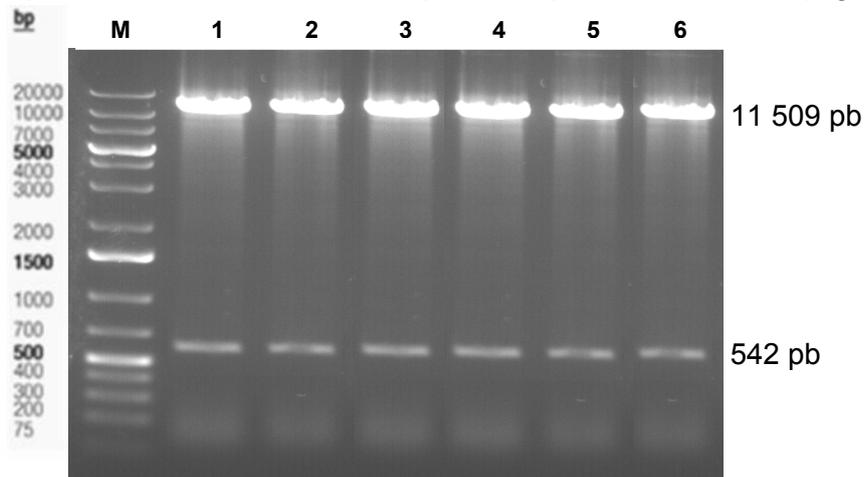
Por otro lado en el vector pMDC32, se identificó la zona donde se encontraba el promotor 2x35S y se vio que estaba flanqueado por *KpnI* y *HindIII*. Se realizó una digestión con estas enzimas, se hizo la electroforesis y la purificación del plásmido pMDC32 que ya no llevaba el promotor 2x35S (Figura 8).



**Figura 8. Amplificación y digestión del promotor *pTT19* mediante enzimas de alta fidelidad.**  
**A.** Se muestra en el carril M el marcador GeneRuler 1 kb Plus, en el carril 1 se muestra el producto de la PCR y su digestión con las enzimas *HindIII* y *KpnI* del promotor *TT19* (542 pb). **B.** Se muestra la digestión del vector pMDC32 con la enzima *HindIII* y *KpnI* mostrando el promotor 35S liberado (785 pb) y el resto del plásmido (10 967 Kb).

Después de tener por un lado el inserto (promotor *pTT19*) y por otro el plásmido pMDC32 abierto se procedió a la ligación de ambos con la enzima T4 DNA ligasa. Posteriormente se

transformó *E. coli* (una cepa tolerante al gen letal) y se purificaron sus plásmidos. Después de realizar un ensayo de restricción con las enzimas utilizadas durante el clonaje (*Hind*III y *Kpn*I) se confirmó por electroforesis que las colonias tenían el promotor del gen *TT19* (se aprecia la banda de 542 pb en vez de la banda de 785 pb de los promotores 2x35S (Figura 9).

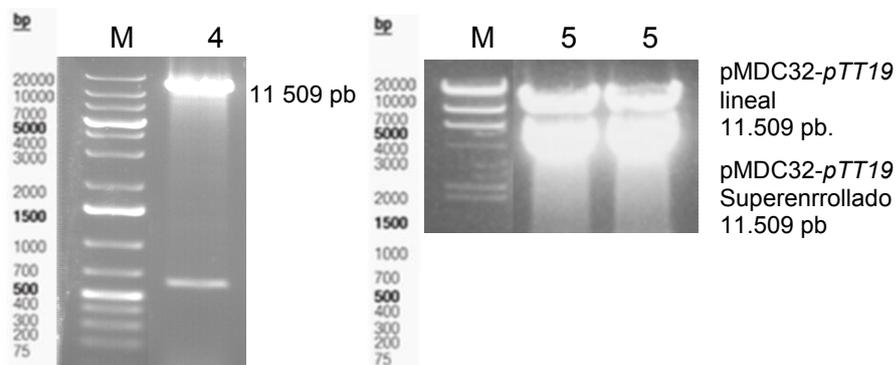


**Figura 9. Digestión del plásmido pMDC32 que tiene el promotor pTT19.**

Los plásmidos fueron extraídos de colonias que aparecieron después de la transformación de *E. coli* con el plásmido *pMDC32-pTT19*. Marcador GeneRuler 1 Kb plus. Carriles 1 al 6 corresponden a las colonias analizadas.

Por otro lado también introdujimos delante del promotor *pTT19* un inserto formado por dos activadores transcripcionales (*enh2X35S*) del promotor 35S. Para ello se digirió el plásmido *pMDC32-pTT19* con la enzima *Stu*I, dejando los extremos romos. Se corrió un gel de electroforesis para separar el plásmido abierto del plásmido no digerido. En el gel se pudo observar que la enzima *Stu*I no cortó todo el plásmido utilizado en la reacción, pero a pesar de ello pudimos purificar la banda correspondiente al plásmido abierto (Figura 10).

Para obtener el inserto correspondiente al activador transcripciones se digirió el plásmido *pMDC32* con las enzimas *Hind*III y *Eco*RV (Figura 10). Se rellenó el borde 5' cohesivo *Hind*III con la enzima *Klenow*. Luego con la enzima T4 DNA LIGASA se realizó la ligación del plásmido *pMDC32-pTT19* y el inserto formado por dos activadores transcripcionales *enh2x35S*.

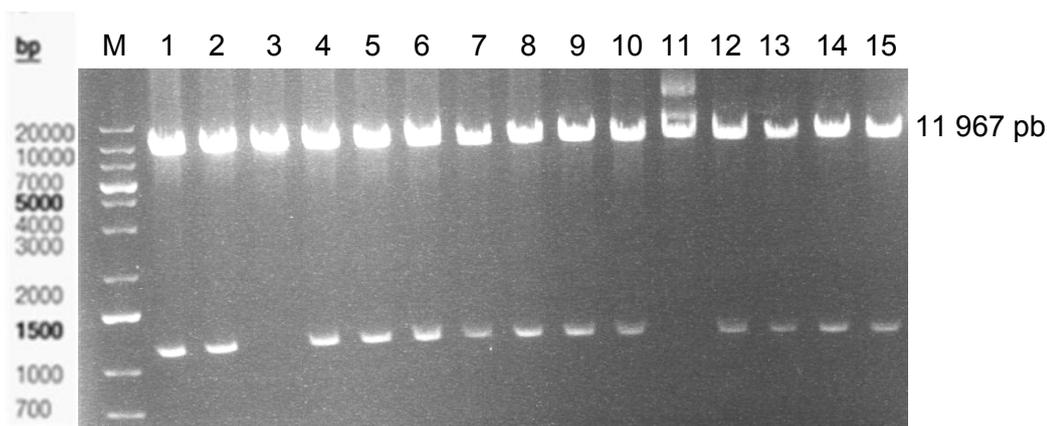


**Figura 10. A.** Aislamiento por digestión y electroforesis del activador transcripcional *enh2x35S* (672 pb). **B.** Aislamiento del plásmido lineal de la construcción *pMDC32-pTT19* con la enzima *Stu*I.

A

B

Después de ligar los dos fragmentos y transformar *E. coli* se obtuvieron colonias que se lanzaron en medio de cultivo para extraer sus plásmidos. Para determinar que colonias tenían el enhancer con la orientación que originalmente tenían el plásmido de partida (pMDC32) se realizaron unos ensayos de restricción con las enzimas *Hind*III y *Kpn*I, mostrando que algunas de las colonias tenían el fragmento de 1214 pb que indicaría tener metido el activador en el inicio del *pTT19* (Figura 11). Este nuevo plásmido se designó como pMDC32-*enh2x35S-pTT19*.



**Figura 11. Ensayo de restricción del vector pMDC32-pTT19-2xenh35S (12 181 pb).** Con las enzimas *Hind*III y *Kpn*I. Se ha obtenido una banda de 1 214 pb que corresponde al promotor *pTT19* y a los activadores transcripcionales *enh2x35S* y el otro al resto del plásmido.

Una vez obtenidos los dos plásmidos aceptores de insertos que son el *pMDC32-pTT19* y el *pMDC32-*enh2x35S-pTT19**, nos planteamos añadirle genes reporteros como *GUS* o *GFP*, o una fusión de ambos. Dado que el plásmido pCAMBIA1303 contiene como genes reportero una fusión de *GUS-GFP*, utilizamos este para introducirlo en el vector donador del inserto. Este gen se obtuvo a partir de una PCR del plásmido pCambia1303, por lo que se diseñaron un cebador directo que se iniciaba en al ATG, y un cebador reverso que llegaba hasta el stop del gen. Una vez conseguida la amplificación del gen se introdujo en el plásmido pCR™8/GW/TOPO® siguiendo las especificaciones del proveedor. Tras la reacción se transformó *E. coli* y se obtuvo colonias resistentes a espectinomicina. Mediante ensayos de restricción con la enzima *EcoRV* se determinó la orientación del gen en el vector TOPO (grafico no mostrado, colonias con la orientación correcta darán tres bandas de 232, 1 890 y 3263; mientras que colonias con la orientación incorrecta darán bandas de 232, 700 y 4 453 pb). Después se envió los plásmidos a secuenciar para comprobar que no tuvieran mutaciones.

Teniendo estos dos tipos de construcciones: el aceptor de inserto y el donador de inserto se procedió a realizar las recombinaciones. Se hicieron dos reacciones por separado: pMDC32-*enh2x35S-pTT19* y pCR™8/GW/TOPO®::*GUS-GFP*, el siguiente pMDC32-*pTT19* y el vector

pCR™8/GW/TOPO®::GUS-GFP, obteniéndose las siguientes construcciones pMDC32-*enh2x35S-pTT19::GUS-GFP* y pMDC32-*pTT19::GUS-GFP*, respectivamente.

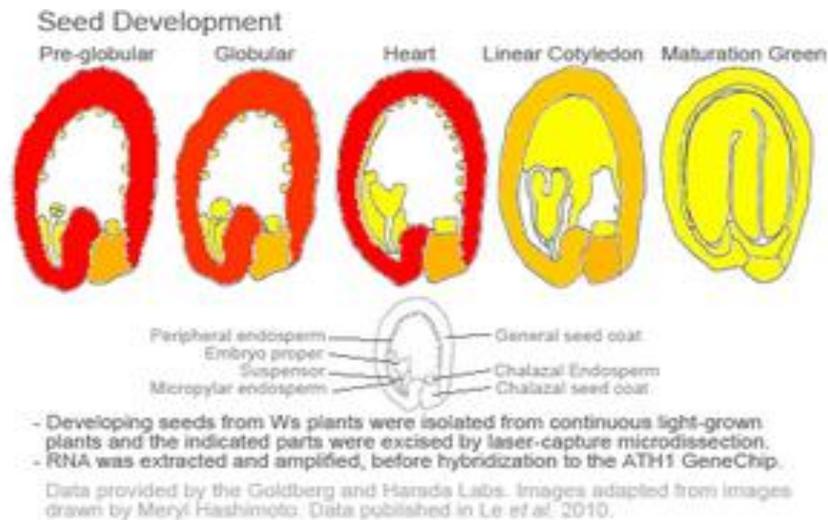
Con estas dos nuevas construcciones se transformó *Agrobacterium tumefaciens* y en las colonias que aparecieron se realizó PCR colony para confirmar la presencia de los dos plásmidos, para ello en esta PCR se utilizó un cebador directo del interior del promotor y otro situado en posición reversa dentro del gen *GUS* (Figura no mostrada).

Con una de las colonias de cada grupo se hizo la transformación genética de *Arabidopsis* mediante inmersión floral, en la solución bacteriana de transformación de las inflorescencias de plantas de un mes crecidas en invernadero.

Se obtuvieron plantas transgénicas tolerantes a kanamicina (plántulas T1 que eran capaces de crecer en el medio selectivo) y se aclimataron en macetas para obtener su descendencia, tras dos meses aproximadamente en el invernadero, se obtuvieron semillas que fueron almacenadas por una semana (semillas T2), luego se sembraron en placas petri aproximadamente 100 semillas y estratificadas a 4°C por 72 horas. Luego han sido llevadas a la sala de crecimiento, donde cinco días después de la germinación y el crecimiento, era posible ver diferenciar las plántulas transgénicas de las no transgénicas (plantas T2), por el tamaño y vigor de los cotiledones y el hábito y vigor del crecimiento de las raíces. Se realizó el recuento para cada línea de las plántulas sensibles y tolerantes, para poder realizar un análisis Chi-cuadrado y poder determinar que líneas tenían una sola inserción.

Los análisis estadísticos mostraron que únicamente 8 de las 18 líneas sembradas presentaron la relación 3 (tolerantes): 1 (sensible) correspondiente a la segregación mendeliana para una inserción. Para cada una de las líneas seleccionadas se llevaron al invernadero y se aclimataron 4 plántulas para obtener la nueva descendencia (semillas T3).

El gen *TT19* de *Arabidopsis*, codifica una glutatión S-transferasa. Esta proteína tiene dos dominios funcionales e influyen tanto en el transporte de antocianinas y de proantocianidinas (Wang *et al.*, 2012) y se encuentra en la capa de células más interna de la cubierta de la semilla (endotelio, chalaza y micropilo) (Xu *et al.*, 2014) que se ha determinado con el ensayo *GUS* (Kitamura *et al.*, 2004, Sun *et al.*, 2012, Kitamura *et al.*, 2010, Cheng *et al.*, 2015). Las zonas de expresión descritos en el párrafo anterior, son mucho más específicos que los proporcionados en el análisis *in silico* por el Efp-Browser (Figura 12). El sitio de expresión del gen *TT19* según el navegador de expresión es como se describe a continuación: en la fase Pre-globular (día 1-2), globular (día 3) y corazón (día 4). El gen *TT19* se expresa más en toda la cubierta de la semilla, luego se reduce en la etapa del cotiledón linear, y durante las cuatro fases la expresión es menor y constante en la chalaza.



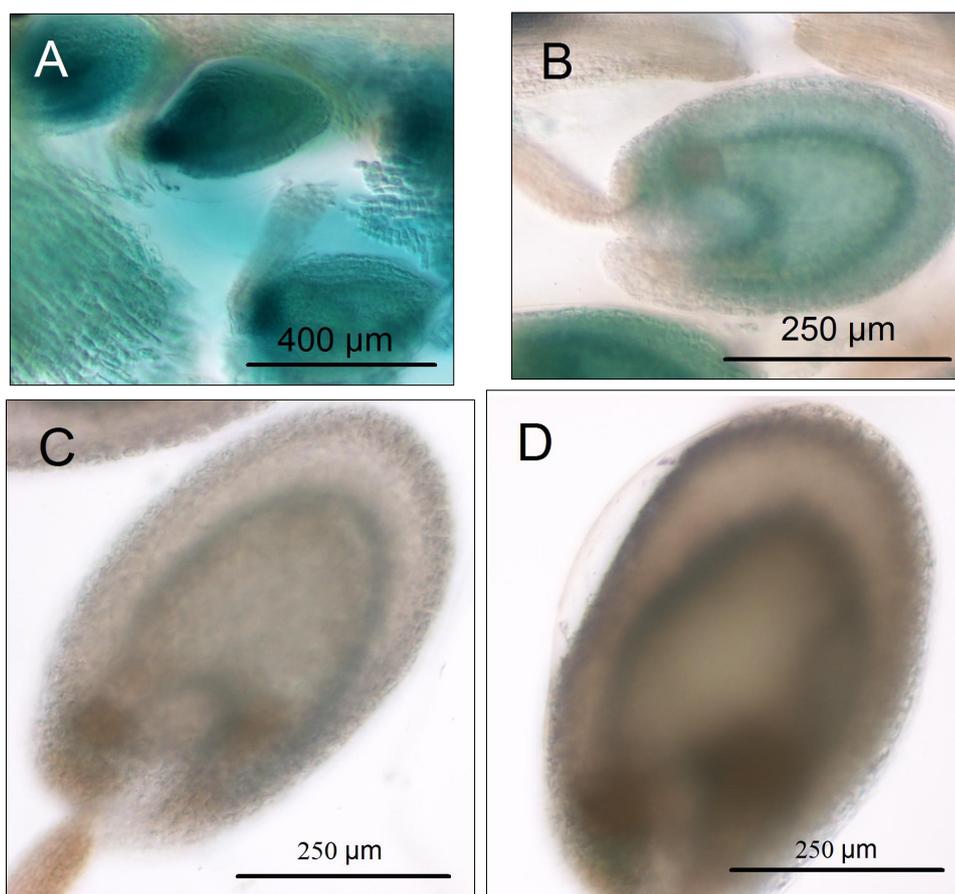
**Figura 12. Análisis in silico del gen *TT19*.**

Fases: Pre-globular (día 1-2), globular (día 3) y corazón (día 4). Mayor expresión del gen *TT19* (rojo intenso) en toda la cubierta y el micropilo. Menor expresión del gen *TT19* (color naranja) en la etapa del cotiledón lineal y durante las cuatro fases la expresión. En la chalaza la expresión es menor que en la cubierta pero constante (Le *et al.*, 2010).

En las Figuras 13 y Figura 14 se muestran fotografías de los ensayos *GUS* y *GFP* respectivamente del promotor *pTT19* junto con el activador transcripcional (*enh2x35S*). La zona de expresión corresponde específicamente a la región del endotelio y la chalaza que son las capas donde se acumulan PAs y antocianinas.

La glutatión-S-transferasa codificada por *TT19* es necesaria para el transporte de proantocianidinas y antocianinas al tonoplasto. Su función se ha demostrado a través del mutante *tt19* (*tt19-7*), que apenas acumula antocianinas, pero produce un nivel de 36% más alto de flavonol que la de tipo salvaje (WT) (Sun *et al.*, 2012). Las antocianinas (grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles) se sintetizan en la superficie citosólica del retículo endoplasmático (ER), pero después predominantemente se acumulan en la vacuola.

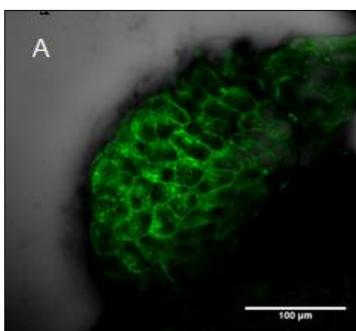
Las fotografías de la Figura 13 muestran la expresión del promotor *pTT19*, junto al gen reportero *GUS* y activadores transcripcionales (*enh2x35S*). En el día 1 DDF (Día Después de la Floración) (A), Existe abundante expresión en la zona de la chalaza y el micropilo, la intensidad de expresión se va reduciendo a medida que avanza hacia el otro extremo de la semilla, también se puede diferenciar claramente la expresión en el endotelio. En el día 3 DDF (B) y en el día 4 DDF (C), se ve claramente la expresión en el endotelio y la chalaza. Al día 5 DDF (D) la expresión del promotor *pTT19* es notoria incluso en semillas que se encuentran en proceso de maduración en el endotelio y la chalaza. Las fotografías son representativas de los ensayos *GUS* en líneas homocigotas de *Arabidopsis*.



**Figura 13. Análisis de la actividad del gen *GUS* con la construcción *enh2x35S-pTT19::GUS* durante el desarrollo de semillas de *Arabidopsis*.**

Después de la floración) (A), 3 DDF (B), 4 DDF (C), 5 DDF (D). La actividad *GUS* se observó con microscopio confocal. Barra=400 µm en (A), 200 µm en (B), 200 µm en (C) y 200 µm (D). Fotografías representativas de los ensayos *GUS* en líneas homocigotas de *Arabidopsis*.

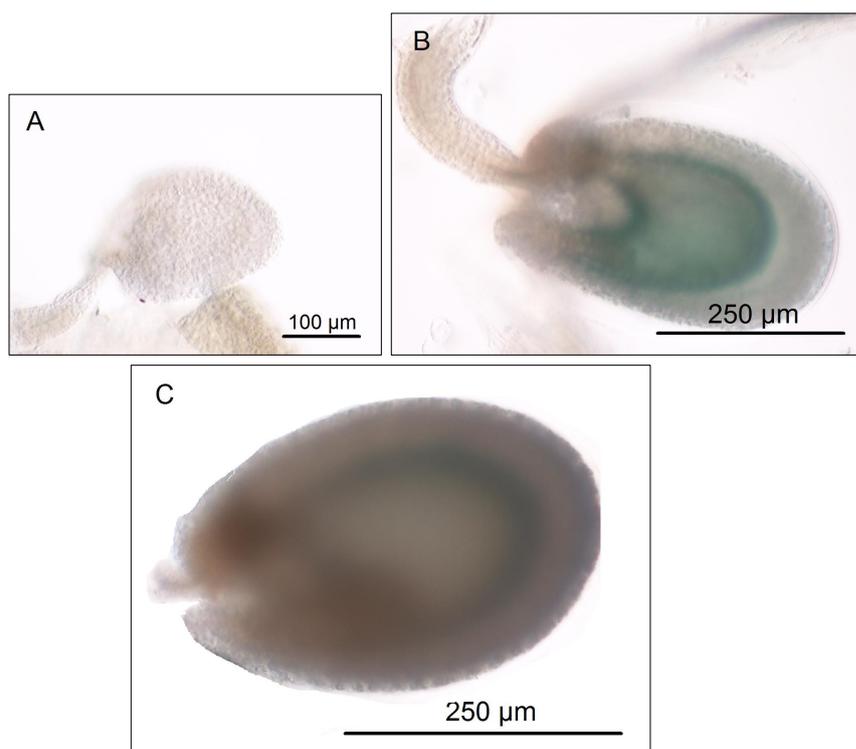
En cuanto a la expresión del promotor *pTT19* junto al gen reportero *GFP* (*enh2x35S-pTT19::GFP*), se observó que este gen se expresa en una capa interna de la cubierta de la semilla (Figura 14).



**Figura 14. Análisis de la actividad del gen *GFP* con el activador transcripcional y el promotor *enh2x35S-pTT19* en el desarrollo de semillas Wild-Type de *Arabidopsis*.**

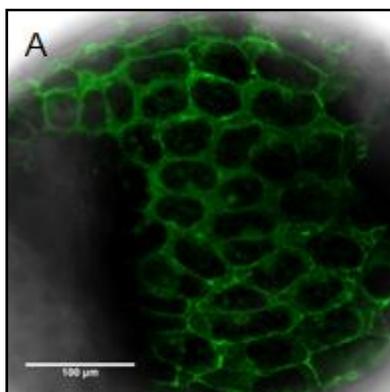
La actividad *GFP* se observó en una capa interna de la cubierta de la semilla durante su desarrollo. Barra= 100 µm.

En la Figura 15 se puede observar la expresión del promotor *pTT19* junto al gen reportero *GUS* en la cubierta. En la región del endotelio en el día 0 (ovulo sin fecundar) no se ve expresión del promotor que corresponde al día de la floración (**A**). Pero si se observa la expresión en la zona del endotelio y la chalaza en el día 3 despues de floración (DDF, (**B**) y tambien en el dia 5 DDF (**C**). Las fotografías representativas con el gen *GUS* se realizaron en líneas homocigotas de *Arabidopsis*. En la Figura 16 se puede observar expresión del promotor *TT19* en una capa de la cubierta de la semilla.



**Figura 15. Análisis de la actividad del gen *GUS* junto con el promotor *pTT19* en el desarrollo de semillas Wild-Type de *Arabidopsis*.**

(**A**) falta de expresión del promotor *pTT19::GUS* el día 0, que corresponde al día de la floración. Si se ha observado expresión en el día 3 DDF (**B**) y 5 DDF (**C**), la actividad *GUS* se observó con el microscopio confocal. barra=100 µm in (**A**), 250 µm in (**B**), 250 µm (**C**). Fotografías representativas de los ensayos *GUS* en líneas homocigotas de *Arabidopsis*.



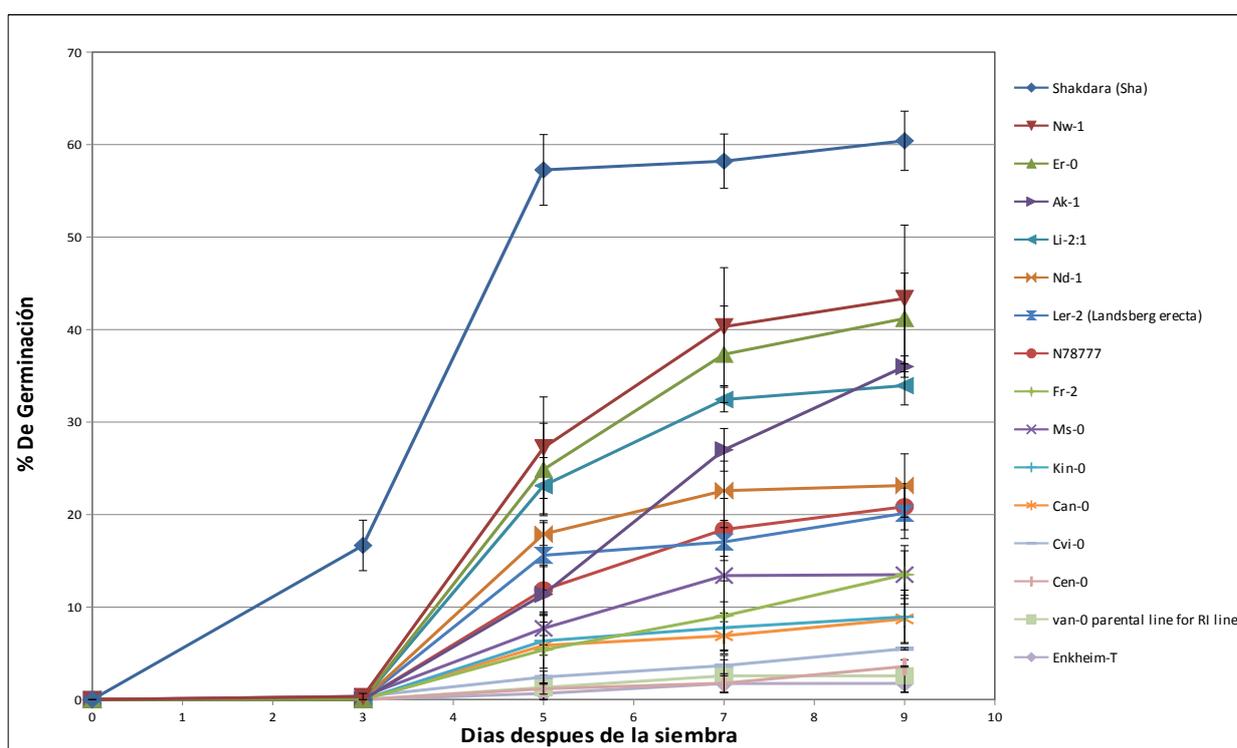
**Figura 16. Análisis de la actividad *GFP* junto con el promotor *pTT19* en el desarrollo de semillas Wild-Type de *Arabidopsis*.**

La actividad *GFP* se observó en la cubierta de la semilla durante su desarrollo (**A**). Barra= 100 µm.

## 5.2. Estudio de la cubierta de la semilla en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

### 5.2.1. Tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas de distintos ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Este trabajo de investigación se inició con 25 ecotipos seleccionados del proyecto 1001 genomas secuenciados. Inicialmente semillas de todos los ecotipos se sembraron *in vitro* en placas petri, luego las plántulas se aclimataron y se cultivaron hasta obtener semillas. Del total de los ecotipos, solo 16 ecotipos dieron semillas, por lo que el ensayo de envejecimiento acelerado de semillas se realizó con estos ecotipos, según las condiciones descritas por Bueso *et al.*, (2014). Las evaluaciones del porcentaje de germinación se han realizado a los 3, 5, 7 y 9 días después de la siembra (Figura 17).



**Figura 17. Tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas de 16 ecotipos.**

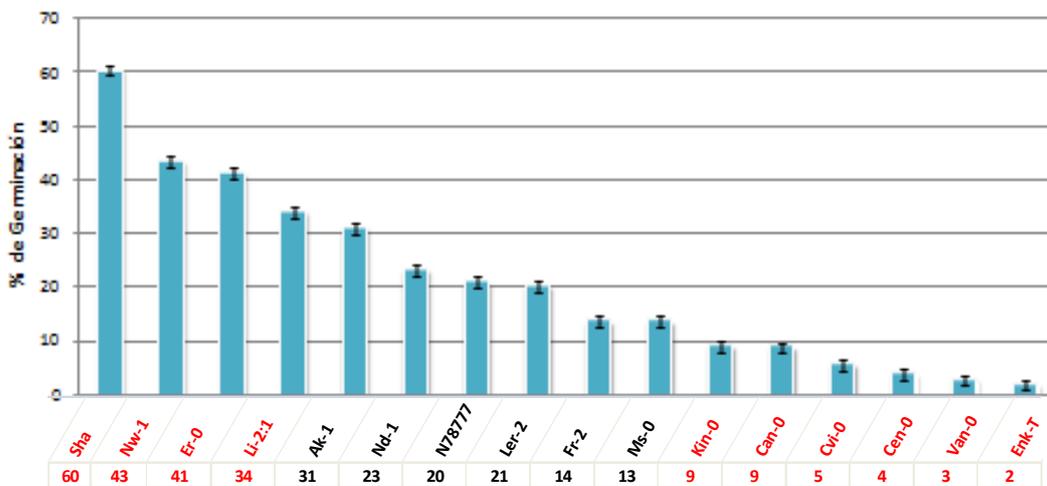
Valores del porcentaje de germinación de 16 ecotipos, después del tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas después de 24 horas. Las medias y error estándar corresponden a tres repeticiones independientes de 52 semillas cada uno.

Después, como control se ha sembrado *in vitro* semillas de los distintos ecotipos (sin ningún tratamiento), con el objetivo de verificar la viabilidad de los diferentes ecotipos y de que los resultados sean confiables. Se realizó la evaluación del porcentaje de la germinación 9 días después de la siembra. En algunos ecotipos el porcentaje de germinación que se logró fue próximo al 100%. En tres ecotipos (Cen-0, Cvi-0 y Enk-T) (Figura 18) que tienen la cubierta de color marrón por la elevada oxidación de las proantocianidinas y el bajo contenido de suberina, el porcentaje de germinación fue próximo al 50%.

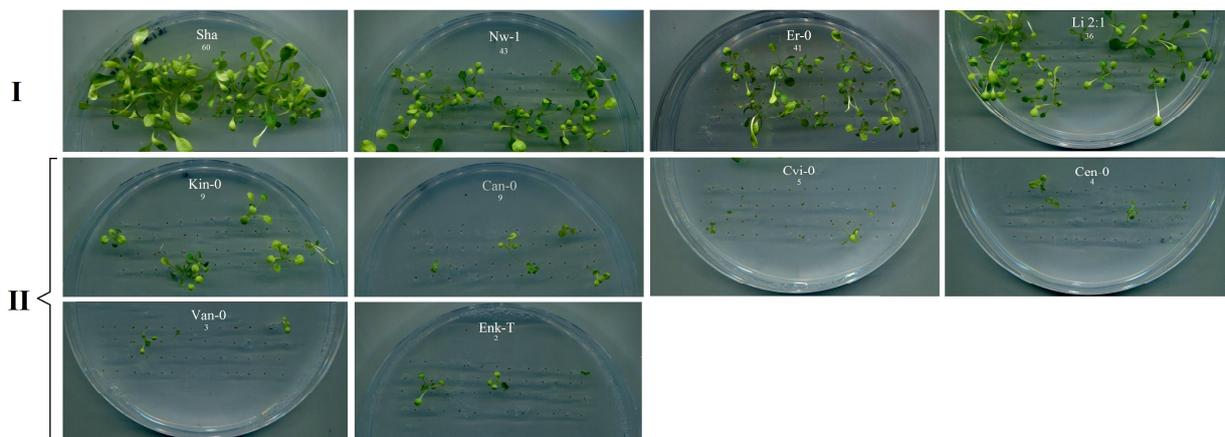


**Figura 18. Germinación en ecotipos de Arabidopsis.**  
Germinación de ecotipos que tienen elevada oxidación de proantocianidinas y bajo contenido de suberina Cen-0, Cvi-0 y Enk-T.

Luego de obtener los resultados y ser analizados, se seleccionaron los ecotipos más y menos longevos, (ecotipos con el nombre y porcentaje de germinación en color rojo (Figura 19 y Figura 20). Con los 10 ecotipos se realizaron ensayos posteriores relacionados a la longevidad de semillas.



**Figura 19. Germinación de ecotipos, después del tratamiento de envejecimiento acelerado.**  
El tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas se realizó por 24 horas. La germinación de los distintos ecotipos corresponde a 9 días después de la siembra. Junto al nombre del ecotipo se encuentra el porcentaje de germinación.



**Figura 20. Germinación al día 9 y después de tratamiento de envejecimiento acelerado (24 Hrs).**  
Los ecotipos de la Fila I corresponden a los ecotipos más longevos situados a la izquierda de la Figura 19 y tienen el nombre del ecotipo en color rojo. Los ecotipos de la Fila II corresponden a los ecotipos menos longevos situados a la derecha de la Figura 18. Los gráficos corresponden a experimentos independientes de 52 semillas.

### 5.3. Ensayo con rojo de rutenio para determinar el contenido de mucílago en la cubierta de la semilla en *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados del ensayo con rojo de rutenio se han dividido en 3 grupos, según el contenido de mucílago en la cubierta. Los ecotipos que tienen mayor cantidad de mucílago en la cubierta de la semilla se encuentran en la Fila I (Figura 21), y de estos cuatro ecotipos Can-0 es el que tiene mayor contenido de mucílago en la cubierta. En todos los ecotipos, el tratamiento de envejecimiento acelerado se realizó por 24 horas y a 42°C.

En la fila II, agrupa a los ecotipos que tienen un contenido intermedio de mucílago (Figura 21). A este grupo corresponden los siguientes ecotipos: Van-0, Kin-0, Nw-1 y Li-2:1, sus porcentajes de germinación son 9, 2, 43 y 36 por ciento respectivamente. Al realizar una comparación visual entre estos dos grupos de ecotipos (Van-0, Kin-0) y (Nw-1, Li-2:1), no existen diferencias en la distribución ni en la cantidad de mucílago en la cubierta de la semilla. Observando la Figura 21, se puede evidenciar que es el contenido de suberina es el que produce diferencias en la longevidad en los ecotipos de los dos subgrupos descritos en el párrafo anterior.

En la fila III se encuentran los ecotipos con ausencia de mucílago y/o con poca cantidad de mucílago, que también corresponden a los ecotipos que mayor longevidad tienen, (porcentaje de germinación, Figura 18.) después del tratamiento de envejecimiento acelerado. Estos ecotipos son: Er-0 (41% de germinación) y Sha (60% de germinación), este último ecotipo tiene una ausencia total de mucílago en la cubierta de la semilla. Ambos ecotipos tienen elevada cantidad de mucílago.

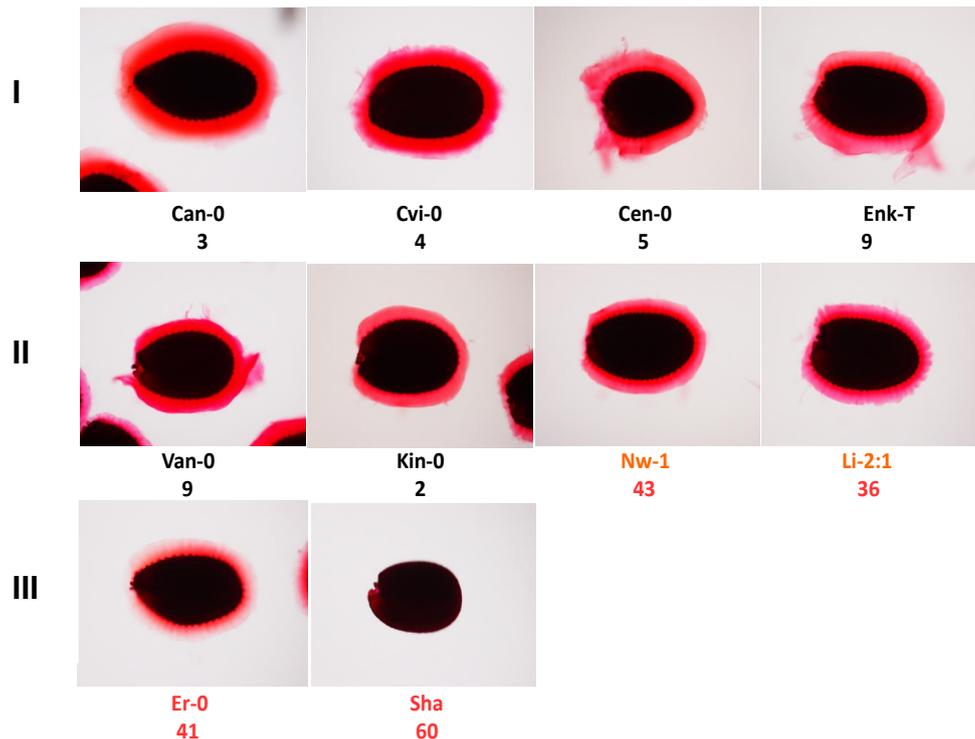
Hasta ahora no hay reportes que demuestren la importancia del mucílago en la longevidad de semillas. Previamente se conocía de que mutantes con reducido mucílago tienen una menor capacidad para germinar (en relación con el tipo silvestre), en condiciones de disponibilidad limitada de agua (Nesi *et al.*, 2002). En *Arabidopsis* el mutante *glabra 2 (g/2)* que es afectada específicamente la diferenciación de las células epidérmicas de la testa (Haughn & Chaudhury 2005). No se observó ninguna diferencia en la permeabilidad de la testa en mutantes *g/2* a sales de tetrazolio. (Debeaujon *et al.*, 2000), lo que indica que el mucílago no afecta a la permeabilidad.

También se había determinado que el mucílago juega un papel importante en la germinación acelerada de la semilla, ya que permite absorber más agua y acelerar los procesos de germinación en comparación a los ecotipos deficientes de mucílago (Nguyen *et al.*, 2015).

Por todos los resultados obtenidos por otros investigadores y los obtenidos en este trabajo, al parecer la longevidad y la baja capacidad de germinación tienen cierta relación con la ausencia de mucílago en la cubierta de la semilla. Como describe Saez-Aguayo *et al.*, (2014) el mucílago no aumentó la tasa de absorción de agua por los tejidos internos, por lo que es más probable que desempeñe un papel en la retención de agua alrededor de la semilla, Esto es mucho más evidente en el ecotipo Sha en la que hay ausencia total de mucílago y donde

el porcentaje de germinación (longevidad) se incrementa aproximadamente en un 20% más respecto al segundo ecotipo más longevo (Nw-1, 43% germinación) que tiene un poco de mucílago.

Es necesario mencionar que aparte de que se demuestra la hipótesis de Saez *et al.*, (2014) sobre la función del mucílago hay otros factores que tienen mucha importancia en la longevidad de semillas como la suberina presente en la empalizada y de PAs en la aleurona, micropilo y la chalaza. Su importancia ha sido comprobada con diferentes mutantes de pérdida y de ganancia de función.



**Figura 21. Clasificación de ecotipos, según el contenido de mucílago en la cubierta de la semilla en *Arabidopsis*.**

Los ecotipos con el nombre y el valor del porcentaje de germinación en color rojo, corresponden a los ecotipos con mayor longevidad después del tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas. En la fila I y de izquierda a derecha, se agrupan los ecotipos con alto contenido de mucílago. En la fila II se encuentran los ecotipos que tienen contenido intermedio de mucílago y en la fila III los ecotipos con bajo contenido de mucílago.

#### 5.4. Ensayo con rojo de sudan de la suberina en la cubierta de la semilla.

La capa de suberina es insoluble e impermeable al agua. Los mutantes de suberina tienen un aumento de la permeabilidad en la cubierta de la semilla, (Beisson *et al.*, 2007; Ranathunge *et al.*, 2011). Específicamente el mutante *gpat5*, que es un mutante de la ruta de la suberina, tuvo un fuerte aumento en la permeabilidad de la cubierta (Beisson *et al.*, 2007). Estos trabajos muestran la importancia de la suberina en la permeabilidad de las semillas.

Hasta ahora no se habían realizado ensayos de permeabilidad y longevidad de semillas con ecotipos. En el presente trabajo se ha determinado que la cantidad de suberina es directamente proporcional a la longevidad en todos los ecotipos. Esto se ha demostrado el

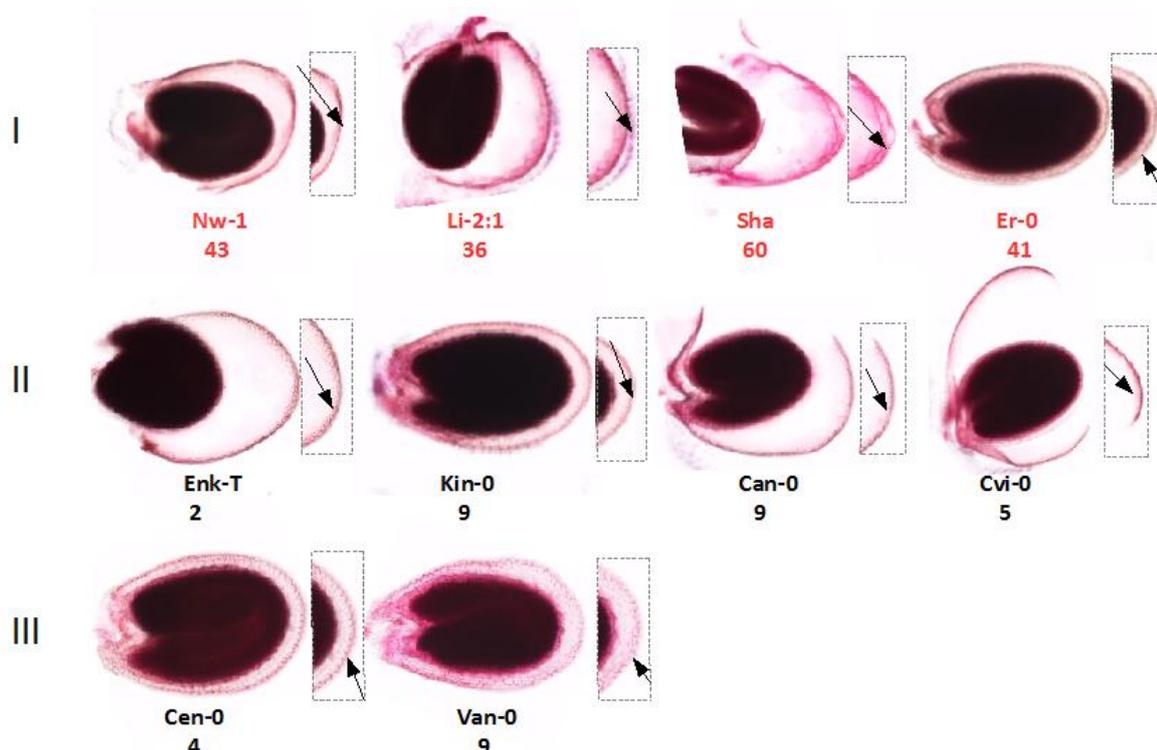
ensayo con rojo de sudan que muestra la cantidad de suberina que se encuentran en las células de la empalizada.

Para hacer claras las diferencias, se han ordenado los ecotipos en tres grupos según el contenido de suberina en células de la empalizada. En el primer grupo se encuentran los ecotipos con mayor cantidad de suberina que también son los ecotipos que tienen mayor longevidad y son los siguientes: Nw-1 43%, Li 2:1 36%, Sha 60%, Er-0 41% (el valor al lado derecho del ecotipo corresponde al porcentaje de germinación después del tratamiento de envejecimiento acelerado) (Figura 22).

Al grupo II se añadieron los ecotipos con contenido medio de suberina, a este grupo corresponden los siguientes ecotipos Enk-0 (2%), Kin-0 (9%), Can-0 (9%) y Cvi-0 (5%) (Figura 22).

Y en el grupo III se encuentran los ecotipos con bajo contenido de suberina, a este grupo corresponden los ecotipos: Cen-0 4%, Van-0 3% (Figura 22). En estos dos últimos grupos, hay diferencias en la cantidad de suberina en la capa de la empalizada. Pero solo es posible que la suberina confiera longevidad a las semillas a partir de cierta cantidad.

La permeabilidad en la cubierta de las semillas que desempeña un papel importante en la latencia, longevidad y germinación.



**Figura 22. Visualización de la capa de suberina de la cubierta de la semilla de Arabidopsis.** Se visualizó el contenido de suberina en la empalizada empleando una tinción con rojo de sudan. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio óptico. En la fila I se encuentran fotografías de los ecotipos con mayor cantidad de suberina. En la fila II se encuentran los ecotipos con un cantidad media de suberina. En la fila III se encuentran los ecotipos con bajo contenido de suberina. Las imágenes demuestran una que existe una correlación entre el

contenido de suberina y la longevidad. A medida que el porcentaje de germinación se incrementa, mayor es la deposición de suberina en la empalizada de la cubierta.

### 5.5. Ensayo de permeabilidad de semillas.

Para el ensayo de permeabilidad de la cubierta se realizó utilizando sales de tetrazolio. La permeabilidad de la cubierta de las semillas se midió indirectamente a través del contenido de formazan de coloración rojiza que es el producto de la conversión de las sales de tetrazolio.

Las semillas de *Arabidopsis* han sido incubadas en una solución de sales de tetrazolio durante 96 horas (4 días). Después de haber obtenido los resultados se analizaron, y se determinó que existían ciertas incoherencias en los resultados (relación tratamiento de envejecimiento acelerado y contenido de suberina). Al intentar determinar la causa de que los resultados no coincidan, se vio como una posibilidad que las semillas de algunos ecotipos hayan perdido su viabilidad. Esta podría haber sido la causa de los resultados erróneos. En las zonas de necrosis o de tejidos muertos en semillas, el tetrazolio conserva su color blanco o incoloro, debido a que las enzimas que reducen el tetrazolio han sido desnaturalizadas o degradadas. Por lo tanto lo siguiente que hicimos fue realizar la siembra (*in vitro*) de todos los ecotipos sin ningún tratamiento y se pudo determinar que en semillas los ecotipos Cen-0, Cvi-0 y Enk-T el porcentaje de germinación era inferior al 50% (Figura 23). Llegando a la conclusión de que el origen de las incoherencias de los resultados ha sido la pérdida de la viabilidad.

Se esperaba que los resultados de los ecotipos con mayor longevidad fuesen los ecotipos con los valores más bajos en el ensayo de espectrofotometría. Considerando que la abundante cantidad de suberina en la cubierta, era la que otorgaba la impermeabilidad y por lo tanto mayor longevidad a la cubierta de la semilla. En los resultados los ecotipos Sha (absorbancia 1,424 MM y germinación 60%) y el ecotipo Nw-1 (absorbancia 1,206 MM y porcentaje de germinación 43%) (Figura 23). Estos resultados no concuerdan con los resultados del ensayo de permeabilidad ni longevidad. Al parecer en estos ecotipos la suberina no es el principal responsable de la longevidad. Las proantocianidinas, y los factores que se describen en la introducción de este trabajo, como también podría haber muchos otros relacionados con la longevidad de las semillas como ser el contenido de antioxidantes, RNA polimerasa, proteínas de almacenamiento de semillas y proteínas de choque térmico entre otras.

En los ecotipos Li 2:1 (absorbancia 0,144 MM y porcentaje de germinación 34%) y Er-0 (0,288 MM de absorbancia y 41% de germinación), los resultados obtenidos en los ensayo de suberina y longevidad si corresponden (Figura 23).



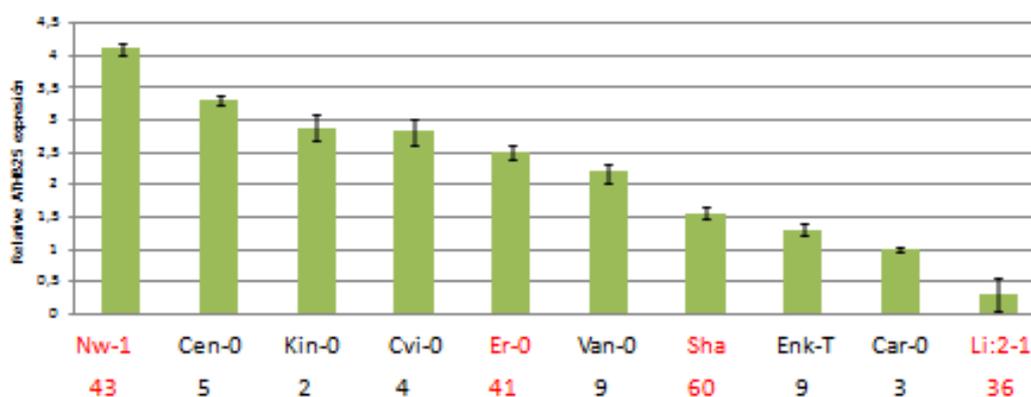
Ecotipo	Sha	Nw-1	Van-0	Kin-0	Cen-0*	Cvi-0*	Er-0	Enk-T*	Li 2:1
%Germin	60	43	3	9	4	5	41	2	34
Abs. 490 MM	1,424	1,206	1,031	0,954	0,318	0,286	0,288	0,270	0,144

**Figura 23. Absorción a 490MM de sales de tetrazolio reducidos a formazán.**

Resultados obtenidos del tratamiento de permeabilidad de la cubierta de la semilla con sales de tetrazolio. Ecotipos con el nombre en color rojo, corresponden a los ecotipos con mayor longevidad. Ecotipos con el nombre en color verde, corresponden a los ecotipos que perdieron viabilidad de las semillas. A la derecha los ecotipos con mayor permeabilidad después de 96 horas (4 días de tratamiento).

### 5.6. Nivel de expresión de los genes *ATHB25* y *COG1*.

En líneas transgénicas que tienen la sobreexpresión de los genes *ATHB25* y *COG1*, fue posible obtener semillas más longevas. Ambas líneas transgénicas tienen un mayor refuerzo en la cubierta de la semilla, por lo que consideramos como una posibilidad de que el elevado nivel de expresión de estos genes fueran los responsables de la longevidad de los ecotipos más longevas, por lo que se ha procedido a medir el nivel de expresión de estos dos genes en los distintos ecotipos en estudio. Según los resultados para el gen *ATHB25* solo en el ecotipo Nw-1 que pertenece al grupo de los cuatro ecotipos más longevas, se encontró un nivel de expresión 4 veces superior, que podía estar relacionado con la longevidad (Figura 24). En el resto de los ecotipos los niveles de expresión de estos dos genes no fueron relevantes (Figura 24 y Figura 25), por lo que los genes *ATHB25* y *COG1* no están implicados con la longevidad en los ecotipos de estudio.



**Figura 24. Nivel de expresión relativa del gen *ATHB25* en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.**

Los ecotipos y porcentajes de germinación (en la parte inferior) en rojo corresponden a los ecotipos con mayor porcentaje de germinación después del tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas en *Arabidopsis*.

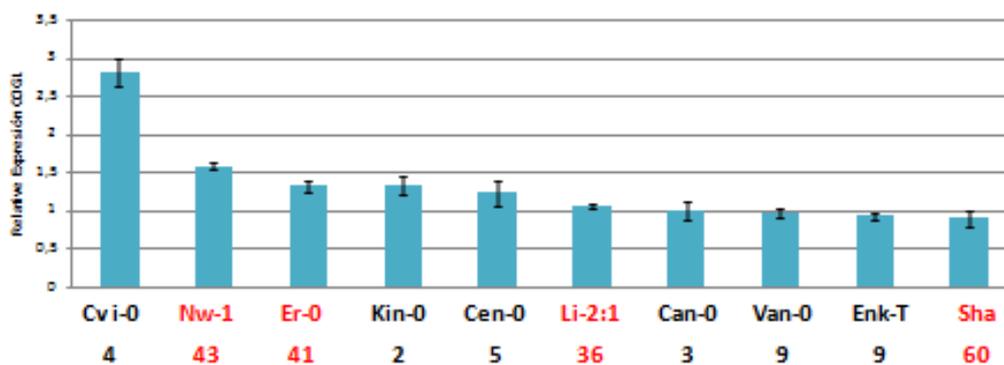


Figura 25. Nivel de expresión relativa del gen *COG1* en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*. Los ecotipos y porcentajes de germinación en color rojo corresponden a los ecotipos con mayor porcentaje de germinación, después del tratamiento de envejecimiento acelerado de semillas.

## 6. CONCLUSIONES:

- Se ha clonado el promotor del gen *pTT19* junto con los genes reportero GUS-GFP, en el plásmido pMDC32. Y se determinó que el gen *TT19* se expresa en la capa del endotelio en la chalaza y de la cubierta de la semilla, y durante las etapas pre-globular, globular y corazón.
- Los resultados demuestran que existe una fuerte variación natural en la longevidad en ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, lo que demuestran una fuerte variabilidad en todos los ecotipos de estudio. También se determinó que el ecotipo con mayor longevidad fue el ecotipo Sha que obtuvo el 60% de germinación y que tiene ausencia de mucílago en la cubierta, el ecotipo Enk-T logro el 2% de germinación después del tratamiento de envejecimiento acelerado.
- Según los resultados obtenidos en el ensayo con rojo de rutenio, existe cierta relación directa entre la ausencia de mucílago y la longevidad de semillas. El ecotipo Shakdara (sin mucílago) tiene un porcentaje de germinación de 17% más alto, en relación al ecotipo Nw-1 (poco mucílago). Por lo que es muy probable que desempeñe un papel en la retención de agua alrededor de la semilla, pero que aun falta demostrarlo.
- En los distintos ecotipos evaluados se pudo corroborar la relación directa de la permeabilidad con el contenido de suberina. Es probable que la permeabilidad al tetrazolio venga determinada por factores distintos a la permeabilidad al oxígeno. Esta última dependería de la suberina y determinaría la longevidad.
- Se determinó el nivel de mensajero mediante qRT-PCR de *ATHB25* y *COG1* en los distintos ecotipos seleccionados. Los niveles de expresión no correlacionaron con la longevidad de los ecotipos evaluados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- Alegria, J. M. I. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.*, 16(1), 10–11.
- Arc, E., Chibani, K., Grappin, P., Jullien, M., Godin, B., Cueff, G., ... Rajjou, L. (2012). Cold stratification and exogenous nitrates entail similar functional proteome adjustments during arabidopsis seed dormancy release. *Journal of Proteome Research*, 11(11), 5418–5432.
- Arc, E., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., Lounifi, I., Job, D., & Rajjou, L. (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: How quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics*, 11(9)
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 14:93-107
- 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. *The Plant Cell*, 19(1), 351–368.
- Bernal, F. S., & Chegue, E. (2010). La hambruna : un fenómeno digno del estudio de la sociología jurídica, 1–10.
- Bernards Mark A (2002) Demystifying suberin. *Canadian Journal of Botany*, , Vol. 80, No. 3 : pp. 227-240
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Aoyama, N., Chung, Y.-Y., Still, D. W., & Jones, R. L. (2007). The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology*, 143(3), 1173–1188.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids research* 7:1513-1525
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., ... Serrano, R. (2014). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for Gibberellins in seed longevity. *Plant Physiology*, 164(2), 999–1010.
- Burdett, B. (n.d.). Evitando el “monocultivo” del Help Desk.
- Clerkx, E. J. M., Blankestijn-De Vries, H., Ruys, G. J., Groot, S. P. C., & Koornneef, M. (2004). Genetic differences in seed longevity of various Arabidopsis mutants. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 448–461.
- Conway W., (1988). Can technology aid species preservation? En: *Biodiversity*. Wilson, E.O., ed., National. Academy Press, 263-268.
- Dean, G., Cao, Y., Xiang, D., Provart, N. J., Ramsay, L., Ahad, A., ... Haughn, G. (2011). Analysis of Gene Expression Patterns during Seed Coat Development in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 4(6), 1074–1091.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K. M., & Koornneef, M. (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(2), 403–414.

- Enstone, D. E., Peterson, C. A., & Ma, F. (2002). Root Endodermis and Exodermis: Structure, Function, and Responses to the Environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21(4), 335–351.
- Fao. (2011). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2010-11. Fao, 171.
- Goto, N., A. (1985) Mucilage Polysaccharide Secreted From Testa Of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Inf. Serv.* 22,1-4.
- Haughn, G. W., & Western, T. L. (2012). *Arabidopsis* Seed Coat Mucilage is a Specialized Cell Wall that Can be Used as a Model for Genetic Analysis of Plant Cell Wall Structure and Function. *Frontiers in Plant Science*, 3(April), 1–5.
- Haughn, G., & Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 10(10), 472–477.
- Holsters M, Dewaele D, Depicker A, Messens E, Vanmontagu M, Schell J (1978) Transfection And Transformation Of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular And General Genetics* 163: 181-187.
- Kipnusu, W. K., Katana, G., Migwi, C. M., Rathore, I. V. S., & Sangoro, J. R. (2009). Electrical Switching in Thin Films of Nandi Flame Seed Cuticles. *International Journal of Polymer Science*, 2009(December 2015), 1–10.
- Kitamura, S., Matsuda, F., Tohge, T., Yonekura-Sakakibara, K., Yamazaki, M., Saito, K., & Narumi, I. (2010). Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants. *Plant Journal*, 62(4), 549–559.
- Kitamura, S., Shikazono, N., & Tanaka, A. (2004). *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 37(1), 104–114. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01943.x>
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., & Caboche, M. (2006). Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 405–430.
- Macquet, A., Ralet, M.-C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A., & North, H. M. (2007). In situ, Chemical and Macromolecular Study of the Composition of *Arabidopsis thaliana* Seed Coat Mucilage. *Plant and Cell Physiology*, 48(7), 984–999.
- Maxted N., Ford-Lloyd B.V., Hawkes J.G. (1997). Complementary Conservation Strategies. En: *Plant Genetic Conservation*. Pp. 15-39.
- Mcneely J.A., Miller K.R., Reid W.V., Mittermeier R.A., Werner T.B. (1990). *Conserving The World Biological Diversity*. IUCN, WRI, CI, WWF-US, The World Bank, Gland, Suiza, 193 Pp.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J. B., & Pollard, M. (2009). Identification of an *Arabidopsis* Feruloyl-Coenzyme A Transferase Required for Suberin Synthesis. *Plant Physiology*, 151(3), 1317–1328.
- Muñoz L (2011). Obtención de mutantes tolerantes a ácido acético y estudio de las kinasas CRK29 y ARSK1 sobreexpresadas en condiciones de estrés ácido intracelular. *Trabajo Final de Carrera UPV-ETSIAMN*

- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A. J., Jenkins, G. I., Caboche, M., & Lepiniec, L. (2002). The TRANSPARENT TESTA16 Locus Encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS Domain Protein and Is Required for Proper Development and Pigmentation of the Seed Coat. *The Plant Cell Online*, 14(10), 2463–2479.
- Nguyen, T.-P., Cueff, G., Hegedus, D. D., Rajjou, L., & Bentsink, L. (2015). A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, erv348.
- Nguyen, T.-P., Keizer, P., van Eeuwijk, F., Smeekens, S., & Bentsink, L. (2012). Natural Variation for Seed Longevity and Seed Dormancy Are Negatively Correlated in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 160(4), 2083–2092.
- Oge, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., ... Grappin, P. (2008). Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 20(11), 3022–3037.
- Pedroni, L. Et Al. (2002). Biodiversidad: El Problema Y Los Esfuerzos Que Se Realizan En Centroamérica. Centro Agronómico Tropical De Investigación Y Enseñanza (CATIE).
- Penfield, S., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Tony, R., Penfield, S., ... Graham, a. (2014). Reserve Mobilization in the Arabidopsis Endosperm Fuels Hypocotyl Elongation in the Dark , Is Independent of Abscisic Acid , and Requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1 Larson and Han A . Graham Source : *The Plant Cell* , Vol . 16 , No . 10 ( Oct . , 20 , 16(10), 2705–2718.
- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., & Debeaujon, I. (2005). Transparent Testa10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell*, 17(11), 2966–2980.
- Rajjou, L., & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 796–805.
- Ranathunge, K., & Schreiber, L. (2011). Water and solute permeabilities of Arabidopsis roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 1961–1974.
- Saez-Aguayo, S., Rondeau-Mouro, C., Macquet, A., Kronholm, I., Ralet, M. C., Berger, A., ... North, H. M. (2014). Local Evolution of Seed Flotation in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, 10(3), 13–15. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004221>
- Sano, N., Rajjou, L., North, H. M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., & Seo, M. (2015). Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. *Plant and Cell Physiology*, (December), pcv186. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcv186>
- Sturm, a, & Lienhard, S. (1998). Two isoforms of plant RAD23 complement a UV-sensitive rad23 mutant in yeast. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 13(6), 815–21.
- Sugliani, M., Rajjou, L., Clercx, E. J. M., Koornneef, M., & Soppe, W. J. J. (2009). Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (abi3-5) and leafy cotyledon1-3 (lec1-3). *New Phytologist*, 184(4), 898–908.
- Sun, Y., Li, H., & Huang, J. R. (2012). Arabidopsis TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Molecular Plant*, 5(2), 387–400.

- TESNIER, K., STROOKMAN-DONKERS, H. M., VAN PIJLEN, J. G., VAN DER GEEST, A. H. M., BINO, R. J., & GROOT, S. P. C. (2002). A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Science and Technology*.
- Voiniciuc, C., Yang, B., Schmidt, M., Günl, M., & Usadel, B. (2015). Starting to Gel: How *Arabidopsis* Seed Coat Epidermal Cells Produce Specialized Secondary Cell Walls. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3452–3473.
- Walter K.S., Gillett H.J., (1998). IUCN Red List Of Threatened Plants. Compiled By The World Conservation Monitoring Center. IUCN - The World Conservation Union, Gland, 862 Pp.
- Wang, Y. Et Al. (n.d.) Molecular Cloning And Functional Characterization Of A Glutathione S - Transferase Involved In Both Anthocyanin And Proanthocyanidin Accumulation In *Camelina Sativa* (Brassicaceae). 11, 4711–4719.
- Weber, H., Borisjuk, L., & Wobus, U. (1996). Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: A role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal*.
- Windsor, J. B., Symonds, V. V., Mendenhall, J., & Lloyd, A. M. (2000). *Arabidopsis* seed coat development: Morphological differentiation of the outer integument. *Plant Journal*, 22(6), 483–493.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2), 485–493.
- Xu, W., Dubos, C., & Lepiniec, L. (2015). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB–bHLH–WDR complexes. *Trends in Plant Science*, 20(3), 176–185.
- Yadav, V., Molina, I., Ranathunge, K., Castillo, I. Q., Rothstein, S. J., & Reed, J. W. (2014). ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(9), 3569–88.
- Yang, X., Zhang, W., Dong, M., Boubriak, I. and Huang, Z. (2011) The achene mucilage hydrated in desert dew assists seed cells in maintaining DNA integrity: adaptive strategy of desert plant *Artemisia sphaerocephala*. *PLoS One* 6: e24346.