



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Identificación de genes implicados en la longevidad de semilla a partir de un GWAS y aproximación a sus mecanismos de acción

Trabajo de Fin de Máster en
Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Realizado por

Rubén Mateos Fernández

Dirigido por

Regina Niñoles Rodenes

José Gadea Vacas

Valencia, enero de 2019

ABREVIATURAS

ABA: Ácido abscísico	HR: <u>H</u> umedad <u>r</u> elativa
AA: <u>A</u> ccelerated <u>A</u> geing	HSP: <u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein
AMP: <u>A</u> ntimicrobial <u>p</u> eptide	LB: <u>L</u> ysogeny <u>b</u> roth
APX: Ascorbato peroxidasa	LEA: <u>L</u> ate <u>E</u> mbryogenesis <u>A</u> bundant
atm: Atmósfera	M: molar
ATP: Adenosín trifosfato	MAE: <u>M</u> OPS, <u>a</u> cetato de sodio y <u>E</u> DTA
CAT: Catalasa	MCFW: <u>M</u> oisture <u>C</u> ontent <u>F</u> resh <u>W</u> eight
cDNA: DNA complementario	MDHAR: monodehidroascorbato reductasa
CDT: <u>C</u> ontrolled <u>D</u> eterioration <u>T</u> reatment	mM: milimolar
ChIP Seq: Secuenciación de Inmunoprecipitación de la Cromatina	MOPS: Acido 3-(n-Morfolino)- Propanosulfónico
CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio	mRNA: RNA mensajero
Col-0: Columbia 0	MS: <u>M</u> urashige- <u>S</u> koog
C-: Control negativo	MSR: metionina sulfóxido reductasa
dATP: desoxiadenosina trifosfato	MST: β -mercaptopiruvato sulfurotransferasa
DHAR: Dehidroascorbato reductasa	NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido
DMSO: dimetilsulfóxido	NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
DNA: ácido desoxirribonucleico	PA: Proantocianidina
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato	PCI: fenol -cloroformo - alcohol isoamílico
DOF: <u>D</u> NA- <u>B</u> inding <u>O</u> ne <u>Z</u> inc <u>F</u> inger	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Dpp: Días después de la polinización	PEG: polietilenglicol
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PIMT: L-isoaspartil <i>o</i> -metiltransferasa
EPPO: <u>E</u> levated <u>P</u> artial <u>P</u> ressure of <u>O</u> xygen	p/v: peso/volumen
For: cebador sentido forward o directo	QTL: <u>Q</u> uantitative <u>T</u> rait <u>L</u> ocus
GR: Glutación reductasa	Rev: cebador sentido reverse o reverso
GSH: Glutación en forma reducida	RNA: ácido ribonucleico
GSSG: Glutación en forma oxidada	RNASeq: secuenciación del RNA
GWAS: <u>G</u> enome <u>W</u> ide <u>A</u> ssociation <u>S</u> tudy	ROF: Oligosacárido de la familia de la rafinosa
HA: <u>H</u> uman <u>i</u> nfluenza <u>h</u> emagglutinin	

ROS: *Reactive Oxygen Species*

Rpm: revoluciones por minuto

RT PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SDS: dodecil sulfato sódico

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

T_m: Temperatura de melting

UV: ultravioleta

v/v: volumen/volumen

wt: (*wild type*): silvestre

μM: micromolar

SOD: Superóxido dismutasa

SSP: *Seed Storage Protein*

TAE: Tris/acetate/EDTA

TBE: Tris/borate/EDTA

T-DNA: *transfer DNA*

RESUMEN

La longevidad de la semilla es una propiedad crucial para el mantenimiento de la diversidad genética de las plantas en la naturaleza y en bancos de semillas, así como para el almacenamiento de semillas de uso agrícola. Las semillas van perdiendo gradualmente viabilidad durante el almacenamiento, y la velocidad de envejecimiento depende de factores tanto ambientales como genéticos. Entre los factores ambientales de mayor relevancia para el deterioro de las semillas se encuentran la humedad, la temperatura y la concentración de oxígeno, que provocan ROS y, en consecuencia, estrés oxidativo.

Para llegar a la identificación de los genes implicados en este proceso, se realizó previamente un análisis de asociación de genoma completo (GWAS), sometiendo semillas de unas 300 accesiones naturales de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* a altas presiones de oxígeno durante meses. Los resultados del GWAS permitieron así la identificación de 4 regiones genómicas con SNPs significativamente asociados a la longevidad de semillas, a partir de las cuales se seleccionaron genes candidatos a estar involucrados en dicho carácter. El presente trabajo tiene como objetivos la identificación de los genes con una aportación relevante a la longevidad de entre los genes candidato, así como iniciar su posterior caracterización funcional.

Los resultados del trabajo han permitido identificar dos genes con un papel relevante en la longevidad de semillas. Por un lado, el gen codificante para la dehidroascorbato reductasa 1 (*DHAR1*), implicado en el ciclo detoxificador de ROS del glutatión-ascorbato. Los mutantes de pérdida de función de *DHAR1*, así como de *DHAR2*, *DHAR3* y sus dobles y triples mutantes, mostraron mayor sensibilidad a los tratamientos de envejecimiento acelerado, mostrando la necesidad del correcto funcionamiento del ciclo para maximizar la longevidad de las semillas. Por otro lado, el gen codificante para el factor de transcripción DOF4.1, cuyos mutantes de pérdida de función mostraron mayor resistencia a los tratamientos de envejecimiento acelerado pero no a otros tratamientos de estrés abiótico realizados durante el establecimiento de la plántula. El fenotipo de tolerancia a envejecimiento de semilla del mutante podría explicarse por la inducción de genes que codifican para *Seed Storage Proteins* (SSPs), observada gracias al análisis RNASeq de las semillas de mutante y *wild type*. Estas proteínas podrían contribuir al fenotipo al aportar los nutrientes necesarios para la germinación o por reducir el daño oxidativo a proteínas que se produce durante el almacenamiento de la semilla, tal y como se describe en Nguyen *et al.*, 2015.

Palabras clave: longevidad, semilla, envejecimiento, GWAS, estrés oxidativo, DOF, DHAR.

ABSTRACT

Seed longevity is a crucial characteristic for the maintenance of genetic diversity of plants in nature and in seed banks, as well as for the seed storage for agricultural use. Seeds gradually lose viability during storage, and the speed of their deterioration depends on both environmental and genetic factors. Among the most relevant environmental factors for seed deterioration are humidity, temperature and oxygen concentration, which cause ROS and, consequently, oxidative stress.

In order to identify genes involved in this process, a “Genome Wide Association Study” (GWAS) was previously performed, exposing seeds from about 300 natural accessions of the *Arabidopsis thaliana* model plant to high oxygen pressures for months. The results of the GWAS allowed the identification of 4 genomic regions with SNPs, that were significantly associated with the longevity of seeds. From these genomic regions, candidate genes supposed to be involved in that character were selected. The objectives of this work are to identifying, among these candidate genes, those with a relevant contribution to seed longevity, and starting their subsequent functional characterization.

The results of this work have allowed the identification of two genes with a relevant role in seed longevity. On the one hand, the gene coding for dehydroascorbate reductase 1 (*DHAR1*), involved in the glutathione-ascorbate ROS detoxification cycle. Loss of function mutants of *DHAR1*, as well as *DHAR2*, *DHAR3* and its double and triple mutants, showed increased sensitivity to accelerated aging treatments, showing the importance of the cycle for seed longevity. On the other hand, the gene coding for the DOF4.1 transcription factor, whose loss-of-function mutants showed increased resistance to accelerated aging treatments but not to other abiotic stress performed during the establishment of the seedling. The seed tolerance phenotype of the mutant could be explained by the induction of genes coding for Seed Storage Proteins (SSPs), observed through the RNASeq analysis of mutant and wild type seeds. These proteins could contribute to the phenotype by providing the nutrients necessary for germination or by reducing the oxidative damage to proteins that occurs during seed storage, as described in Nguyen et al., 2015.

Keywords: longevity, seed, aging, GWAS, oxidative stress, DOF, DHAR

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Longevidad de semilla: concepto e importancia	1
1.2. Efectos del envejecimiento de semilla a nivel molecular	2
1.3. Mecanismos implicados en la longevidad de la semilla.....	3
1.3.1. Mecanismos de protección	3
1.3.1.1. La cubierta.....	3
1.3.1.2. <i>Glassy state</i>	4
1.3.1.3. Mecanismos antioxidantes pasivos.....	4
1.3.2. Mecanismos de detoxificación y reparación	5
1.4. Trabajos previos de mejora de la longevidad de la semilla.....	6
1.4.1. Ejemplos relacionados con mejora de la cubierta	7
1.4.2. Ejemplos relacionados con enzimas antioxidantes.....	7
1.4.3. Ejemplos relacionados con la reparación de daño en proteínas y ácidos nucleicos	7
1.5. Métodos para el estudio de la longevidad de semilla.....	8
1.5.1. <i>Genome Wide Association Studies</i> (GWAS) para el estudio de la longevidad de semilla	9
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Material biológico	11
3.1.1. Material vegetal: <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.1.2. <i>Escherichia coli</i>	11
3.1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
3.1.4. Vectores de transformación.....	12
3.2. Medios de cultivo y solución nutritiva	12
3.2.1. Medios de crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
3.2.1.1. Medios de cultivo	12
3.2.1.2. Solución nutritiva	13
3.2.2. Medios de crecimiento de bacterias	13
3.2.2.1. Medio LB	13
3.3. Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
3.3.1. Esterilización de semillas	13
3.3.1.1. Esterilización con etanol.....	13
3.3.1.2. Esterilización con gas cloro.....	13

3.3.2.	Cultivo <i>in vitro</i> –medio sólido-	14
3.3.3.	Cultivo en invernadero	14
3.3.4.	Recolección y almacenamiento de semillas	14
3.3.5.	Transformación de <i>A. thaliana</i> mediada <i>A. tumefaciens</i>	14
3.4.	Manipulación y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	15
3.4.1.	Transformación de células competentes mediante choque térmico	15
3.5.	Manipulación y crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.5.1.	Transformación mediante choque térmico	16
3.6.	Purificación y manipulación de ácidos nucleicos.....	16
3.6.1.	Aislamiento de DNA genómico de <i>A. thaliana</i>	16
3.6.2.	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	16
3.6.3.	Electroforesis de DNA	16
3.6.4.	Aislamiento y purificación de RNA de <i>A. thaliana</i>	17
3.6.5.	Electroforesis de RNA.....	18
3.6.6.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
3.6.6.1.	Oligonucleótidos cebadores.....	18
3.6.6.2.	Condiciones de PCR.....	18
3.6.6.3.	PCR diagnóstica	19
3.6.6.4.	RT-PCR semicuantitativa.....	19
3.6.6.5.	RT-PCR cuantitativa	20
3.6.6.6.	RNASEq.....	20
3.6.6.7.	Obtención de la construcción pUB:DOF:2xHA.....	21
3.7.	Caracterización fenotípica de los mutantes	21
3.7.1.	Ensayos de envejecimiento acelerado de la semilla	21
3.7.1.1.	Envejecimiento acelerado por elevada presión de oxígeno (EPPO)	21
3.7.1.2.	Envejecimiento acelerado por Controlled Deterioration Treatment (CDT)	22
3.7.2.	Ensayos de aparición de cotiledones verdes en diferentes medios.....	22
3.7.3.	Medida de la permeabilidad de la cubierta de la semilla.....	22
3.7.3.1.	Tinción de la capa de suberina	22
3.7.3.2.	Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio	23
4.	RESULTADOS	24
4.1.	Antecedentes	24
4.2.	Ensayos iniciales para seleccionar líneas mutantes homocigotas	26
4.3.	Rastreo de candidatos mediante envejecimiento acelerado.....	27
4.4.	Genes seleccionados.....	30

4.4.1.	Estudio del papel del gen At4g01700, codificante para una proteína de la familia de las quitinasas, en la longevidad de la semilla	30
4.4.1.1.	Confirmación de la pérdida de función del gen At4g01700 en el mutante S9	30
4.4.1.2.	Confirmación del fenotipo.....	31
4.4.1.2.1.	Confirmación mediante EPPO con humedad baja	31
4.4.1.2.2.	Confirmación mediante CDT	31
4.4.2.	Estudio del papel de las DHAR en la longevidad de la semilla	33
4.4.2.1.	Confirmación de la pérdida de función del gen <i>DHARI</i>	33
4.4.2.2.	CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO	34
4.4.2.2.1.	Confirmación mediante EPPO con humedad baja	34
4.4.2.2.2.	Confirmación mediante EPPO con humedad muy baja	35
4.4.2.2.3.	Confirmación mediante CDT	36
4.4.3.	Estudio del papel del factor de transcripción DOF4.1 en la longevidad de la semilla	38
4.4.3.1.	Confirmación de la pérdida de función del gen <i>DOF4.1</i>	41
4.4.3.1.1.	Confirmación de la pérdida de función del gen en el mutante <i>dof4.1-1</i>	41
4.4.3.1.2.	CONFIRMACIÓN DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DEL MUTANTE <i>dof4.1-3</i>	43
4.4.3.2.	CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO	44
4.4.3.2.1.	Confirmación mediante EPPO con humedad baja	44
4.4.3.2.2.	Confirmación mediante EPPO con humedad muy baja	45
4.4.3.2.3.	Confirmación mediante CDT	46
4.4.3.3.	Análisis de la expresión del gen <i>DOF4.1</i>	46
4.4.3.4.	Caracterización fenotípica de los mutantes <i>dof4.1</i>	48
4.4.3.4.1.	Ensayo de aparición de cotiledones verdes ante diferentes condiciones estresantes del medio	48
4.4.3.4.2.	Estudio de la permeabilidad de la cubierta de la semilla.....	49
4.4.3.4.2.1.	Tinción de la capa de suberina	49
4.4.3.4.2.2.	Medida de la permeabilidad a las sales de tetrazolio.....	50
4.4.3.5.	Análisis transcriptómico.....	51
4.4.3.6.	Generación de herramientas para ensayos posteriores	56
5.	DISCUSIÓN.....	57
5.1.	Empleo del tratamiento EPPO como método de envejecimiento acelerado.....	57
5.2.	La proteína de la familia de las quitinasas (CFP) no participa en la longevidad de semilla en <i>A. thaliana</i>	58
5.3.	La expresión de la dehidroascorbato reductasa 1 (<i>DHARI</i>) es necesaria para mantener una correcta longevidad de la semilla en <i>A. thaliana</i>	59
5.4.	El factor de transcripción DOF4.1 juega un papel relevante en la longevidad de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	59

6.	CONCLUSIONES.....	64
7.	REFERENCIAS.....	65

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Longevidad de semilla: concepto e importancia

Las semillas son el principal vector de propagación genética del que dispone la planta. Son unidades diseminativas individuales que pueden mantener la viabilidad durante largos períodos sin sufrir cambios genéticos hasta recibir los estímulos que desencadenen la germinación. Desde el punto de vista agrícola y ornamental, pero también ecológico y de conservación, resulta de gran interés disponer de material vegetal para propagar y reproducir las diferentes especies. Aunque existen diversos métodos de conservación de estos recursos fitogenéticos *in situ*, la conservación *ex situ* se plantea como una estrategia más económica y de mayor accesibilidad. Por estas características intrínsecas, así como por su pequeño tamaño, las semillas suponen uno de los modelos más idóneos para la conservación *ex situ* (Pita Villamil y Martínez Laborde, 2001), conformando los denominados bancos de semillas. Asimismo, las semillas juegan un importante papel en la alimentación humana, constituyendo la principal fuente de alimento para el hombre (<http://www.fao.org/faostat/es/#data/FBS>).

Desafortunadamente para estas aplicaciones humanas, una de las principales limitaciones del almacenamiento de las semillas es su gradual pérdida de viabilidad, el denominado *natural aging* o envejecimiento natural. De modo que se denomina longevidad de la semilla, al período de tiempo que la semilla puede mantener su viabilidad, su potencial de germinación y establecimiento de la plántula. Es durante la última etapa del desarrollo de la semilla, en la maduración, cuando ésta adquiere progresivamente las características que determinan su longevidad, después de adquirir la tolerancia a la desecación (Verdier *et al.*, 2013). Se ha visto que los factores que más influyen en la longevidad durante el almacenamiento son el contenido en agua de la semilla, la humedad relativa ambiental, la temperatura y la presión de oxígeno (Groot *et al.*, 2012; Sano *et al.*, 2016), además del propio genotipo de la semilla (Bekker *et al.*, 2003).

En vista del comportamiento que muestran las semillas de diferentes especies vegetales frente a su conservación y longevidad, se distingue entre semillas ortodoxas, las cuales son capaces de mantener su viabilidad al reducir su contenido en humedad hasta alrededor del 5-10%, y semillas recalcitrantes, que ven reducida drásticamente su viabilidad al deshidratarse por debajo del 30% de humedad y por tanto, están adaptadas a germinar poco tiempo después de su dispersión.

En los bancos de semillas, las semillas ortodoxas se almacenan a temperaturas entre 0 y 5°C, y con humedad relativa cercana al 7-8%, para favorecer lo más posible un ambiente que maximice su longevidad. Aun así, en estas instalaciones es necesario un control periódico de la viabilidad de las

semillas ahí almacenadas y una cierta reposición cuando desciende por debajo de un límite, ya que incluso en esas condiciones favorables van sufriendo envejecimiento.

1.2. Efectos del envejecimiento de semilla a nivel molecular

Durante el tiempo de almacenamiento y antes de la germinación, las semillas se ven sometidas a estreses de tipo biótico y abiótico. Entre los estreses abióticos destacan la elevada humedad y temperatura o la acción del oxígeno atmosférico, que pueden deteriorar sus componentes y poner por tanto en peligro su viabilidad (Figura 1). Asimismo, el DNA puede sufrir daño a causa de la luz UV (Sano *et al.*, 2016) y la cubierta también puede sufrir deterioros físicos resultando en roturas tras estreses mecánicos. La mayor parte de estos estreses provocan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) en las células vegetales, que son las causantes de gran parte del daño a las semillas durante el envejecimiento (Bailly and Bailly, 2004).

Mediante la unión de 1-2 electrones adicionales a un átomo de oxígeno, se van formando sucesivas ROS de incrementada toxicidad como el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$), ión radical superóxido ($\text{O}_2^- \cdot$), radical perhidroxilo ($\text{HO}_2 \cdot$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\text{HO} \cdot$), y otras. El peróxido de hidrógeno puede difundir a través de las membranas, a cierta distancia desde el sitio de producción (Bienert *et al.*, 2007) y, junto con radicales superóxido en las llamadas reacciones Haber-Weiss & Fenton, dan lugar al radical hidroxilo, la especie ROS más tóxica junto con el oxígeno singlete (Bailly and Bailly, 2004). Si bien estas moléculas son producidas de manera normal en el metabolismo celular, tanto en mitocondrias como en cloroplastos, peroxisomas e incluso en apoplasto, su acumulación excesiva, incrementada como respuesta al estrés, es lo que las convierte en componentes tóxicos para la semilla (Kerchev *et al.*, 2015)

Las ROS son dañinas a varios niveles ya que son capaces de oxidar e inactivar el DNA, los lípidos y las proteínas, induciendo disfunciones celulares, llevando a un desequilibrio en el estado redox y causando el denominado estrés oxidativo (Ratajczak *et al.*, 2015). Por un lado, pueden reaccionar con los lípidos de tipo ácido graso poliinsaturado provocando peroxidación lipídica (Wilson and McDonald, 1986). Este proceso resulta especialmente peligroso al degradar lípidos de reserva en las semillas o lípidos de membrana. La oxidación de estos últimos altera la integridad de membrana afectando a los procesos de transporte a través de ella y provocando la "salida de iones" o *ion leakage*. Por otro lado, el DNA, tanto nuclear como el presente en orgánulos, es diana igualmente de estas ROS, ya que el radical hidroxilo puede reaccionar con las desoxirribosas, o bien pueden producirse modificaciones de las bases nitrogenadas por parte de las ROS (Bray and West, 2005). A nivel proteico, ciertas enzimas pueden ser desactivadas por las ROS, tras alterarse los aminoácidos del sitio activo a causa de la oxidación (carbonilación proteica) (Rajjou *et al.*, 2008). También otras proteínas

como los transportadores, canales o receptores pueden ser dañados por el efecto tóxico de una acumulación de ROS, ocasionando disfunciones celulares.

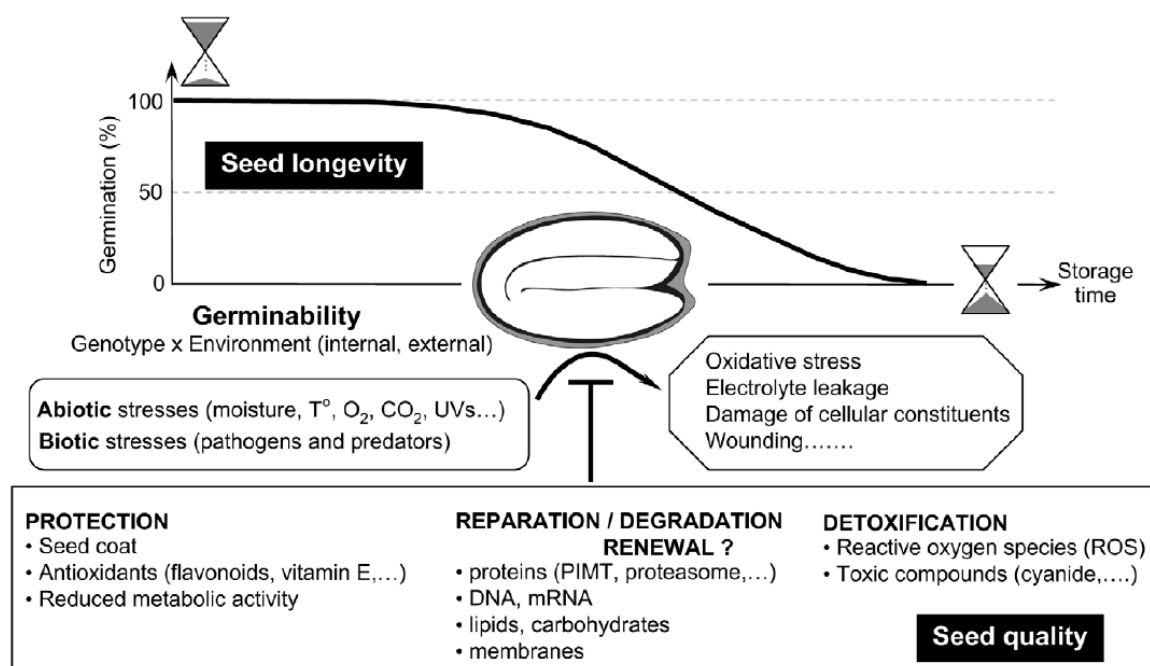


Figura 1. Representación esquemática del proceso de envejecimiento de la semilla. Se representa la viabilidad de la semilla decreciente respecto al tiempo de almacenamiento, con las posibles causas (en bordes redondeados), algunos efectos del envejecimiento a nivel molecular (en la figura octogonal) y algunos mecanismos de los que dispone la semilla para afrontar ese descenso (en figura rectangular). Tomado de Rajjou and Debeaujon (2008).

1.3. Mecanismos implicados en la longevidad de la semilla

1.3.1. Mecanismos de protección

1.3.1.1. La cubierta

La cubierta o testa de la semilla, de origen materno, actúa como la principal defensa o barrera natural para el embrión. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, esta cubierta desarrolla 5 capas celulares distinguibles. Del interior al exterior, se aprecia primero el endotelio, cuyas células acumulan proantocianidinas (PA) en sus vacuolas, que al oxidarse aportan un color pardo a la semilla (Debeaujon, 2003). A continuación, se localizan dos capas de integumento interno, seguidas por dos capas de integumento exterior llamadas palizada y epidermis. Las células de la palizada forman la capa de suberina, un tipo de poliéster insoluble que actúa como barrera impermeable ante el agua, el flujo de gases y los patógenos (Pollard *et al.*, 2008). En cuanto a la epidermis, sus células secretan al apoplasto un polisacárido basado en pectinas, el denominado mucílago, formando una cápsula gelatinosa que presenta aparentemente funciones diversas como la de barrera de protección adicional, funcionar como ayuda en el momento de la germinación al hidratarse rápidamente o participar en el

proceso de diseminación (Western *et al.*, 2000). Como parte de las últimas etapas del desarrollo de la semilla, las células de la cubierta sufren un proceso de muerte celular programada y posterior compresión, por lo que en las semillas maduras y secas la cubierta está muerta (Haughn and Chaudhury, 2005).

Las funciones de la cubierta no solo se limitarían a su papel como barrera física como se ha comentado, sino que también protegería de las fluctuaciones de humedad y temperatura durante el almacenamiento. Asimismo, se ha determinado su función de reserva de proteínas activas (enzimas hidrolíticas) y metabolitos necesarios para la germinación y viabilidad de la nueva planta, que se liberarían tras la hidratación. Su almacenamiento en la cubierta ayudaría a incrementar la longevidad de la semilla (Raviv *et al.*, 2017). Además, también es de gran importancia el papel de la cubierta en la imposición de la dormancia, previniendo la germinación prematura.

1.3.1.2. *Glassy state*

Para resistir al almacenamiento durante largos períodos de tiempo, y como parte de su desarrollo, las semillas ortodoxas deben sufrir un proceso de desecación, que a su vez precisa de la puesta en marcha de mecanismos protectores a nivel celular para soportar la baja disponibilidad de agua. Entre estos mecanismos se encuentra la reducción de la actividad metabólica hasta un estado quiescente. Para ello, el citoplasma de las células de la semilla se transforma hasta alcanzar un estado denominado “*glassy state*” (Buitink *et al.*, 2000). Éste supone un estado de gran viscosidad, en el que existe una reducida difusión molecular y, por ello, disminuye la probabilidad de que ocurran reacciones químicas al igual que se previene la fusión de vesículas adyacentes y de proteínas desnaturalizadas, y se mantienen los lípidos en un cierto estado de fluidez (Buitink and Leprince, 2008). El mencionado *glassy state* se alcanza principalmente gracias a las propiedades físico-químicas de ciertos azúcares no reductores, como la sucrosa y los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (ROFs), así como al grupo de proteínas altamente hidrofílicas LEA (del inglés, *Late Embryogenesis Abundant*), junto con las bajas temperaturas y la pérdida de agua en la desecación (Sano *et al.*, 2016).

1.3.1.3. **Mecanismos antioxidantes pasivos**

A este grupo pertenecen moléculas de naturaleza no enzimática que actúan como antioxidantes. Así, se distinguen metabolitos como la vitamina E, el glutatión, el ascorbato y los flavonoides, y también proteínas de reserva de semilla (en inglés, *Seed Storage Proteins* o SSPs).

La vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), presenta un papel protector importante, ya que actúa previniendo la peroxidación lipídica. Mutantes en genes implicados en la síntesis de vitamina E (*vte1* y *vte2*) mostraron de hecho menor longevidad (Sattler *et al.*, 2013).

El glutatión y el ascorbato tienen un papel fundamental en el ciclo detoxificante Glutatión-Ascorbato en el cual participan igualmente diversas enzimas que se explican en el apartado siguiente. El glutatión en forma reducida (GSH) actúa como tampón redox, manteniendo un equilibrio reducción-oxidación adecuado en la semilla.

Los flavonoides antioxidantes de la cubierta, como las PAs, pueden actuar detoxificando las ROS y por tanto ayudando a reducir el estrés oxidativo (Treutter, 2006). En *Arabidopsis*, existen flavonoides presentes además en el embrión, como los flavonoles, con funciones similares de detoxificación de ROS y también de limitación de la peroxidación lipídica (Stevenson and Hurst, 2007).

Por último, también cabe destacar la acción de las proteínas de reserva de semilla (SSP del inglés *Seed Storage Proteins*) dado que, al menos las cruciferinas, actúan amortiguando el estrés oxidativo causado a proteínas (Nguyen *et al.*, 2015). Debido a su gran abundancia en semillas y su afinidad por la oxidación, las SSP son carboniladas en lugar de otras proteínas celulares, asegurando así la supervivencia del embrión y por tanto la longevidad de la semilla.

1.3.2. Mecanismos de detoxificación y reparación

Los mecanismos de detoxificación y reparación se activan una vez que las semillas son embebidas, cuando el citoplasma de las células de la semilla abandona el estado *glassy state* recobrando un estado con el metabolismo es reactivado. (Sano *et al.*, 2016).

Una parte importante de este grupo la conforman las enzimas pertenecientes al ciclo de detoxificación de ROS del glutatión-ascorbato (Figura 2). El peligroso radical superóxido es detoxificado siguiendo una serie de reacciones enzimáticas catalizadas por las superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT), ascorbato peroxidasas (APX), monodehidroascorbato reductasas (MDHAR), dehidroascorbato reductasas (DHAR), y glutatión reductasas (GR) (Figura 2). Gracias a dicho ciclo, se mitigan los efectos oxidantes de las ROS a cambio de oxidar metabolitos como el ascorbato o el glutatión (GSH), que luego son regenerados en el ciclo, siendo el NADPH el donante final de electrones. De hecho, la proporción de glutatión oxidado (GSSG) respecto al reducido es indicativo de la viabilidad celular, y sirve también por tanto para monitorizar el envejecimiento de la semilla (Kranter *et al.*, 2006).



Figura 2. Esquema simplificado del ciclo detoxificador de glutatión-ascorbato. Sin rodear se representan los sustratos y productos principales que participan en el ciclo y rodeadas, las enzimas del ciclo. Modificado de Teixeira *et al.* (2005).

Por otro lado, en los procesos de detoxificación cuenta asimismo con un papel importante la enzima β -mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST), encargada de transformar cianuros de la semilla en compuestos menos tóxicos. Se ha visto que el control de la acumulación de estos cianuros es vital en la fisiología de la semilla y con ello en su longevidad (Rajjou and Debeaujon, 2008).

En cuanto a los mecanismos de reparación de daños, se pueden distinguir entre los que reparan daños en las proteínas, en el DNA y en el RNA. Aunque en la germinación se produce una biosíntesis *de novo* de proteínas a partir de mRNAs almacenados en la semilla, también se lleva a cabo una reparación de las proteínas ya sintetizadas almacenadas antes de la desecación. Los residuos de metionina oxidados a sulfóxido de metionina como consecuencia del envejecimiento son reparados por las metionina sulfóxido reductasas (MSR) (Weissbach *et al.*, 2005). Cuando la oxidación afecta a los residuos de aspártico y asparagina, estos son reparados por las L-isoaspartil *O*-metiltransferasas (PIMT), enzimas dependientes de adenosil metionina (Mudgett *et al.*, 1997). Por otro lado, chaperonas como las proteínas de choque térmico (del inglés, *Heat Shock Proteins* o HSPs) son importantes para el correcto replegamiento de las proteínas mal plegadas durante el almacenamiento, así como para la estabilización de las proteínas *de novo* sintetizadas tras la imbibición (Job, 2005; Sano *et al.*, 2016). Existen asimismo numerosos mecanismos de reparación de daños en los ácidos nucleicos. Un ejemplo sería el mecanismo llevado por las DNA glicosilasas, en colaboración con DNA polimerasas y DNA ligasas, que eliminan bases nitrogenadas modificadas del DNA durante el envejecimiento, sustituyéndolas por las correctas (Biedermann *et al.*, 2011). Mutantes de pérdida de función de las DNA ligasas 4 y 6 mostraron elevada sensibilidad al envejecimiento, al no ser capaces de mantener la integridad genómica (Waterworth *et al.*, 2010).

1.4. Trabajos previos de mejora de la longevidad de la semilla

Gracias al conocimiento creciente sobre los mecanismos que influyen en la longevidad de la semilla, se han logrado numerosos eventos transgénicos que presentan una incrementada longevidad, ya sea por la introducción de nuevos genes implicados en dichos mecanismos, como por la modificación de la expresión de los genes propios de la planta.

1.4.1. Ejemplos relacionados con mejora de la cubierta

El mencionado papel de barrera impermeable que cumple la cubierta de la semilla contribuye en gran medida a su longevidad. De hecho, la sobreexpresión del gen *COGWHEEL1* (*COG1*), codificante para un factor de transcripción de tipo DOF, presenta una mayor capa de suberina en sus semillas y estas son más longevas (Bueso *et al.*, 2016). Similar fenotipo de mayor tolerancia al envejecimiento mostraron semillas sobreexpresando el gen *HB25*, presentando estas una cubierta reforzada con más cantidad de mucílago (Bueso *et al.*, 2014).

1.4.2. Ejemplos relacionados con enzimas antioxidantes

Uno de ellos es la sobreexpresión de los genes codificantes para la Cu/Zn-superóxido dismutasa (*CuZnSOD*) y ascorbato peroxidasa (*APX*), pertenecientes al anteriormente explicado ciclo de detoxificación glutatión-ascorbato, que en semillas de tabaco confirmó una mayor longevidad que en semillas *wild type* (*wt*) (Lee *et al.*, 2010). También existen trabajos de mejora de la tolerancia al estrés oxidativo, muy ligado al envejecimiento. Por ejemplo la sobreexpresión en semilla de *Arabidopsis* de los genes codificantes para la Mn-superóxido dismutasa (*MSDI*), la catalasa (*CAT1*) y para una enzima de síntesis de tocoferol (*HPT1*) mostró dicha mayor tolerancia (Xi *et al.*, 2010).

1.4.3. Ejemplos relacionados con la reparación de daño en proteínas y ácidos nucleicos

La reparación del daño a nivel proteico resulta de enorme importancia en la longevidad. Ejemplo de ello lo representa la sobreexpresión del gen *PIMT1*, codificante para la L-isoaspartil O-metiltransferasa 1, mencionado anteriormente, que resultó en una mejora de la longevidad de semilla y del vigor germinativo en *Arabidopsis* (Oge *et al.*, 2008). Asimismo, semillas de *Arabidopsis* sobreexpresando los genes *PIMT1* o de *PIMT2* de garbanzo mostraron una notable menor sensibilidad al envejecimiento (Verma *et al.*, 2013). También en la línea de la protección de proteínas, se ha comprobado que una mayor acumulación de HSPs mejora la longevidad en semillas de girasol, promovida por la sobreexpresión del gen para el factor de transcripción *HaHSFA9* (Prieto-Dapena *et al.*, 2006).

Por otro lado, relacionado con los mecanismos de reparación del DNA, la sobreexpresión del gen codificante para la enzima bifuncional DNA glicosilasa/AP liasa (*AtOGG1*) en *Arabidopsis*

resultó en una mayor longevidad ante tratamientos de envejecimiento acelerado (Huhui Chen *et al.*, 2012).

1.5. Métodos para el estudio de la longevidad de semilla

Como se ha explicado anteriormente, las semillas pierden viabilidad durante su almacenamiento (envejecimiento natural). Dependiendo de la especie estudiada, puede ser meses o incluso años. En *Arabidopsis thaliana* son necesarios 3 años para que el 50% de las semillas pierdan su viabilidad. Por lo tanto, debido al largo período de tiempo que supondría la evaluación de este fenotipo de envejecimiento natural han ido emergiendo distintos métodos alternativos de envejecimiento acelerado de las semillas con el fin de acortar el proceso. La mayoría de ellos comparten el empleo de elevada humedad junto elevada temperatura como factores clave para el deterioro de la semilla. Aunque existe gran controversia en la nomenclatura de los diferentes métodos descritos, en el presente trabajo se utilizará la establecida por *The International Seed Testing Association* (ISTA) (ISTA, 2018)

El método más extendido y aceptado es el denominado *Controlled Deterioration Treatment* (CDT). En este método de envejecimiento acelerado, las semillas se someten a temperaturas altas (37-40°C) a la par que a elevada humedad relativa (HR) (75-85%) en el interior de una cámara que mantenga estas condiciones de manera controlada. En este caso, el contenido en humedad de la semilla o *Moisture Content Fresh Weight* (MCFW) rondará el 20%.

Por otro lado, algunos autores optan por la inmersión completa en agua de las semillas, aplicando al mismo tiempo elevadas temperaturas. Este método se ha denominado como *seed deterioration* (Tejedor-Cano *et al.*, 2010), pero su nomenclatura estándar sería *accelerated ageing* (AA).

Por último, ciertos autores critican que las condiciones de elevada temperatura y contenido en agua que se establecen habitualmente en los ensayos de envejecimiento sean mucho mayores que las del almacenamiento en seco que se lleva a la práctica en los bancos de semillas, en el almacenamiento comercial o incluso durante el envejecimiento natural. Por tanto, sostienen que las condiciones de dichos ensayos no imitan tan bien las condiciones de envejecimiento a nivel práctico (Groot *et al.*, 2012). Ante esta discusión, surge el envejecimiento acelerado mediante elevada presión parcial de oxígeno (en inglés, *Elevated Partial Pressure of Oxygen* o EPPO) que pretende acortar los tiempos necesarios para envejecer las semillas manteniendo condiciones de temperatura y humedad más similares a las reales. Se demostró la mayor similitud de las condiciones del ensayo EPPO con el *natural aging* que el CDT tras una comparación del mapeo de QTLs obtenido entre CDT, EPPO y *natural aging* en cebada (Nagel *et al.*, 2016), También, otro grupo, aplicando 180 bares de presión

relativa de oxígeno a granos de cebada, semillas de col, de lechuga y de soja, en pocas semanas consiguió resultados positivos de envejecimiento acelerado (Groot *et al.*, 2012). Además, usando como control la medida de tocoferol en las semillas, comprobaron que sus niveles en semilla seca disminuían. De igual manera, estos resultados se ajustaban más a los del envejecimiento natural, mientras que tras un tratamiento CDT no disminuyó el contenido en tocoferol en las semillas.

1.5.1. ***Genome Wide Association Studies (GWAS)* para el estudio de la longevidad de semilla**

La planta modelo *Arabidopsis thaliana*, empleada en este trabajo, se encuentra ampliamente distribuida por el mundo y su genoma presenta una elevada diversidad asociada con la variabilidad fenotípica y la adaptación (Horton *et al.*, 2012). Esta variabilidad, junto con la existencia de información genómica de enormes colecciones de líneas de introgresión y la gran disponibilidad de herramientas genéticas han convertido a esta especie modelo en una buena elección para el estudio de caracteres agronómicos. Dichos caracteres, en su mayoría cuantitativos y entre los que se encuentra la longevidad de la semilla, se pueden asociar a loci concretos del genoma mediante estudios de asociación. Los estudios de asociación de genoma completo (en inglés, GWAS), como en el que se basa este Trabajo Final de Máster, analizan la asociación entre un gran número de SNPs en el genoma y caracteres complejos, que pudiera existir en la diversidad genética que supone una población natural (Zhu *et al.*, 2008). Dado que la longevidad se trata de un carácter complejo en el que participan diversos mecanismos moleculares, el GWAS apuntará varios marcadores asociados con el fenotipo de estudio. Si bien se había empleado previamente el GWAS para el estudio de la longevidad en otras especies como en cebada (Nagel *et al.*, 2016), no se habían aprovechado las colecciones de accesiones de *Arabidopsis* con dicho fin.

Por tanto, el GWAS se plantea como una poderosa herramienta para identificar genes implicados en la longevidad de la semilla, gracias a la variabilidad para el carácter complejo de longevidad de las diferentes accesiones de *A. thaliana*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este Trabajo de Final de Máster tiene como objetivo general la identificación de nuevos genes implicados en la longevidad de la semilla de *Arabidopsis thaliana*

Para alcanzar dicho objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I. Seleccionar los genes con verdadera aportación a la longevidad de semilla, de entre los candidatos obtenidos a partir de un GWAS realizado con alta presión de oxígeno.
- II. Iniciar la caracterización funcional de dichos genes, empleando sus mutantes de pérdida de función.
- III. Generar plantas transgénicas de sobreexpresión de los genes más prometedores, que permitan profundizar en su caracterización funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Material vegetal: *Arabidopsis thaliana*

Se utilizó como planta modelo para todos los ensayos *Arabidopsis thaliana*. Para todos los genotipos se empleó como control el ecotipo Columbia-0 (Col-0). Las líneas mutantes de inserción de T-DNA, interrumpidas en cada uno de los genes candidatos desvelados por el estudio GWAS, proceden del Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (<http://arabidopsis.info/>) (Tabla 1). Las líneas mutantes *dhar1*, *dhar2*, *dhar3*, *dhar1dhar2*, *dhar2dhar3* y *dhar1dhar2dhar3*. (Rahantaniaina *et al.*, 2017) fueron suministradas por el laboratorio del Dr Noctor.

Tabla 1. Líneas de *Arabidopsis thaliana* empleadas durante el trabajo. En naranja suave las líneas del rastreo inicial GWAS EPPO.

Nomenclatura candidato	Gen	Posición T-DNA	SALK	NASC
S1	At1g19570	Exón	SALK_005382	N505382
S2		Exón	SALK_005238	N505238
<i>dhar2</i>	At1g75270	Exón	SALK_026089C	N659749
<i>dhar3</i>	At5g16710	Intrón	SAIL_435_A09	N820013
<i>dhar1 dhar2</i>	Doble mutante obtenido a partir de los genotipos <i>dhar1</i> y <i>dhar2</i> anteriores			
<i>dhar2 dhar3</i>	Doble mutante obtenido a partir de los genotipos <i>dhar2</i> y <i>dhar3</i> anteriores			
<i>dhar1 dhar2 dhar3</i>	Triple mutante obtenido a partir de los genotipos <i>dhar1</i> , <i>dhar2</i> y <i>dhar3</i> anteriores			
S3	At1g19580	Intrón	SALK_061105C	N682421
S4	At1g19600	Exón	SALK_003847C	N661316
S5	At1g19630	Intrón	SALK_004781C	N652999
G1	At1g19610	Intrón	GK-311B04	N429776
S6	At4g00940	Intrón	Salk076064C	N666457
G2		Exón	GK-383E02	N436722
<i>DOF4.1OE::cMyc</i>	Mutante de sobreexpresión de <i>DOF4.1</i> (<i>At4g00940</i>) cedido por el grupo del Dr Kim (Ahmad <i>et al.</i> , 2013).			
S7	At4g00950	Exón	SALK_029478	N529478
S8	At4g01690	Exón	SALK_143057	N643057
S9	At4g01700	Intrón	WiscDsLox453-456O15	N864661
S9 L2		5'UTR	WiscDsLox442H3	N864609
S9 L3		Exón	SALKseq_31150.2	N924862
S10	At4g01710	Intrón	SALK123936C	N686748
S11	At5g13530	Exón	SALK_049542	N549542
S12	At5g13550	Exón	SALK_037378C	N662135
S13	At5g13560	Exón	SALK_120883	N686726
S14	At5g13565	Exón	SALK_065247	N565247
S15		Exón	SALK_065378	N565378
S16	At5g13570	Intrón	SALK_000519	N500519

3.1.2. *Escherichia coli*

Se utilizaron células de la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (F' ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*).

3.1.3. *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación de *A. thaliana*, se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (C58 (Rif^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) Gen^R/Strep^R nopaline).

3.1.4. Vectores de transformación

-PCR[®]8/GW/TOPO[®]: Plásmido que se comercializa linealizado y en ambos extremos se le ha añadido un residuo deoxitimidina (T), al que a su vez se ha unido covalentemente la enzima topoisomerasa. Es un plásmido empleado para clonar productos de PCR. Potencialmente, luego pueden ser transferidos a otro plásmido destino con la tecnología Gateway[®] (Invitrogen[®]). Contiene el gen de resistencia a espectinomicina.

-pTEX : 2xHA: Plásmido que contiene un promotor constitutivo 35S y dos tag HA (*Human influenza hemagglutinin*). Contiene el gen de resistencia a ampicilina.

-pUBQ10: Plásmido que contiene un promotor constitutivo de ubiquitina. Contiene también genes de resistencia a kanamicina en *E. coli* y *A. tumefaciens*, así como a higromicina para selección en plantas.

3.2. Medios de cultivo y solución nutritiva

3.2.1. Medios de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

3.2.1.1. Medios de cultivo

El cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana* para los ensayos de germinación así como paso previo al cultivo en invernadero se llevó a cabo en medio Murashige-Skoog (MS), compuesto por sales MS (Duchefa Biochimie[®]) 0,4 % (p/v), sacarosa 1 % (p/v), agar bacteriológico 0,9 % (p/v) (Pronidasa[®]) y tampón MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) Tris 10 mM, con un pH ajustado a 5,7 final. El medio fue esterilizado mediante autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 20 min.

Para la selección de mutantes homocigotos para la inserción de T-DNA, se empleó medio MS suplementado con un agente selector: sulfadiacina 15 mg/L para las líneas GABI-KAT y glufosinato de amonio (BASTA) 20 mg/L para las líneas WiscDsLox. Para los ensayos fenotípicos de aparición de cotiledones se suplementó el medio MS con diferentes sustancias a concentraciones tóxicas: ácido acético (4 mM), LiCl (23 mM), NaCl (125 mM), paclobutrazol (1 μ M, 10 μ M y 20 μ M), acetona (0,2% (v/v)) y ácido abscísico (ABA) (0,8 μ M).

3.2.1.2. Solución nutritiva

Las plantas en invernadero se regaron con solución nutritiva durante todo su crecimiento. La composición de dicha solución nutritiva era de KNO_3 4 mM, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 4 mM, MgSO_4 1,5 mM, KH_2PO_4 0,75 mM, EDTAFeSO_4 0,035% (p/v), H_3BO_3 70 μM , MnCl_2 14 μM , NaCl 10 μM , ZnSO_4 1 μM , CuSO_4 0,5 μM , Na_2MoO_4 0,2 μM y CoCl_2 0,01 Mm, con un pH final de 6,5.

3.2.2. Medios de crecimiento de bacterias

3.2.2.1. Medio LB

El crecimiento de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se realizó en medio LB, compuesto por triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v) y NaCl 1% (p/v), ajustándose el pH a 7 con la ayuda de NaOH . Para el crecimiento en medio sólido, se añadió agar al 2% (p/v). El medio fue esterilizado mediante autoclavado a 121°C y 1 atm de presión durante 20 min.

Cuando fue requerido, se añadieron antibióticos al medio para la selección correspondiente, siendo las concentraciones finales: ampicilina (100 mg/L), kanamicina (50 mg/L), espectinomicina (50 mg/L), gentamicina (25mg/L), tetraciclina (5mg/L).

3.3. Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

3.3.1. Esterilización de semillas

Se siguieron dos tipos de estrategias para la esterilización de las semillas:

3.3.1.1. Esterilización con etanol

El protocolo de esterilización en húmedo consistió en tratar las semillas con una solución de etanol 70% (v/v) y detergente Triton X -100 0,1 % (v/v) durante 20 minutos en agitación. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron 3 lavados consecutivos en condiciones de esterilidad con agua *Milli-Q*®.

3.3.1.2. Esterilización con gas cloro

El protocolo de esterilización en seco consistió en el empleo de gas cloro como agente esterilizante. Para ello, se introdujeron los microtubos abiertos conteniendo unas 200 semillas por genotipo en un desecador, el cual es sellado con *Parafilm*® para garantizar su hermetismo. Se empleó para la obtención del gas cloro esterilizante una solución de 100 mL de hipoclorito sódico (menos del 5% (v/v)) a la que se le añadieron 3 mL de ácido clorhídrico 37 % (v/v). Tras un tiempo de esterilización de 4 horas, los tubos con semillas, estériles, fueron aireados durante al menos 30 minutos en condiciones de esterilidad en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, se sumergieron en agua *Milli-Q*® y se almacenaron al igual que en la esterilización en húmedo durante 2 días a 4°C, estratificando.

Las semillas esterilizadas se estratificaron manteniéndolas sumergidas en agua *Milli Q*® durante 3 días a 4°C antes de la siembra, con el fin de romper la latencia y favorecer la germinación de forma sincronizada.

3.3.2. Cultivo *in vitro* –medio sólido-

Se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro con unos 25 mL aproximadamente de medio por placa. Las semillas fueron depositadas en el medio en condiciones de esterilidad para su germinación y las placas selladas con cinta adhesiva porosa (*Micropore*®). El cultivo de dichas semillas se realizó en una cámara en condiciones controladas de 23°C de temperatura, humedad relativa del 70 ± 5 %, fotoperíodo de día largo (16 h de luz/día) con una intensidad lumínica de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.3.3. Cultivo en invernadero

Las plantas germinadas *in vitro* fueron transferidas a tierra el día 7 post siembra, para iniciar su crecimiento en invernadero. Se utilizaron macetas con un sustrato mezcla de turba, vermiculita exfoliada y perlita. Las condiciones de cultivo en invernadero fueron: temperatura de 23°C, humedad relativa del 70%, fotoperíodo de día largo e intensidad lumínica aproximada de $130 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Las macetas se colocaron en bandejas y se regaron dos veces por semana. Fueron tratadas esporádicamente con tratamientos antifúngicos y plaguicidas biológicos.

3.3.4. Recolección y almacenamiento de semillas

Las semillas ya maduras y secas se mantienen durante 1 semana en la cámara de desecación del invernadero, para completar su desecación antes de ser separadas de la silícula. Las semillas obtenidas fueron almacenadas hasta el momento de los ensayos en tubos de 1,5 μL , en cajas con gel de sílice como agente deshumidificante y a 4°C de temperatura, para minimizar su deterioro.

3.3.5. Transformación de *A. thaliana* mediada *A. tumefaciens*

Se emplearon 4 plantas del mutante *dof4.1-3*, dos de ellas se transformaron con el vector vacío y otras dos con el vector incluyendo el cDNA del gen *DOF4.1*. Las plantas fueron crecidas en tierra, en maceta de 10 cm de diámetro hasta tener un escapo con inflorescencia primaria de alrededor de 10 cm de longitud. En dicho momento de desarrollo y como preparación para la transformación, se cortó el ápice de las inflorescencias primarias con el fin de promover la aparición de inflorescencias secundarias, y así contar con un mayor número de capullos florales transformables. Pasados 4 ó 5 días después de dicho corte, se realizó la transformación por el método de *floral dipping* tal y como se describe en Bent, 2000.

Previamente, se preparó un cultivo saturado de *A. tumefaciens* con el vector de interés, del cual se tomó 1 mL y éste fue añadido a 200 mL de medio LB suplementado con gentamicina para conservar el plásmido “helper” y con el antibiótico deseado correspondiente a la resistencia del plásmido. Se incubó dicha mezcla a 28°C durante 24 horas, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-1. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos, y se resuspendieron en 400 mL de solución de infiltración, compuesta por sacarosa 5% (p/v) y detergente Silwet® L-77 (PhytoTechLab®). La parte aérea de las plantas fue sumergida en la solución de infiltración durante 1 minuto. Posteriormente, las plantas se cubrieron con embalajes plásticos con el fin de mantener la humedad y aumentar así la eficiencia de transformación. Pasadas 2 semanas, éstas se retiraron y las plantas se cultivaron en el invernadero hasta la recogida de la población de semillas transgénicas T1.

3.4. Manipulación y crecimiento de *Escherichia coli*

Para el crecimiento en medio sólido de *E. coli*, las placas inoculadas fueron incubadas de manera invertida en estufa a 37°C. Para el cultivo en medio líquido, se emplearon matraces o tubos de 15 mL estériles, colocados en un incubador orbital con una velocidad de agitación de 220 rpm y a 37°C de temperatura.

3.4.1. Transformación de células competentes mediante choque térmico

Partiendo de una alícuota de 100 µL de células competentes, se añadió el producto de ligación y la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se realizó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, justo después del cual fue incubada de nuevo la mezcla en hielo durante 2 minutos. Acto seguido, se agregaron 900 µL de medio LB y se mantuvo la mezcla durante 1 h a 37°C y en agitación. Tras dicho tiempo, 150 µL del precultivo fueron extendidos en placa de LB con antibiótico apropiado.

3.5. Manipulación y crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens*

Para el crecimiento en medio sólido de *A. tumefaciens*, las placas sembradas fueron incubadas de manera invertida en estufa a unos 28°C. Para el cultivo en medio líquido, se emplearon matraces o tubos de 15 mL estériles, colocados en un incubador orbital con una velocidad de agitación de 200 rpm y a 28°C de temperatura.

3.5.1. Transformación mediante choque térmico

Partiendo de alícuotas de 100 μL de células de *A. tumefaciens* competentes, se añadió la cantidad de 1 μg del plásmido. La mezcla se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y a continuación se incubó a 37°C durante 5 min. Transcurrido dicho tiempo, se añadieron 900 μL de medio LB con los antibióticos tetraciclina y gentamicina, y se incubó a 28°C durante 4 horas en agitación a 200 rpm. Finalmente, se extendieron las suspensiones en placas LB con tetraciclina, gentamicina y kanamicina, que se incubaron a 28°C en oscuridad. Pasados 2 o 3 días, aparecieron colonias resistentes a los antibióticos.

3.6. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos

3.6.1. Aislamiento de DNA genómico de *A. thaliana*

Para el aislamiento de DNA de planta, se empleó el método del bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) descrito por McKinney *et al.*, 1995, aunque con ciertas modificaciones, detalladas a continuación. Se tomó aproximadamente 300 mg de material vegetal procedente de hoja de la roseta, de plantas crecidas en invernadero. Estas hojas fueron homogeneizadas con la ayuda de mortero y nitrógeno líquido. Al homogeneizado se le añadieron 400 μL de tampón de CTAB (CTAB 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M y PVP Mr 40000 1% (p/v)), tras lo cual se incubó a 55°C durante 20 minutos. A continuación, se agregaron 400 μL de cloroformo : alcohol isoamílico (24:1) y tras su mezcla en el vórtex, se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos. Se tomó la fase acuosa (parte superior) y se le añadió 1 volumen de isopropanol, y tras su mezcla, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó 10 min, desechándose el sobrenadante. El pellet fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 20 μL de agua Milli-Q®.

3.6.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, se siguió el protocolo correspondiente al kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA mini kit (Omega Bio-Tek®). Posteriormente, en la medición de la concentración final y pureza del DNA obtenido en cada muestra, se utilizó el equipo ND 100 Spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000).

3.6.3. Electroforesis de DNA

Se emplearon geles de agarosa al 0,7-2% (p/v) (según el tamaño de los fragmentos a separar) fundida en tampón de electroforesis TBE (Tris/Borate/EDTA) 0,5X (TrisBase 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM). Se añadió bromuro de etidio 0,05% (p/v) en la solución tampón de electroforesis así como en el gel de agarosa.

El tampón de carga empleado fue tampón 6X azul (sacarosa 40% (p/v), EDTA 0,1 M y azul de bromofenol 0,25% (p/v)). Como marcador de peso molecular, se eligió el patrón comercial *Ikb Plus DNA Ladder* (Invitrogen®).

La posterior visualización de las bandas de DNA de los geles de agarosa se realizó iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm. En el caso de extraer fragmentos de DNA de los geles de agarosa, se utilizó una lámpara UV de 366 nm. Dicha banda fue entonces purificada gracias al uso del kit *Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey Nagel®).

3.6.4. Aislamiento y purificación de RNA de *A. thaliana*

Para el aislamiento y purificación de RNA de hoja, se siguió el protocolo correspondiente al kit E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek®). Las contaminaciones de DNA genómico que pudieran presentar las muestras se minimizaron mediante el empleo de DNAsa libre de RNAsas (Omega Bio-Tek®), según las recomendaciones descritas por la casa comercial. Posteriormente, en la medición de la concentración final y pureza del RNA obtenido en cada muestra, se utilizó el equipo ND 100 Spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000).

En cuanto al aislamiento de RNA de semillas de *A. thaliana*, se siguió un protocolo específico para dicho material de partida. Se tomó una cantidad de partida de 0,15 g de silicuas por muestra y tras separación en frío las semillas de las no deseadas silicuas, el pulverizado correspondiente a las semillas fue mezclado con 550 µL de buffer de extracción (LiCl 0,4 M, Tris 0,2 M pH 8, EDTA 25 mM y SDS 1%) y con 550 µL de cloroformo. Se centrifugó a 11000 rpm durante 3 min en frío, y al sobrenadante se le añadieron 700 µL de fenol -cloroformo - alcohol isoamílico (PCI). A continuación, se mezcló y se centrifugó a 11000 rpm durante 3 min. Se tomó el sobrenadante y se le añadió 1/3 volumen de LiCl 8M. Después de mezclar, se llevó a cabo una precipitación incubando 1h a -20°C. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó a 11000 rpm durante 30 min, y el pellet fue disuelto en 450 µL de H₂O Milli-Q®, 7 µL de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 250 µL de etanol absoluto. Tras su agitación, se llevó a cabo una centrifugación a 11000 rpm durante 10 min para precipitar los carbohidratos residuales. El sobrenadante fue tratado con 43 µL de acetato sódico 3 M y 750 µL de etanol absoluto, durante 1 h a -20°C. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugó a 11000 rpm durante 20 min y se lavó dos veces con etanol 70%. El pellet final fue resuspendido en 20-30 µL de H₂O Milli-Q®.

Para eliminar el DNA de dicho RNA extraído se siguieron el protocolo y las recomendaciones del kit E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek®), utilizándose la DNAsa libre de RNAsas (Omega Bio-Tek®).

3.6.5. Electroforesis de RNA

Para la visualización del RNA aislado y la valoración de su integridad, se optó por una electroforesis de RNA en condiciones no desnaturalizantes. Se emplearon geles de agarosa al 1% fundida en tampón de electroforesis TAE (Tris/acetate/EDTA) 1X. La preparación de las muestras para su posterior visualización en el gel conllevó la utilización del tampón de carga 1,25X (formamida 55% (v/v), formaldehído 20% (v/v), MAE [10X: MOPS 200 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM y ajustando a pH 7 con NaOH] 12,5% (v/v), glicerol 8% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v) y bromuro de etidio 0,001% (p/v)). La posterior visualización de las bandas de RNA de los geles de agarosa se realizó, al igual que para el DNA, iluminando el gel con luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 254 nm.

3.6.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.6.6.1. Oligonucleótidos cebadores

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo final de máster como cebadores en las reacciones PCR, PCR diagnóstica, RT-PCR semicuantitativa y qRT-PCR fueron sintetizados por las empresas IDT® y Metabion®, y sus secuencias se encuentran especificadas en el anejo I, anejo II y anejo III.

3.6.6.2. Condiciones de PCR

Las reacciones de PCR se desarrollaron en microtubos estériles, en los que se añadieron los siguientes reactivos a las siguientes concentraciones finales: DNA genómico 10-100 ng/uL, cebador sentido 0,4 μ M, cebador antisentido 0,4 μ M, polimerasa (*Taq*) 0,025 U/ μ L, tampón PCR 1X (Biotools®), dNTPS 0,25 mM, diluidos en agua *Milli-Q*® hasta llegar a un volumen de reacción total de 20 μ L.

En general, se utilizó *Taq* polimerasa sintetizada y purificada en el propio laboratorio, excepto para las reacciones de amplificación de alta fidelidad, en las cuales se hizo uso de la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific®). Todas estas reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Surecycler® 8800 (Agilent Technologies®), siguiendo el programa de PCR:

- 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 30 s.
- Entre 30 y 35 ciclos de:
 - o Desnaturalización a 95°C durante 30 s.
 - o Hibridación o *annealing* de los cebadores: a una temperatura de anillamiento unos 2°C inferior a la T_m de los oligonucleótidos, durante 30 s.
 - o Extensión a 72°C de 1 min/kb a amplificar, en el caso de la enzima Taq polimerasa, y 40 s/kb en el caso de la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*.
- 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min.

3.6.6.3. PCR diagnóstica

Para identificar los mutantes que poseen la inserción de T-DNA en homocigosis y diferenciarlos de los mutantes hemocigotos y de aquellos que poseen solamente el alelo silvestre, en las líneas suministradas por el NASC (ya sean SALK o SAIL), se realizaron PCR diagnósticas conllevando 2 reacciones diferentes. Para ello, se utilizó un par de oligonucleótidos cebadores LP y RP diseñados de manera que hibridasen cada uno a un lado del T-DNA, y un oligonucleótido cebador que hibrida específicamente en el T-DNA (concretamente, el LBB1.3). Así, tras la amplificación, las líneas homocigotas presentarán en el gel una banda de DNA correspondiente a la amplificación con la combinación de cebadores LP y LBB1.3, mientras que las silvestres presentarán una banda de la amplificación de los cebadores LP y RP. El hemocigoto, por tanto, debe presentar ambos tipos de bandas.

3.6.6.4. RT-PCR semicuantitativa

Partiendo de material RNA extraído y purificado como es explicado anteriormente, se llevó a cabo la síntesis de cDNA (DNA complementario). Para ello, en microtubos libres de RNAsa, se mezclaron: 4 µL Reaction Mix® 5X, 2 µL de enzima retrotranscriptasa *Maxima Enzyme Mix®* (Thermo Fisher Scientific®), 1 µg RNA y agua *Milli-Q®* hasta llegar a un volumen de reacción de 20 µL. Se incubó la mezcla en el termociclador, siguiendo el programa de temperaturas: 25 °C durante 10 min, 50°C durante 30 min y 85 °C durante 10 min.

La posterior reacción de PCR así como el programa del termociclador se establecieron como se ha detallado anteriormente en el Apartado 3.6.6.2, empleando en este caso cDNA como material genético molde.

3.6.6.5. **RT-PCR cuantitativa**

Se utilizaron placas de 96 pocillos. Para la preparación de las muestras, se siguió el protocolo del kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Thermo Fisher Scientific®). El programa de las reacciones fue controlado mediante el software *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*® (ThermoFisher Scientific®), siendo las temperaturas y tiempos de cada reacción las siguientes:

- 1 ciclo inicial de 50°C durante 20 s, seguido de una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min.
- 40 ciclos de:
 - o Desnaturalización a 95°C durante 15 s
 - o Hibridación de los cebadores: 55°C durante 30 s. En este paso, se indicó en el software que se realizara la toma de fluorescencia.
 - o Extensión a 72°C durante 30 s.

Cada reacción fue realizada por triplicado.

3.6.6.6. **RNASeq**

Como material de partida se cogieron muestras de sílicuas de *wt* y de mutantes de sílicuas de 8 *dpp*, tomando 3 réplicas biológicas. De ahí se extrajo el RNA siguiendo el protocolo del apartado 3.6.4. Tras llevar a cabo la secuenciación, se analizaron los datos con ayuda del servicio de bioinformática del instituto, que siguió el siguiente esquema de trabajo:

El análisis de calidad de las lecturas se realizó con 'FastQC' (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Tras la eliminación de zonas de baja calidad y adaptadores con 'cutadapt' (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>), las lecturas fueron mapeadas con 'HISAT2' (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>) contra el genoma de *Arabidopsis TAIR10* obtenido de *Araport11* (https://www.araport.org/downloads/TAIR10_genome_release/assembly). El número de lecturas que corresponden a cada uno de los genes de *Arabidopsis* fue obtenido con 'htseq-count' (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/count.html) utilizando la última anotación de *Araport11* (https://www.araport.org/downloads/Araport11_latest/annotation). El análisis de expresión diferencial se realizó en R utilizando el paquete de Bioconductor DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>)."

3.6.6.7. **Obtención de la construcción pUB:DOF:2xHA**

Partiendo de cDNA obtenido de semilla de plantas *wild type* (Col0), se realizó una PCR de alta fidelidad para amplificar el cDNA correspondiente al gen *DOF4.1* (At4g00940), añadiéndole los sitios de corte *BamHI* a ambos extremos del gen gracias al diseño específico de los cebadores (Anejo III). La PCR se finalizó con un paso último de incubación con 2 μ L de Taq polimerasa y 1 μ L de dATPs a 10 mM. Posteriormente, el producto de PCR se clonó en el vector PCR®8/GW/TOPO®, siguiendo las indicaciones del “PCR®8/GW/TOPO® TA cloning Kit”. Brevemente, se mezclaron 3 μ L del producto, 1 μ L de solución de sales incluidas en el kit, 0,8 μ L del vector PCR®8 y 1 μ L de H₂O. Se incubó durante 1 hora a 22°C. A continuación, se transformó *E. coli* tal y como se detalla en el apartado X.

El vector PCR®8 fue aislado a partir de *E. coli* mediante el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek®) y cortado con el enzima de restricción *BamHI* para obtener el cDNA del gen *DOF4.1*. Por otra parte, el vector pTEX:2xHA fue cortado igualmente con *BamHI* y tratado con fosfatasa alcalina (Roche®) para evitar su religación sin el inserto. Para el tratamiento con fosfatasa alcalina, se siguieron las indicaciones de la casa comercial. La introducción del cDNA del gen *DOF4.1* en pTEX se llevó a cabo mediante ligación de extremos cohesivos, añadiendo 20 ng de vector y 50 ng de inserto, y empleándose en la reacción enzima ligasa T4 0,5 U/ μ L, tampón de ligación y ATP 0,5 mM. Finalmente, se comprobó mediante enzimas de restricción la correcta orientación del fragmento en dicho vector.

El fragmento *DOF4.1-HA*, se extrajo del vector pTEX, mediante una doble digestión con *SmaI* y *Sall*, y fue introducido por ligación entre los sitios de clonación *Sall* y *ScaI* del vector pUBQ10. Tras la transformación de *E. coli*, se extrajo el plásmido final pUB:*DOF4.1-2xHA* y se incorporó en *A. tumefaciens*.

3.7. **Caracterización fenotípica de los mutantes**

3.7.1. **Ensayos de envejecimiento acelerado de la semilla**

3.7.1.1. **Envejecimiento acelerado por elevada presión de oxígeno (EPPO)**

Para determinar la longevidad de las semillas, uno de los métodos empleados fue el envejecimiento acelerado por elevada sobrepresión de oxígeno (EPPO). Para ello, se suministró oxígeno a una cámara hermética hasta alcanzar en el interior una presión de 5 bares. En dicha cámara se introdujeron microtubos perforados conteniendo las semillas a envejecer y se mantuvieron durante 3-9 meses, según el ensayo. Se realizaron dos ensayos en los que se varió la humedad mantenida en el interior de la cámara de ensayo: EPPO con baja humedad (humedad relativa en torno al 30%) y EPPO

con muy baja humedad (humedad relativa mínima, de aproximadamente 10%). Para ello, se empleó gel de sílica como agente desecador.

Tras el tratamiento de envejecimiento las semillas se esterilizaron como se describe en el Apartado 3.3.1, y se sembraron y crecieron en MS en condiciones controladas.

3.7.1.2. **Envejecimiento acelerado por Controlled Deterioration Treatment (CDT)**

Otro método para simular el envejecimiento natural de las semillas aquí ensayado fue el de *Controlled Deterioration Treatment* (CDT). El ensayo tuvo lugar en microtubos abiertos en el interior de una cámara sellada y a una temperatura de 37°C. La humedad relativa se mantuvo al 75% gracias a una solución saturada de NaCl. Transcurrido el tiempo de envejecimiento de 10-14 días, las semillas se esterilizaron como se describe en el Apartado 3.3.1, y se sembraron y crecieron en MS en condiciones controladas.

3.7.2. **Ensayos de aparición de cotiledones verdes en diferentes medios**

Este ensayo permite determinar la respuesta del mutante ante el tratamiento de envejecimiento acelerado aplicado, así como ante los diferentes estreses aplicados en los primeros estadios de desarrollo, según el caso. Para ello, se emplearon placas Petri con los medios descritos en el Apartado 3.2.1, suplementados o no con diferentes sustancias en las concentraciones ya descritas, observándose el porcentaje de plántulas con cotiledones expandidos y verdes entre los 4 y 11 días, dependiendo del tratamiento seguido. Se sembraron 25 o 30 semillas por genotipo y placa (según el ensayo), tomando 3 réplicas biológicas por cada condición y calculándose la media y el error estándar de esas 3 réplicas biológicas. Asimismo, se llevó a cabo en todos los ensayos un control de germinación sin tratamiento.

Para la determinación de la existencia o no de diferencias significativas entre el mutante y el *wild type*, se realizó una prueba estadística del tipo *t-student*. Con ello, en los gráficos se marcó con un asterisco (*) en el caso de existir diferencias significativas con un grado de significación $\alpha \leq 0,05$.

3.7.3. **Medida de la permeabilidad de la cubierta de la semilla**

3.7.3.1. **Tinción de la capa de suberina**

La tinción de la capa de suberina se realizó mediante el colorante específico Sudan Red 7B, que permite su observación al microscopio. Previo a la tinción, las semillas se sometieron a un tratamiento de despigmentación sumergiéndolas en una solución Triton:lejía (1:1000) y manteniéndolas en agitación hasta su conseguir su total blanqueo. Una vez despigmentadas, las semillas se lavaron con agua *Milli-Q*® y con etanol absoluto. A continuación, se añadieron 500 μ L de cloroformo:metanol (2:1) y se incubó durante 20 minutos agitándose cada 5 min. En esta etapa los lípidos de la semilla son eliminados, impidiéndose su tinción con el Sudan. Tras ese tiempo, se lavaron

las semillas con etanol absoluto y, tras quitarlo, se añadieron 200 μL de una solución de tinción conteniendo Sudan Red 7B 0,1% (p/v) disuelto primero en polietilenglicol 300 (PEG 300) 50% (v/v), glicerol 5% (v/v) y agua *Milli-Q*®. Se incubaron las semillas en la solución de tinción con Sudan a temperatura ambiente durante 2 h, agitando varias veces. Las semillas así teñidas fueron visualizadas en microscopio Nikon.

3.7.3.2. **Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio**

Para el análisis de la permeabilidad de la cubierta de la semilla se utilizaron las sales de tetrazolio. Cuando las sales (incoloras) entran en el interior de la semilla, son reducidas a sales de formazano gracias a las reductasas NADH dependientes celulares, que tienen un color rojizo que puede detectarse con el espectrofotómetro.

Para dicho ensayo, se tomaron 3 réplicas biológicas de 25 mg de semillas de cada genotipo y se sumergieron en una solución de tetrazolio al 1% (p/v), incubándose así a 30°C durante 48 o 96 horas. Tras dicho tiempo, se realizaron 2 lavados con agua *Milli-Q*® y se sumergieron en 1 mL de etanol absoluto 96°. Las semillas fueron entonces trituradas con la ayuda de pequeñas esferas metálicas y de un homogeneizador, en frío y con una agitación de 30 s^{-1} durante 1 minuto y medio. Tras la homogeneización, se añadieron otros 800 μL de etanol por tubo y se centrifugaron a 4°C durante 7 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante fue recogido y cada réplica biológica se dividió en 2 réplicas técnicas. La absorbancia de cada muestra fue medida en el espectrofotómetro a una $\lambda=485\text{nm}$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Antecedentes

Previo al comienzo de este Trabajo de Fin de Máster, varios investigadores pertenecientes al grupo de “Homeostasis iónica, estrés celular y genómica” del IBMCP habían realizado un GWAS sometiendo a las semillas de unas 300 accesiones diferentes de *Arabidopsis thaliana* a un tratamiento EPPO (5 bares de presión de oxígeno y humedad relativa baja (30-40%) durante 5 meses). Tras dicho tratamiento, las semillas se sembraron en medio MS y tras obtener los datos de germinación total, estimada por la aparición de cotiledones verdes, se obtuvieron los datos fenotípicos necesarios para localizar regiones de dicho genoma (loci) con relevancia e implicación en la longevidad de la semilla. Mediante el software GWA-Portal (<https://gwas.gmi.oeaw.ac.at/#/home>) se realizó el análisis estadístico considerando los datos fenotípicos recopilados por el laboratorio y los datos genómicos de las accesiones incluidos en la base de datos de SNPs de *Arabidopsis* 250 K v3.06; TAIR9.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron 5 regiones, correspondientes a 5 picos que superan el umbral $-\log(p\text{-value}) = 4$, como se muestra en la Figura 3.

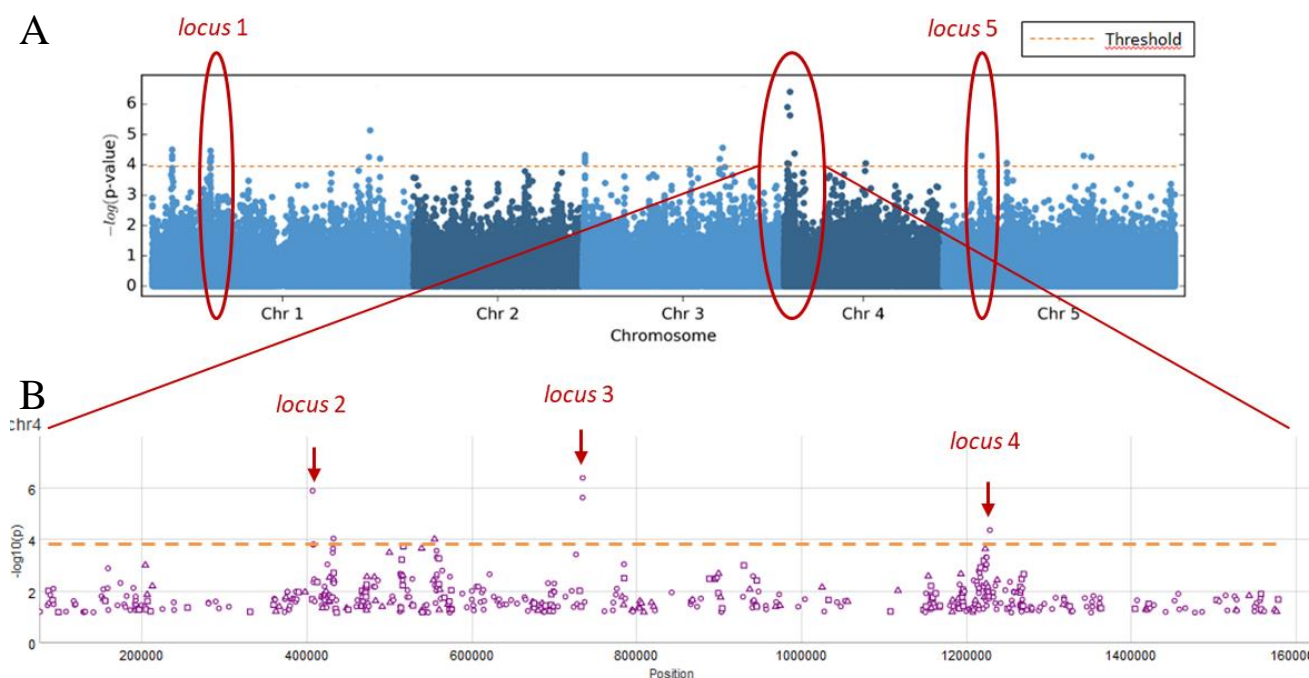


Figura 3. Selección de los 5 loci de estudio. A) *Manhattan plot* resultado del GWAS. Rodeados en rojo y señalados con flechas del mismo color se muestran los loci seleccionados. La línea discontinua representa el umbral o *threshold* de $-\log(P\text{-value}) = 4$ a partir del cual se consideró significativa la correlación entre SNPs y el fenotipo de longevidad de la semilla tras el tratamiento EPPO. En B) se muestran en detalle los picos correspondientes a los loci del cromosoma 4.

Para su estudio en el presente Trabajo de Fin de Máster, se seleccionaron los loci 1, 2, 3 y 5, marcados en rojo. Para cada locus, se consideraron como genes candidatos, aquellos que se encontraban en desequilibrio de ligamiento con respecto al SNP más significativo de dicho locus. El desglose de dichos genes incluidos en cada locus, seguido de su anotación, se muestra en la Tabla 2.

Con ello, se procedió a pedir a través del *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) (<http://arabidopsis.info>) semillas de líneas *Arabidopsis* mutantes de pérdida de función para cada uno de los genes candidatos potencialmente implicados en el rasgo. Estas líneas se obtuvieron de las colecciones SALK, GABIKAT y WiscDsLox (Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003; Woody *et al.*, 2007). Estas colecciones se caracterizan por presentar una inserción de T-DNA en el gen de interés, con lo que se supone la consiguiente pérdida de función de la proteína codificada por dicho gen. Las referencias comerciales de dichas líneas mutantes se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los genes candidatos obtenidos a partir del GWAS

		Gen	Función	Código SALK	Código NASC
Locus 1	S1	At1g19570	<i>Dehydroascorbate Reductase 1</i> (DHAR1)	SALK_005382	N505382
	S2			SALK_005238	N505238
	S3	At1g19580	<i>Gamma Carbonic Anhydrase 1</i> (GAMMA CA1)	SALK_061105C	N682421
	S4	At1g19600	<i>Phosphofructokinase B (pfkB)-like Carbohydrate Kinase Family Protein</i>	SALK_003847C	N661316
	S5	At1g19630	<i>Cytochrome P450, family 722, Subfamily A, Polypeptide 1</i> (CYP722A1)	SALK_004781C	N652999
	G1	At1g19610	<i>Plant Defensin (PDF1.4), Low-Molecular-Weight Cysteine-Rich 78</i> (LCR78)	GK-311B04	N429776
Locus 2	S6	At4g00940	<i>DNA binding with One Finger</i> (DOF4.1) ; <i>Intercellular Trafficking DOF 1</i> (ITD1)	Salk076064C	N666457
	G2			GK-383E02	N436722
	S7	At4g00950	<i>Maternal Effect Embryo Arrest 47</i> (MEE47)	SALK_029478	N529478
Locus 3	S8	At4g01690	<i>Protoporphyrinogen Oxidase</i> (PPOX), HEMG1, PPO1	SALK_143057	N643057
	S9	At4g01700	<i>Chitinase Family Protein</i>	WiscDsLox453-456O15	N864661
	S10	At4g01710	ARPC5, CRK, Crooked (<i>actin polymerization factor</i>)	SALK123936C	N686748
Locus 5	S11	At5g13530	<i>Keep On Going</i> (KEG) (<i>degradation with ABA</i>)	SALK_049542	N549542
	S12	At5g13550	<i>Sulfate Transporter 4.1</i>	SALK_037378C	N662135
	S13	At5g13560	<i>Protein-coding (structural maintenance of chromosomes)</i>	SALK_120883	N686726
	S14	At5g13565	<i>Coding hypothetical protein</i>	SALK_065247	N565247
	S15			SALK_065378	N565378
	S16	At5g13570	ATDCP2, DCP2, <i>Decapping 2, Increased Transgene Silencing 1</i> (ITS1), <i>Trident</i> (TDT)	SALK_000519	N500519

4.2. Ensayos iniciales para seleccionar líneas mutantes homocigotas

Para todos los ensayos con las líneas mutantes previamente mencionadas, son necesarias semillas homocigotas para la inserción de T-DNA. En el momento del inicio de este Trabajo de Fin de Máster, varias de las líneas recopiladas en la Tabla 2 habían sido genotipadas con anterioridad en el laboratorio y se encontraban ya en homocigosis para la inserción. Sin embargo, otras líneas debían ser genotipadas para confirmar la presencia del inserto en el entorno genómico adecuado y su homocigosis.

Para la detección de la banda correspondiente a la inserción, se realizó una PCR utilizando cebadores que hibridaran en el T-DNA situados cerca del borde izquierdo junto con otro cuya hibridación que tuviera lugar en el DNA genómico de la planta, cercano a la zona de inserción. Por otro lado, para detectar la banda silvestre, se emplearon cebadores que incluyeran el supuesto sitio de inserción (Anejo I). En base a los resultados de dichas PCR, se seleccionaron las plantas homocigotas para cada línea analizada, tal y como muestra el ejemplo de la Figura 4)

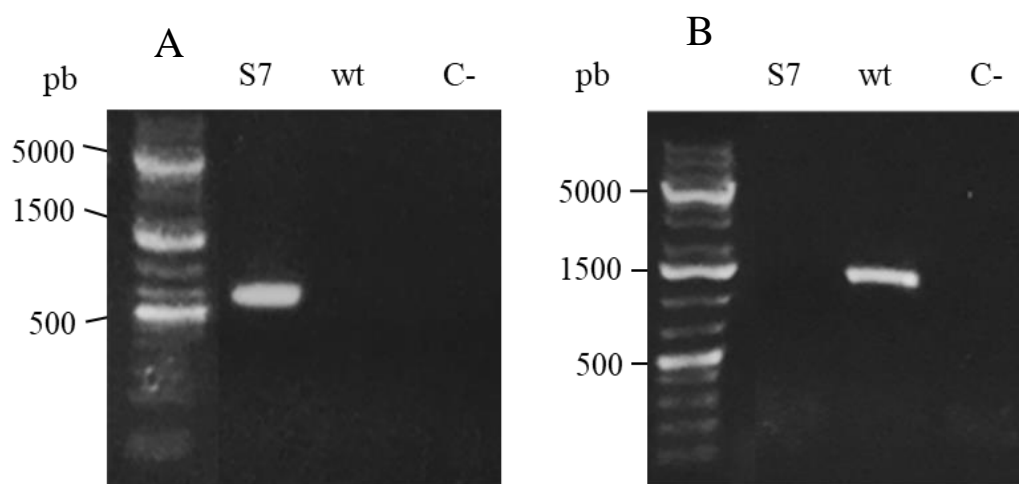


Figura 4. Ejemplo del proceso de selección de mutantes homocigotos para la presencia del T-DNA. Se muestran las electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR para detectar plantas silvestres, hemocigotas u homocigotas mutantes de inserción de T-DNA en la línea S7: **A)** Reacción PCR específica de T-DNA; **B)** Reacción PCR de detección de banda silvestre. “wt”: *wild type*; “C-”: Control negativo de reacción PCR; “pb”: pares de bases.

Es importante señalar que para las líneas S8, S11 y S16 no se consiguió obtener líneas homocigotas para el inserto. Probablemente, esto es debido a que resultarían letales en homocigosis, implicando una vital importancia de la función del correspondiente gen deletado. Estos resultados concuerdan con lo recogido en la bibliografía para el mutante de pérdida de función del gen de la línea S16 *ATDCP2* (*At5g13570*), cuyo desarrollo embrionario en homocigosis se encuentra comprometido (Iwasaki et al., 2007) y el de la línea S8 *PPO1* (*At4g01690*) que en homocigosis resulta letal (Zhang et al., 2014).

4.3. Rastreo de candidatos mediante envejecimiento acelerado

Con el fin de desvelar cuáles de los genes candidatos de cada locus están verdaderamente implicados en la longevidad, se sometió a las semillas de los genotipos resumidos en la Tabla 2 a un tratamiento de envejecimiento acelerado. Dado que el tratamiento empleado en el GWAS (EPPO: 5 bares de oxígeno y baja humedad relativa) conlleva demasiado tiempo, se realizó inicialmente un tratamiento más corto y muy establecido en la bibliografía como método de envejecimiento acelerado, denominado CDT (*Controlled Deterioration Treatment*). Tras este tratamiento, que combina temperatura (37°C) con elevada humedad relativa (75%), se obtuvieron los siguientes resultados de germinación a los 7 días post-siembra (Figura 5). Una ejemplificación del ensayo de aparición de cotiledones verdes acoplado al tratamiento CDT se muestra en la Figura 6.

De cada locus, se seleccionó 1 gen que mostró mayores diferencias con respecto al *wild type* y por tanto, puede tener un papel en la longevidad de semillas.

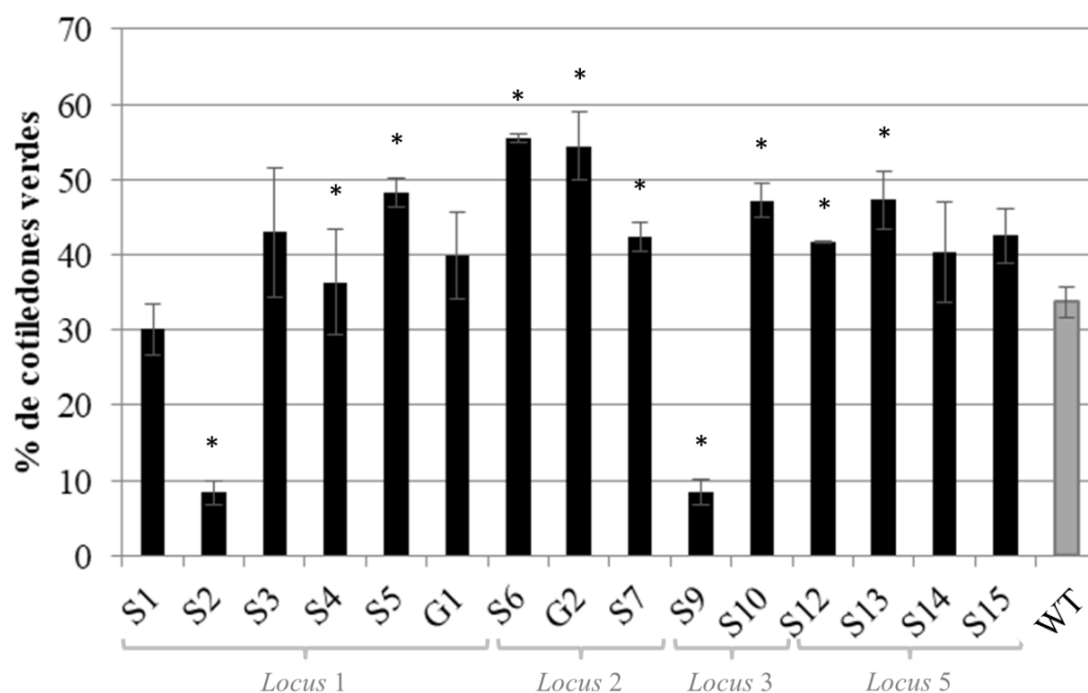


Figura 5. Screening inicial de candidatos. Porcentaje de cotiledones verdes a los 7 días post-siembra de las líneas de mutantes seleccionadas para cada uno de los loci de estudio tras 10 días de tratamiento de envejecimiento acelerado a 37°C y 75% HR. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media de ese mutante y la de su control (wt) con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

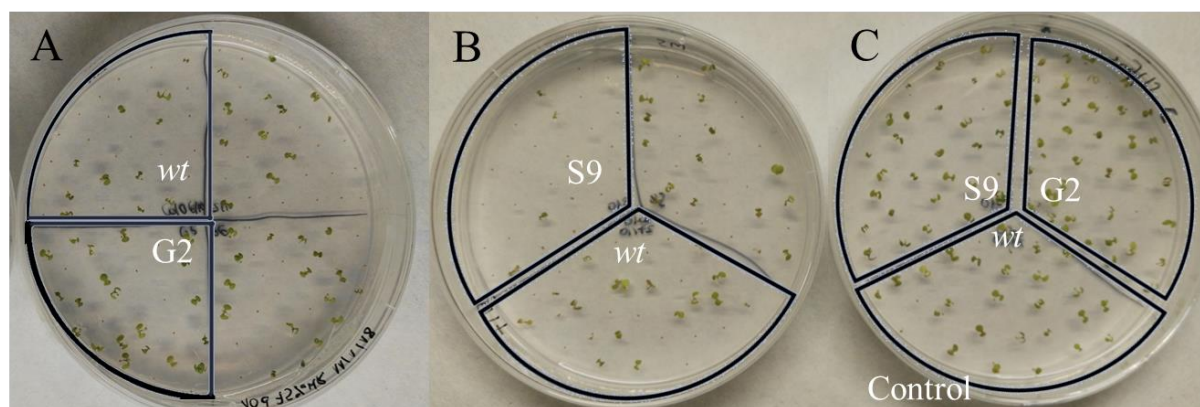


Figura 6. Ejemplificación del ensayo de cotiledones verdes tras el tratamiento de envejecimiento acelerado CDT. Se muestra un genotipo de mayor tolerancia al envejecimiento acelerado CDT que el *wt* en A) y un genotipo de menor tolerancia que el *wt* en B). C) Muestra los controles de germinación.

Así, del locus 1, fue seleccionado el mutante S2, con un fragmento de T-DNA inserto en el gen At1g19570, que codificaría para la enzima dehidroascorbato reductasa 1 (DHAR1). Dicho mutante parece presentar mayor sensibilidad al tratamiento de envejecimiento acelerado, con valores de 8% de cotiledones verdes, comparado con su control, que alcanza el 34 % de germinación. En el *screening*, además, existía otro alelo mutante de inserción para el mismo gen, S1. Aunque en este caso el comportamiento de dicho mutante no es significativamente menor al del *wild type* como en el anterior alelo, el gen *DHAR1* se seleccionó para su estudio en más detalle en este Trabajo de Fin de Máster, vista la significancia del primer alelo.

Por otro lado, en el locus 2 resalta contrariamente por su alta tasa de cotiledones verdes tras el tratamiento el gen At4g00940, representado en el *screening* por S6 y G2, dos diferentes alelos mutantes para el mencionado gen. Este gen, codifica para el factor de transcripción DOF4.1. Como se observa en la figura, ambos alelos presentan fenotipos muy similares, de 55% y 54% (S6 y G2, respectivamente) y superiores al 34% del *wild type*. Es por ello que ambos fueron seleccionados para el estudio posterior y más detallado en el presente trabajo.

Por último, fue igualmente seleccionado para su estudio en este trabajo debido a su potencial relevancia el mutante S9, perteneciente al locus 3 y portador de una inserción en el gen At4g01700, que codifica para una enzima de la familia de las quitinasas (*Chitinase Family Protein* o aquí abreviado, CFP). Este genotipo llamó la atención por mostrar un notablemente reducido porcentaje de cotiledones verdes, del 8,5%.

Las líneas hemicigotas anteriormente mencionadas (S8, S11 y S16) fueron también incluidas en el *screening*. Sin embargo, no aportan resultados concluyentes y no se muestran en la Figura 5, debido a que en los 3 casos, varias líneas hemicigotas del mismo gen afectado por el T-DNA mostraron fenotipos diferentes entre sí. Esto podría ser debido a posibles inserciones no registradas ni aún localizadas, que fueran las verdaderas responsables del fenotipo, y no la inserción en el gen con el que se encuentran actualmente registradas. Por ello, ninguna de ellas fue seleccionada en el presente trabajo.

4.4. Genes seleccionados

4.4.1. Estudio del papel del gen *At4g01700*, codificante para una proteína de la familia de las quitinasas, en la longevidad de la semilla

4.4.1.1. Confirmación de la pérdida de función del gen *At4g01700* en el mutante *S9*

Visto que, tras una búsqueda bibliográfica, no se encontraron estudios previos con el mutante *S9* (renombrado en este trabajo como *cfp-1*) que aquí se trata, fue preciso en primer lugar comprobar la pérdida de función del gen *At4g01700* supuestamente afectado por la inserción de T-DNA. Dicha pérdida de función, se comprobó mediante RT-PCR semicuantitativa gracias a la combinación de cebadores (F1 y R1) que se muestra en la figura 7C. En vista a los resultados del gel para el mutante *cfp-1* y el *wt*, se confirmó, efectivamente, la pérdida de función del gen codificante para la correspondiente proteína de la familia de las quitinasas (Figura 7A).

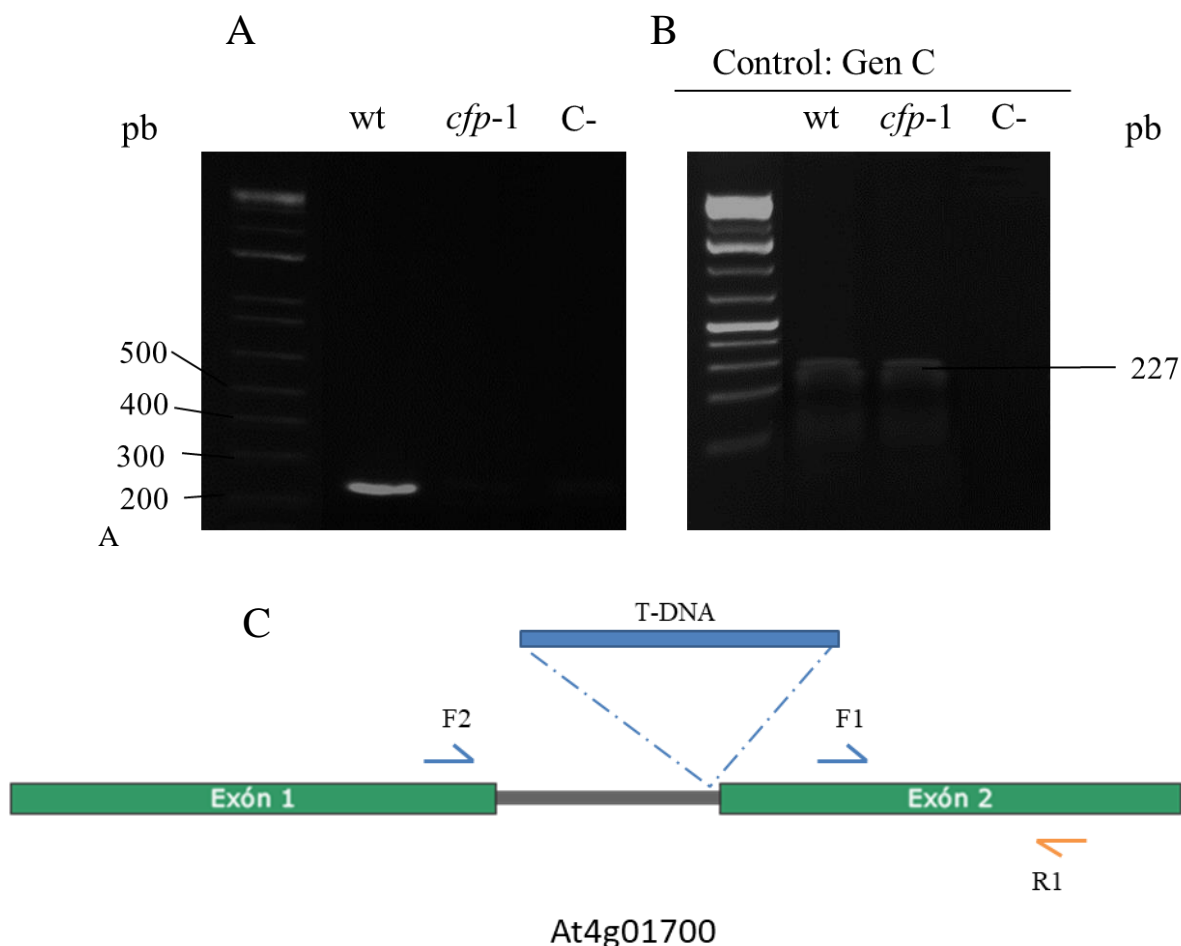


Figura 7. Confirmación de la pérdida de función del gen *At4g01700* en el mutante *cfp-1*. A) Electroforesis de los productos amplificados por RT PCR semicuantitativa a partir de cDNA *wt* y mutante. La banda de amplificación visible en el *wt* es la correspondiente al empleo de los cebadores F1 y R1 representados en C). B) Control de la RT PCR semicuantitativa, de las mismas muestras con los primers del gen C constitutivo. C) Esquema en el que se representa la localización del T-DNA en el mutante y la posición de los cebadores sentido (F1) y antisentido (R1) empleados en la amplificación de A). F2 representa la posición de otro cebador sentido, empleado en combinación con el antisentido R1, para la comprobación de posibles contaminaciones de DNA genómico en las muestras de otros mutantes ensayados. “wt”: *wild type*; “C-”: control negativo; “pb”: pares de bases.

l utilizar un par de cebadores hibridando en el segundo exón del gen, aguas abajo de la inserción, como se muestra en la figura 4C, se demostró una reducción visible de la expresión de dicho gen (Figura 7A). Por ello, se asumió que la presencia del T-DNA en el mutante *cfp-1* conllevaba una reducción drástica en la proteína codificada por dicho gen At4g01700 e implicando por tanto su pérdida de función ya que los niveles de transcrito son prácticamente indetectables en el mutante, a diferencia del *wt*.

4.4.1.2. **Confirmación del fenotipo**

El mutante *cfp-1*, portando una inserción en el gen At4g01700, había sido seleccionado para su estudio en mayor detalle debido a su menor tasa de cotiledones verdes respecto al *wild type* (8,5% respecto a 33,3%), como se mostró en el resultado anterior del *screening* inicial por CDT (ver Figura 5).

4.4.1.2.1. **Confirmación mediante EPPO con humedad baja**

Para llevar a cabo la confirmación de dicho fenotipo de mayor sensibilidad, se llevó a cabo un ensayo de envejecimiento acelerado mediante alta presión de oxígeno (EPPO), tratamiento seguido en el GWAS gracias al cual se habían preseleccionado este locus y el presente gen. Los 5 bares de sobrepresión de oxígeno aplicados inicialmente durante 5 meses, con una humedad relativa baja, resultaron ser un tratamiento relativamente suave, menos agresivo que el realizado por CDT. El conteo se llevó a cabo en este caso a los 4 días post-siembra, momento en el cual ya se evidenciaba el fenotipo para los genotipos más sensibles. Sin embargo, en el caso del genotipo *cfp-1*, el fenotipo del *screening* inicial no fue reproducible en este ensayo (Figura 8A), no revelándose diferencias significativas con respecto al *wild type*.

4.4.1.2.2. **Confirmación mediante CDT**

Paralelamente, se emplearon también otros 2 mutantes de inserción de T-DNA alternativos en dicho gen, denominados en este trabajo *cfp-2* y *cfp-3*. Éstos fueron incluidos en un ensayo de envejecimiento acelerado CDT de 14 días, cuyo resultado de germinación a los 7 días post-siembra se muestra en la Figura 8B. Tras dicho tratamiento, solamente el nuevo alelo *cfp-2* mostró un fenotipo de sensibilidad comparado con el *wt*. Tanto el alelo inicial del *screening*, *cfp-1*, como el nuevo alelo *cfp-3* mostraron una sensibilidad similar a la del *wt*, sin diferencias significativas. Cabe destacar que en este ensayo se emplearon semillas de una nueva generación para *cfp-1*, por lo que se demuestra que el fenotipo no se reproduce de una generación a otra.

Frente a la falta de robustez de los fenotipos observados en los distintos mutantes para dicho gen, se decidió que la implicación en la longevidad de semillas del mismo era muy poco probable y se decidió abandonar su estudio y centrar la atención en candidatos más prometedores.

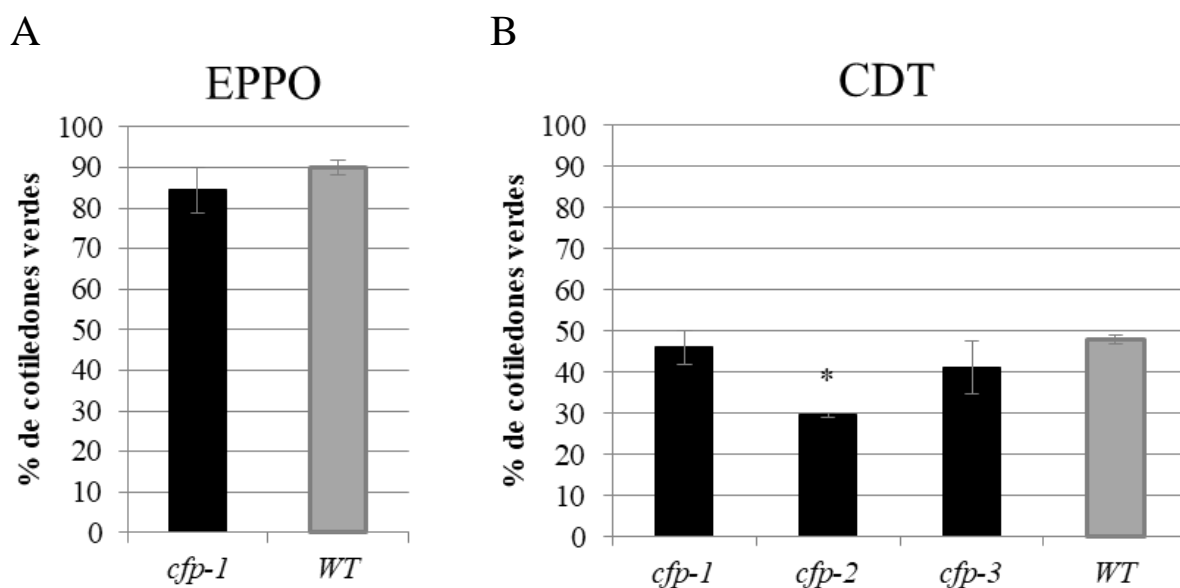


Figura 8. Ensayos de confirmación del fenotipo en la pérdida de función del gen At4g01700. **A)** Porcentaje de cotiledones verdes a los 4 días post-siembra tras tratamiento EPPO con humedad relativa baja durante 5 meses. **B)** Porcentaje de cotiledones verdes a los 7 días post-siembra tras tratamiento CDT durante 14d. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wild-type* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

4.4.2. Estudio del papel de las DHAR en la longevidad de la semilla

El gen *DHAR1* (At1g19750) codifica para una enzima del grupo de las dehidroascorbato reductasas (DHAR). Participa en el ciclo de detoxificación glutatión-ascorbato, por tanto en la eliminación de ROS. Concretamente, cataliza la reducción de dehidroascorbato a ascorbato, oxidando dos moléculas de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), por cada molécula de dehidroascorbato reducida (ver Figura 2).

DHAR1 es una de las 3 isoformas presentes en *Arabidopsis*, denominándose las otras DHAR2 y DHAR3, con diferentes sublocalizaciones celulares. DHAR1 presenta una localización celular citosólica al igual que DHAR2, pero DHAR3 es cloroplástica. También se ha sugerido la implicación de DHAR1 en el ciclo del glutatión-ascorbato del peroxisoma, implicando una adicional localización de este enzima (Ebeed *et al.*, 2018). En condiciones de estrés oxidativo, DHAR1 DHAR2 y DHAR3 presentan papeles parcialmente redundantes en la oxidación del glutatión. En trabajos previos, se comprobó que se podía llegar a reducir notoriamente la actividad DHAR sin que se apreciaran efectos en el crecimiento de la planta o en el total de ascorbato (Rahantaniaina *et al.*, 2017). No obstante, su pérdida de función combinada provoca fenotipos de daño oxidativo.

La bibliografía consultada no incluye ninguna caracterización de la función del gen *DHAR1* en semillas.

El estudio de este gen se abordó desde dos mutantes de inserción diferentes: S1, a partir de ahora referido como *dhar1-4*, y S2, previamente publicado y nombrado como *dhar1-3* (Rahantaniaina *et al.*, 2017).

4.4.2.1. Confirmación de la pérdida de función del gen *DHAR1*

Debido a la ausencia de trabajo previo con el alelo *dhar1-4*, en primer lugar se llevó a cabo la confirmación de la pérdida de función del gen en dicho mutante, con el fin de dar solidez a los siguientes ensayos. Empleando la combinación de cebadores indicada en la figura 9A, que hibridan en la región final del último exón del gen, aguas abajo de la inserción de T-DNA, se comprobó una clara reducción en la expresión de dicho gen DHAR1 respecto al *wild-type*. Por lo tanto, se asume el *knock-down* en dicho gen para el mutante *dhar1-4* (Figura 9B).

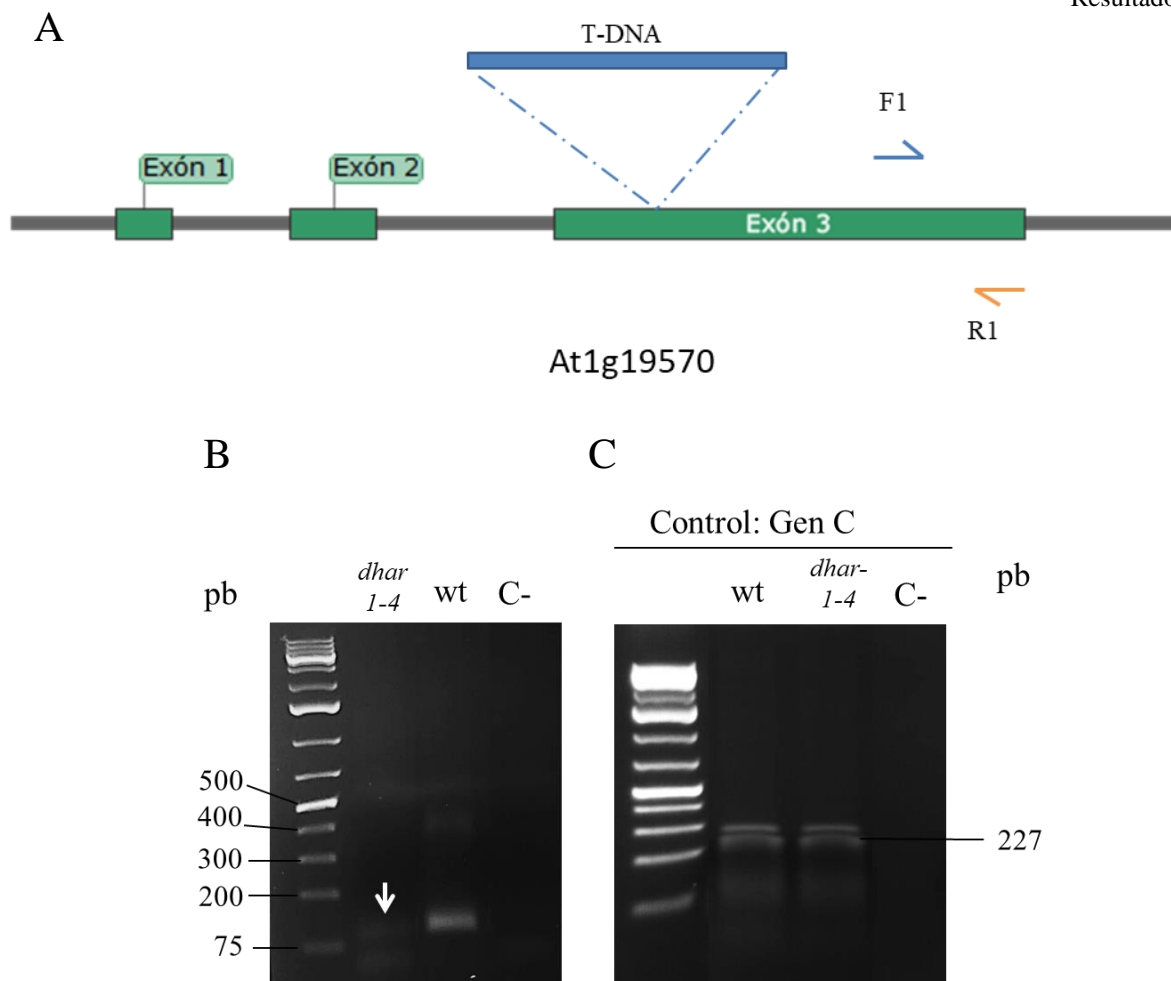


Figura 9. Confirmación de la pérdida de función del gen At1g19570 en el mutante *dhar1-4*. **A)** Esquema en el que se representa la localización del T-DNA en el mutante y la posición de los cebadores sentido (F1) y antisentido (R1) empleados en la amplificación. **B)** Electroforesis de los productos amplificados por RT PCR semicuantitativa a partir de cDNA *wt* y mutante. La banda de amplificación visible en el *wt* y señalada con una flecha y menos visible en el mutante es la correspondiente al empleo de los cebadores anteriormente representados. **C)** Control de la RT PCR semicuantitativa, de las mismas muestras con los cebadores del gen C constitutivo. “*wt*”: *wild type*; “*C-*”: control negativo; “*pb*”: pares de bases.

4.4.2.2. Confirmación del fenotipo

4.4.2.2.1. Confirmación mediante EPPO con humedad baja

Al igual que para el mutante anterior, en primer lugar se llevó a cabo un ensayo de envejecimiento acelerado mediante alta presión de oxígeno (EPPO) con semillas de los dos alelos mutantes de pérdida de función del gen *DHAR1* (*dhar1-3* y *dhar1-4*), con el fin de comprobar que el fenotipo de mayor sensibilidad se confirmaba en las mismas condiciones del GWAS. Dado que en *Arabidopsis* hay tres genes que codifican para DHARs, se quiso comprobar si el fenotipo de sensibilidad de *dhar1* es propio de esta la *DHAR1*, citosólica y peroxisomal, o bien si es reproducible en ausencia de la isoforma citosólica *DHAR2* o en la de la cloroplástica *DHAR3*. Por ello, se pidieron semillas de mutantes de pérdida de función para dichos genes, así como para el doble y el triple

mutante *dhar2 dhar3* y *dhar1 dhar2 dhar3*, respectivamente (Rahantaniaina *et al.*, 2017), y se incluyeron en el presente ensayo.

A diferencia del mutante anterior, los resultados del tratamiento EPPO sí que reflejaron una mayor sensibilidad que el *wt* al contar el porcentaje de cotiledones verdes a los 4 días post-siembra en casi todos los genotipos ensayados (Figura 10), lo que apunta a una potencial implicación de los genes *DHAR* en la longevidad de semillas.

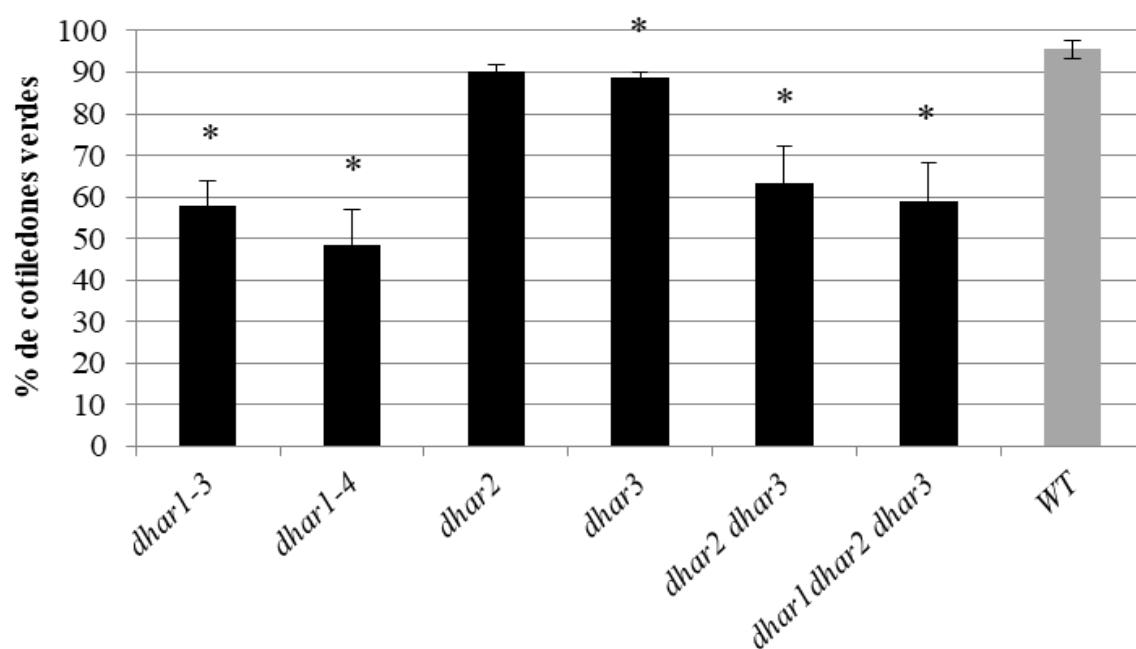


Figura 10. Confirmación del fenotipo en la pérdida de función del gen At1g19570 (*DHAR1*) y otros *DHARs* mediante tratamiento EPPO de sobrepresión de 5 bares de oxígeno manteniendo HR baja. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los 4 días post-siembra tras 5 meses de tratamiento. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wild-type* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

4.4.2.2.2. Confirmación mediante EPPO con humedad muy baja

Paralelamente, se quiso comprobar el efecto que el oxígeno ejercía en el envejecimiento artificial de las semillas, aislándolo del factor humedad. Es por ello que se planteó, únicamente para el mutante *dhar1-4*, un ensayo EPPO alternativo en una cámara con los mismos 5 bares de presión de oxígeno pero con una humedad relativa mínima, de aproximadamente el 10%. Los resultados obtenidos apuntan a una escasa agresividad del tratamiento, que tan solo muestra las diferencias entre *dhar1-4* y *wt* tras los 9 meses, siendo de nuevo el mutante más sensible (figura 11A).

En este punto se comprobó que las semillas de *Arabidopsis* no sufrían daños ó roturas en su cubierta como consecuencia de la sobrepresión a la que estaban sometidas durante el tratamiento EPPO. Para ello se observó el aspecto de las semillas con ayuda de una lupa. Como se muestra en la

Figura 11B, ni las semillas *wt* ni las del mutante *dhar1-4* mostraron daños aparentes en la cubierta. Asimismo, la morfología de las semillas mutantes a la lupa resultó muy similar a la del *wt*.

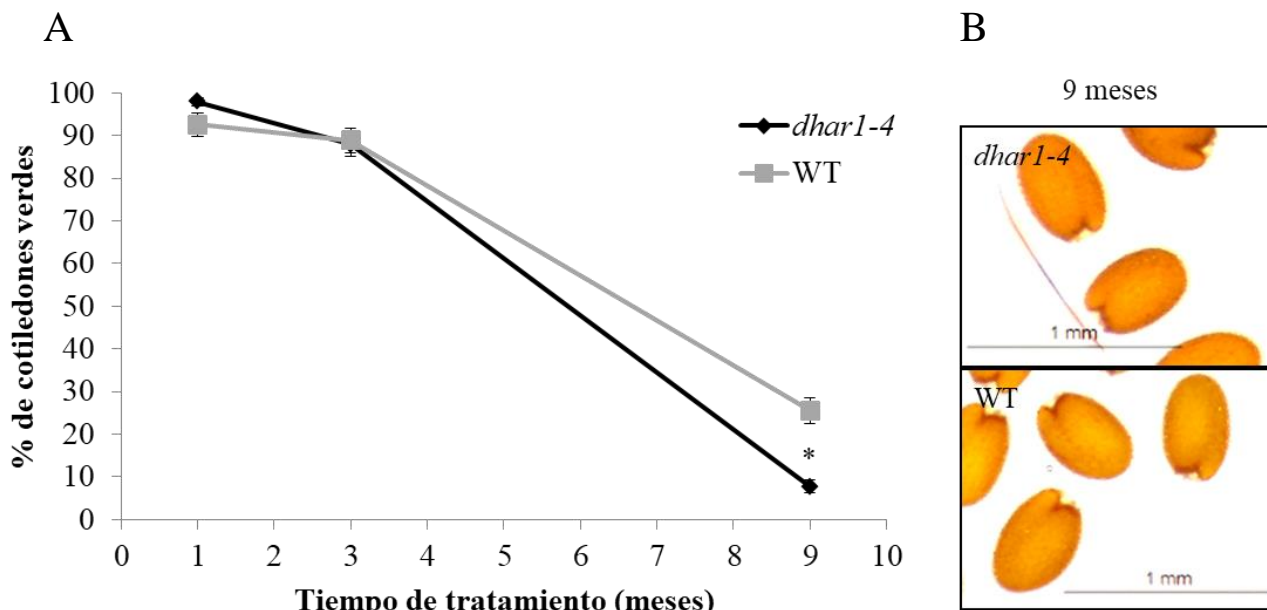


Figura 11. Fenotipo de *dhar1-4* tras tratamiento de envejecimiento acelerado EPPO con HR muy baja. A) Porcentaje de cotiledones verdes a los diferentes tiempos (1, 3 y 9 meses) de tratamiento EPPO con HR muy baja a los 4 días post-siembra de las semillas *dhar1-4* y *wt*. Cada punto representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wt* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. B) Morfología de las semillas del mutante *dhar1-4* y *wt* tras 9 meses en la cámara con 5 bares de presión

4.4.2.2.3. Confirmación mediante CDT

Finalmente, se comprobó la longevidad de los diferentes mutantes *dhar* mediante el ensayo CDT, aplicando humedad y temperatura. Transcurridos los 14 días de tratamiento, de nuevo los mismos genotipos que en el ensayo de oxígeno muestran significativamente mayor sensibilidad al envejecimiento que el *wt* (figura 12), salvo *dhar1-4*, que al igual que en el *screening* inicial con CDT, desciende su germinación pero no de manera significativa con respecto al *wt*.

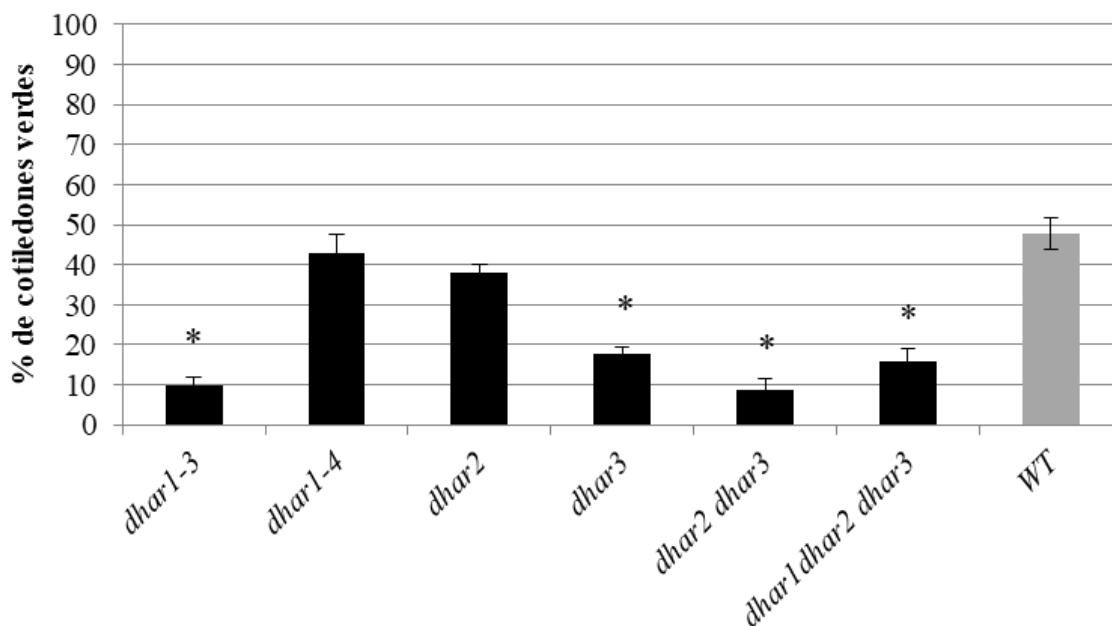


Figura 12. Ensayo de confirmación del fenotipo en la pérdida de función del gen At1g19570 (*DHAR1*) y otros *DHARs* mediante tratamiento CDT. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los 7 días post-siembra tras 14 días de tratamiento. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wild-type* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*.

Cabe señalar que las posibles diferencias entre los fenotipos de los mutantes *dhar1-3* y *dhar1-4* pueden deberse a posibles inserciones adicionales en el genoma del mutante *dhar1-4*, que provoquen mutaciones que compensen el efecto de sensibilidad teóricamente producido por la pérdida de la funcionalidad de la proteína DHAR1.

Tomando juntos estos resultados, se demuestra que el fenotipo de mayor sensibilidad ante el envejecimiento de los mutantes de pérdida de función en los genes *DHAR* se confirma y es reproducible, no sólo con el ensayo de envejecimiento por oxígeno EPPO, sino también mediante otro tratamiento de envejecimiento acelerado como es el CDT. Estos resultados muestran, por tanto que el correcto funcionamiento de las DHAR es fundamental para la longevidad de las semillas de *Arabidopsis*.

4.4.3. Estudio del papel del factor de transcripción DOF4.1 en la longevidad de la semilla

El gen *DOF4.1* (At4g00940) codifica para un factor de transcripción de la familia DOF (*DNA-Binding One Zinc Finger*). Estos factores de transcripción resultan específicos de plantas (Riechmann *et al.*, 2000), encontrándose tanto en plantas inferiores como *Physcomitrella patens* como en angiospermas y gimnospermas. La característica principal de las proteínas DOF es que presentan un dominio de unión al DNA cercano a la posición N-terminal compuesto por 52 residuos aminoacídicos altamente conservados, de secuencia $CX_2CX_{12}CX_2C$ (Noguero *et al.*, 2013). Dicha secuencia se une a un átomo de zinc, conformando la estructura típica de “dedo de zinc” (Figura 13). Prácticamente todos los miembros de la familia comparten la secuencia de reconocimiento AAAG (o su homóloga, CTTT) en el DNA, pudiéndose unir a uno o varios de estos motivos de los promotores de los genes cuya expresión controlan (Yanagisawa and Schmidt, 1999). La unión a dichas secuencias por parte de los DOF resulta finalmente en una acción activadora, represora o coactivadora de la expresión de los genes bajo su regulación, dependiendo de la proteína DOF y, en algunos casos, también según el gen diana.

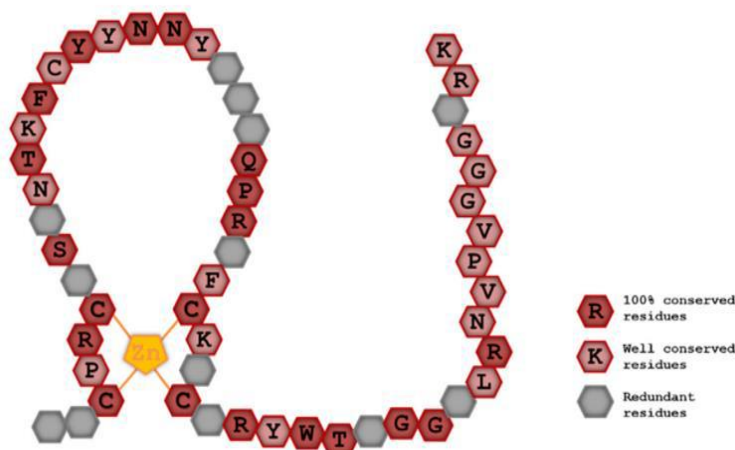


Figura 13. Representación esquemática de la estructura de los factores de transcripción tipo DOF. Residuos conservados hasta un 75% representados en rojo; residuos menos conservados en gris. Adaptado de Noguero *et al.* (2013)

Tras el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los diferentes DOF de distintas especies, realizado por Yanagisawa en 2002, se pudo obtener un árbol filogenético con el que clasificar los factores de transcripción DOF según su divergencia evolutiva (Figura 14). En él, se diferencian 7 grupos de proteínas DOF, con motivos conservados en sus secuencias de aminoácidos dentro de cada grupo.

DOF4.1 pertenece al grupo III, siendo las proteínas DOF3.7 y DOF2.5 los DOF de *Arabidopsis* más cercanos dentro del mismo grupo, ambos con funciones en semilla, como se comentará a continuación.

Las funciones fisiológicas que controlan las DOF, al regular la expresión de sus genes diana, son muy variadas. Además, cada DOF puede participar en regulación de genes implicados en procesos distintos. Algunos DOF han sido caracterizados por su papel en diferenciación celular. Este es el caso de DOF1, el primer DOF identificado, que en maíz reprime el desarrollo del polen, pero también se encuentra implicado en procesos de regulación del metabolismo (Yanagisawa, 2000; Xiyang Chen *et al.*, 2012). Otros DOF cumplen importantes funciones en semilla. La proteína *DOF Affecting Germination 1* (DAG1 o DOF3.7) participa concretamente en su germinación. Su actividad está mediada por la luz, y actúa regulando negativamente la síntesis de giberelinas al reprimir al gen *AtGA3ox1* (Gabriele *et al.*, 2010). La diferenciación de la testa se ve igualmente regulada por el gen *DAG1*, y se ha probado que su pérdida de función reduce la dormancia y produce anomalías en el embrión (Papi *et al.*, 2000; Papi *et al.*, 2002). Su homólogo *DAG2* (*DOF2.5*), regulado negativamente por *DAG1*, tiene papeles opuestos, con elevada dormancia y reducción de la sensibilidad a giberelinas en la pérdida de función (Santopolo *et al.*, 2015). También en semilla se ha observado que la sobreexpresión de *COG1* (*DOF1.5*), de manera mediada por la luz, incrementa los niveles de giberelinas en la semilla, y su cubierta posee una capa de suberina engrosada. Esto conlleva un incremento en la longevidad de la semilla al sobreexpresar dicho gen (Park *et al.*, 2003; Bueso *et al.*, 2016).

Con respecto a DOF4.1, ha sido previamente caracterizado por su función reprimiendo el tamaño final que pueden llegar a alcanzar los órganos vegetales (Ahmad *et al.*, 2013). Aunque en plantas de *Arabidopsis* con pérdida de función para el gen no se apreciaron diferencias significativas en el desarrollo con respecto al *wild type*, sí se observó fenotipo al sobreexpresarse. En plantas sobreexpresando *DOF4.1* se detectó un fenotipo de crecimiento retardado, con retraso en la producción de hojas y floración tardía. También las sílicuas eran más pequeñas y producían menor número de semillas. Se ha demostrado una fuerte expresión en la vasculatura de hojas en desarrollo y raíces. Por otra parte, esta proteína, también es conocida como *Intercellular Trafficking DOF 1* (ITD) y presenta un motivo de tráfico intercelular que le permite su transporte célula a célula (Chen *et al.*, 2013).

Por lo tanto, la bibliografía previa muestra la participación de diferentes DOF en múltiples procesos fisiológicos. Asimismo, dos de las proteínas más cercanas a DOF4.1 tienen funciones relevantes para la semilla. Por todo ello, *a priori* DOF4.1 parece un buen gen candidato a estar implicado en la longevidad de las semillas.

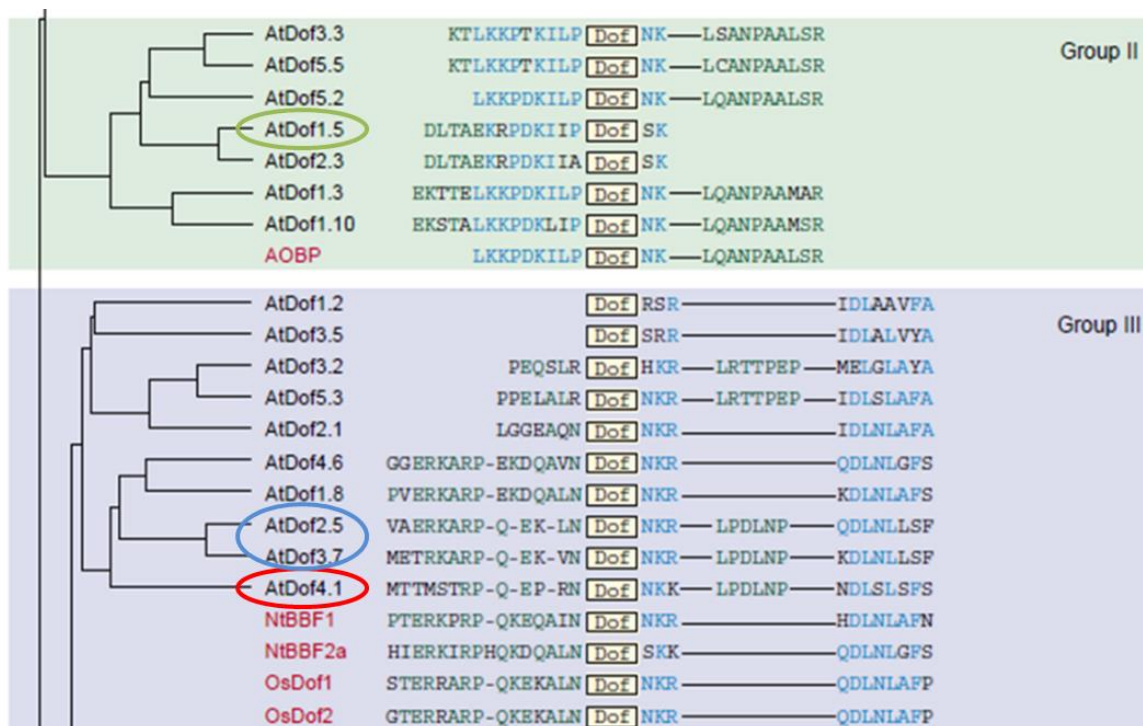


Figura 14. Árbol filogenético con secuencias proteicas de los grupos II y II de la familia de factores de transcripción DOF alineadas sobre el dominio de unión DOF. Las letras en azul corresponden a motivos conservados entre grupos; con barras las secuencias no homólogas entre motivos. Los nombres en rojo corresponden a otras especies. At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Nt: *Nicotiana tabacum*. Adaptado de Yanagisawa (2002). Rodeada en rojo la posición del factor de transcripción DOF4.1 en dicho árbol; en azul la de DAG1 (AtDof3.7) y DAG2 (AtDof2.5) y en verde la de COG1 (AtDof1.5)

De manera similar a en los casos anteriores, el estudio de este gen se abordó desde dos alelos mutantes de inserción diferentes: S6, a partir de ahora referido como *dof4.1-1* (Ahmad *et al.*, 2013), y G2, renombrado como *dof4.1-3*, ya que previamente había sido publicado otro alelo mutante que consideraríamos *dof4.1-2* (referencia).

4.4.3.1. Confirmación de la pérdida de función del gen *DOF4.1*

4.4.3.1.1. Confirmación de la pérdida de función del gen en el mutante *dof4.1-1*

Para comprobar la pérdida de función del gen *DOF4.1* en el mutante *dof4.1-1*, se planteó en primer lugar realizar una RT-PCR semicuantitativa empleando cebadores que hibridaran en un exón del locus del gen aguas abajo de la inserción de T-DNA (2° exón., Figura 15A cebadores F1 y R1). La ausencia de banda en el mutante demostraría directamente la pérdida de función. El resultado de dicha amplificación fue, no obstante, una banda en el genotipo mutante, de igual intensidad que la del *wt*, implicando que de alguna manera la inserción permite aun así la transcripción del gen *DOF4.1*, o al menos, del producto transcripcional del 2° exón (Figura 15B). Visto este resultado y considerando que la inserción se encuentra en un intrón, se quiso conocer si el *splicing* de dicho intrón, se realizaba con normalidad en el mutante o, por el contrario, existía algún tipo de anomalía a este nivel (combinación de cebadores F2 y R1 en figura 10A). Como se muestra en la figura 15C, no se apreció la banda del tamaño del *wt* en el mutante, luego el inserto altera al correcto *splicing* del gen. Por ello, se quiso conocer si en el mutante se producían transcritos que contuvieran la secuencia del T-DNA. Utilizando un par de cebadores que hibridaran en el inserto de T-DNA y en el 2° exón como se muestra en la figura 10A, FT y R2, se obtuvo una banda producto de amplificación (Figura 15D), lo que implica que en el mensajero se incluye la secuencia exógena. Por último, se comprobó que esta conclusión no fuera errónea y consecuencia de contaminación por DNA genómico, empleando un par de cebadores (F2 y R1 de *CFP*, ver figura 15C) que hibridasen en otro locus distinto y diferencialmente en cDNA y DNA genómico, ya que incluye un intrón entre dichos cebadores. Como se muestra en la Figura 15E, la muestra no estaba contaminada con DNA genómico. Dicho resultado, en conjunto con los anteriores, permite concluir que el mutante *dof4.1-1* sigue produciendo un transcrito del gen *DOF4.1* pero con la secuencia del T-DNA incluida, por lo que se asume su disfunción a nivel posterior, de proteína.

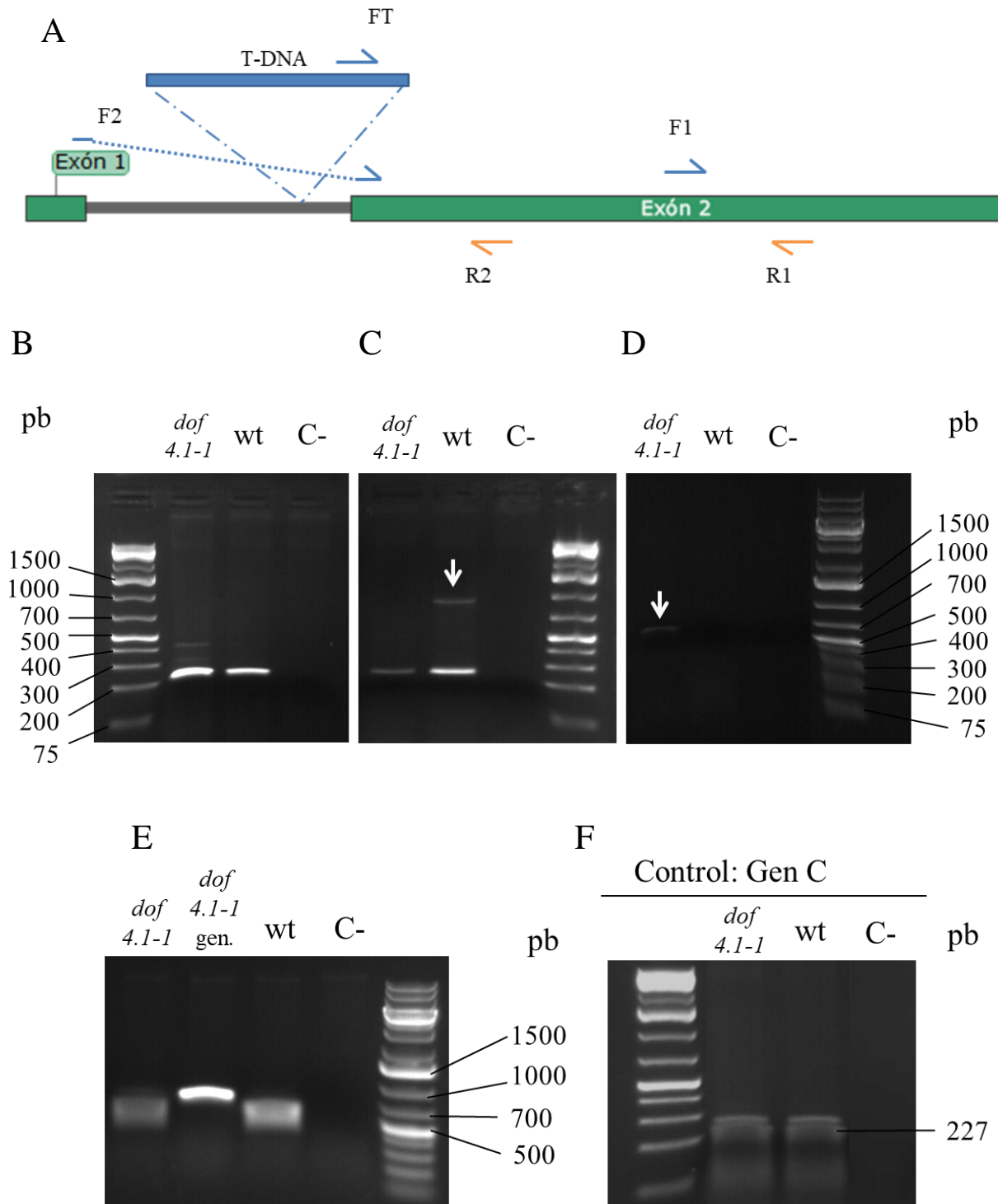
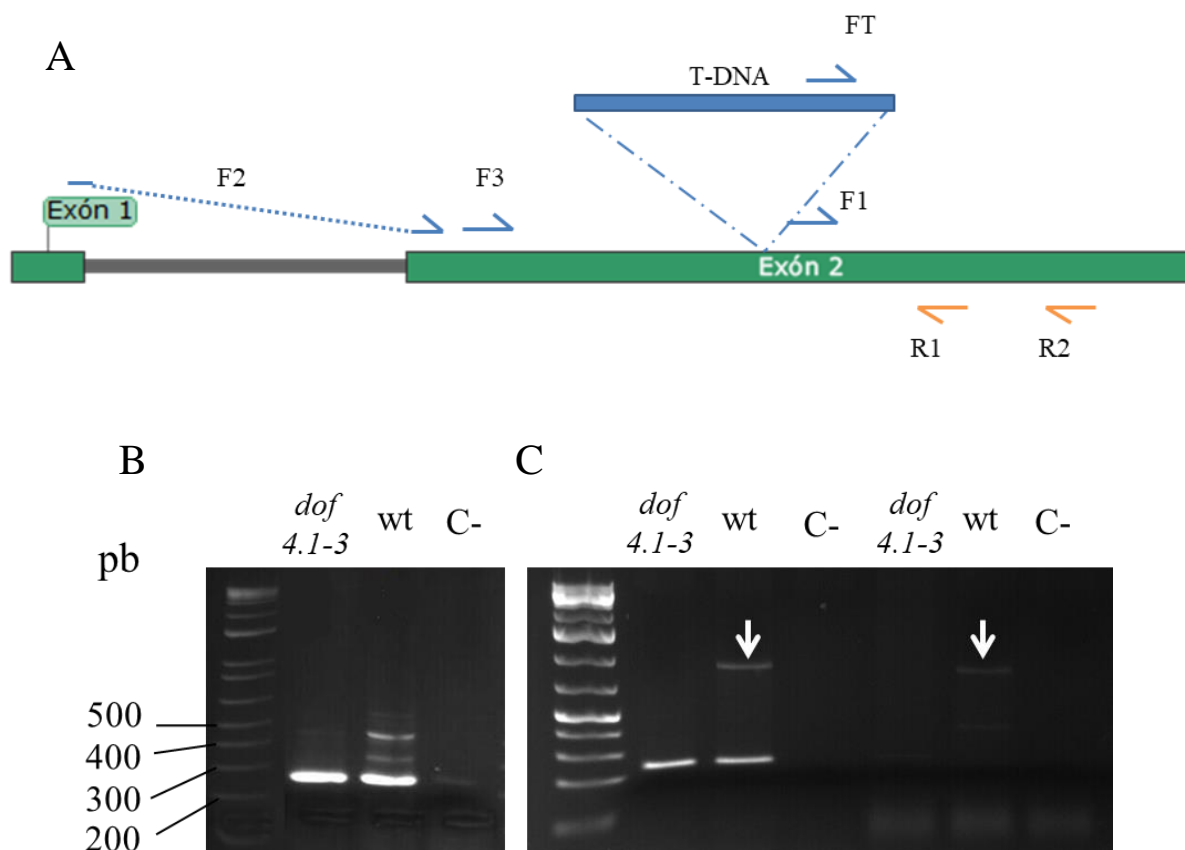


Figura 3. Confirmación de la pérdida de función del gen At4g00940 en el mutante *dof4.1-1*. **A)** Esquema en el que se representa la localización del T-DNA en el mutante y la posición de los cebadores. **B)** Electroforesis de los productos amplificados por RT PCR semicuantitativa a partir de cDNA *wt* y mutante con los cebadores F1 y R1, con los cebadores F2 y R1 (**C**) y con los cebadores FT y R2 (**D**). **E)** Electroforesis comprobación de la presencia de material genómico. Amplificación a partir de cDNA *wt* y mutante con cebadores hibridando en otro gen. **F)** Control de la RT PCR semicuantitativa, de las mismas muestras con los cebadores del gen C constitutivo. Las flechas señalan la banda del producto de amplificación específico de la combinación citada de cebadores en el caso de existir además productos inespecíficos. “wt”: *wild type*; “C-”: control negativo; “pb”: pares de bases

4.4.3.1.2. CONFIRMACIÓN DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DEL MUTANTE *dof4.1-3*

En el caso del *dof4.1-3* y al igual que con el resto de mutantes, se comprobó en primer lugar si se detectaba transcripción aguas abajo de la inserción de T-DNA (Figura 16A, cebadores F1 y R1 y Figura 16B). A continuación, las combinaciones de cebadores F2 y R1, y F3 y R1, que rodean al T-DNA, demostraron que el transcrito de este gen era, por lo menos anómalo, puesto que como se muestra en la figura 16C, no se aprecia en el mutante una banda de amplificación de peso molecular equivalente al del *wt*. Seguidamente, se demostró la presencia de T-DNA en el producto transcripcional de *dof4.1-3* (Figura 16D, empleando los cebadores FT y R2, figura 16A). Finalmente, se confirmó la ausencia de contaminación de DNA genómico en las muestras de cDNA del mutante y *wt*, empleando cebadores correspondientes a otro gen (gen *CFP*, cebadores F2 y R1, ver figura 7C), entre los cuales se encuentra un intrón (Figura 16E)

Por lo tanto, de manera análoga al razonamiento del mutante anterior, estos resultados permiten concluir que el mutante *dof4.1-3* no sintetizará la proteína DOF4.1 funcional, ya que aunque sí que produce su transcrito, éste incluye la secuencia del T-DNA.



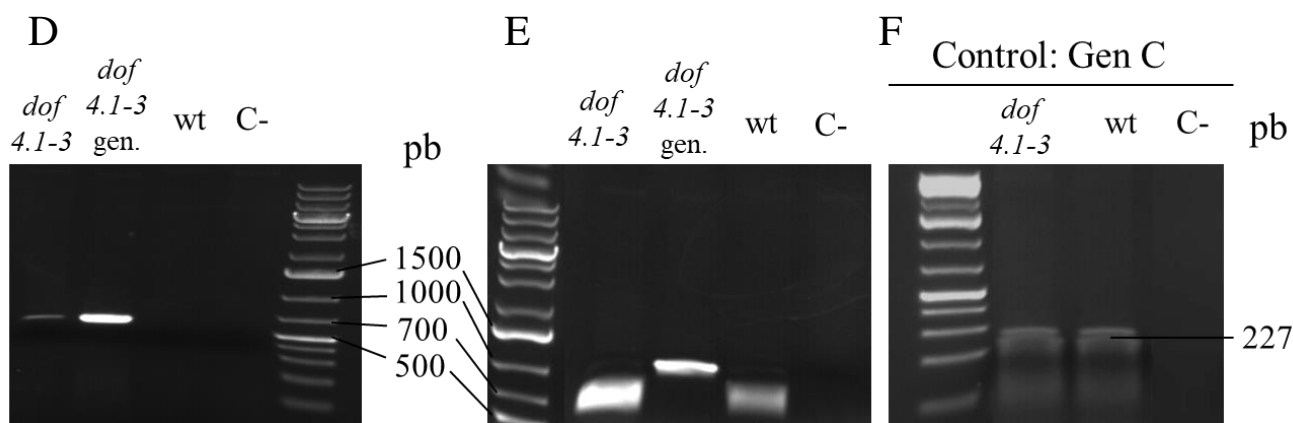


Figura 16. Confirmación de la pérdida de función del gen At4g00940 en el mutante *dof4.1-3*. A) Esquema en el que se representa la localización del T-DNA en el mutante y la posición de los cebadores. B) Electroforesis de los productos amplificados por RT PCR semicuantitativa a partir de cDNA *wt* y mutante con los cebadores F1 y R1, con los cebadores F2 y R1 (C) y con los cebadores FT y R2 (D). E) Electroforesis comprobación de material genómico. Amplificación a partir de cDNA *wt* y mutante con cebadores hibridando en otro gen. F) Control de la RT PCR semicuantitativa, de las mismas muestras con los cebadores del gen C constitutivo. Las flechas señalan la banda del producto de amplificación específico de la combinación citada de cebadores en el caso de existir además productos inespecíficos. “*wt*”: *wild type*; “*C-*”: control negativo; “*pb*”: pares de bases

4.4.3.2. Confirmación del fenotipo

A diferencia de los genes candidatos de los anteriores loci, la pérdida de función del gen *DOF4.1* producía una mayor resistencia al tratamiento de longevidad CDT inicialmente utilizado para el *screening* de candidatos (55 y 54% de cotiledones verdes correspondientes a *dof4.1-1* y *dof4.1-3*, respectivamente, frente al 33% del *wt*).

4.4.3.2.1. Confirmación mediante EPPO con humedad baja

Al igual que se procedió en los genotipos anteriormente comentados, se llevó a cabo un ensayo de envejecimiento acelerado mediante alta presión de oxígeno (EPPO) durante 5 meses, como en el GWAS, con semillas de los dos alelos mutantes: *dof4.1-1* y *dof4.1-3* para comprobar su fenotipo de mayor resistencia al envejecimiento. Sin embargo, debido a la poca agresividad del tratamiento (genotipo silvestre apenas vio reducido su porcentaje de cotiledones verdes a los 4 días post-siembra), solamente los genotipos sensibles resaltaron, no evidenciándose el fenotipo de mayor resistencia de *dof4.1* en este caso (Figura 17).

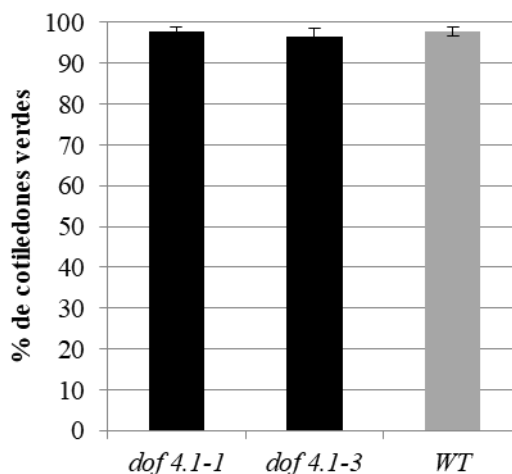


Figura 17. Fenotipo en los mutantes *dof4.1* tras tratamiento EPPO de 5 bares de presión durante 5 meses y baja humedad. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los 4 días post-siembra tras el tratamiento. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. “WT”: *wild type*.

4.4.3.2.2. Confirmación mediante EPPO con humedad muy baja

Como ya se probó con el mutantes *dhar1-4*, paralelamente se realizó un ensayo EPPO manteniendo una humedad relativa mínima de alrededor del 10%, aislando por tanto el factor oxígeno en el proceso de envejecimiento acelerado. Si bien resultó igualmente un tratamiento relativamente suave, a los 3 y 9 meses sí que permitió evidenciar el fenotipo de significativa tolerancia para el mutante *dof4.1-3* respecto al *wt* (Figura 18). Para el *dof4.1-1*, se observó una mayor resistencia que el *wt*, si bien ésta no llegó a ser de significancia estadística.

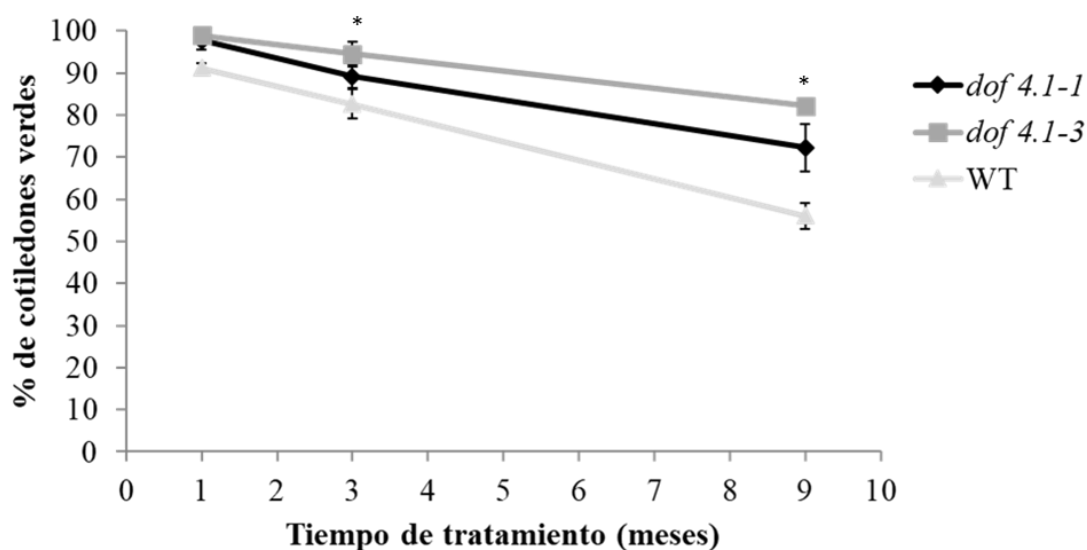


Figura 18. Fenotipo de *dof4.1-1* y *dof4.1-3* tras tratamiento de envejecimiento acelerado EPPO con HR muy baja. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los diferentes tiempos (1, 3 y 9 meses) de tratamiento a los 4 días post-siembra de las semillas *dof4.1-1*, *dof4.1-3* y *wt*. Cada punto representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wt* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

4.4.3.2.3. Confirmación mediante CDT

Asimismo, los alelos *dof4.1-1* y *dof4.1-3* se sometieron a un tratamiento de envejecimiento acelerado CDT, siendo la humedad de 75% HR y los 37°C de temperatura los factores causantes del estrés. Transcurrido dicho tiempo, el fenotipo parece confirmarse para ambos alelos de pérdida de función, si bien sólo resulta estadísticamente significativo para *dof4.1-3*, con un 92,2% frente al 72,2% del *wt* (Figura 19).

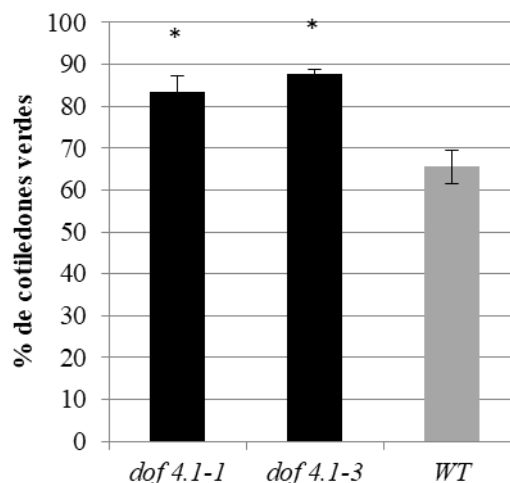


Figura 19. Fenotipo de *dof4.1-1* y *dof4.1-3* tras tratamiento de envejecimiento acelerado CDT. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los 5 días post-siembra tras 14 días de tratamiento. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wt* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

Con estos resultados, se consideró que este gen podría ser relevante para el carácter de interés y se continuó con su estudio para tratar de explicar cómo la pérdida de función de dicho factor de transcripción aumenta la longevidad de semillas.

Al tratarse DOF4.1 de un factor de transcripción cuyas dianas y papel en semilla no se conocen, se realizaron algunos ensayos para ayudar a desvelar los mecanismos que le vinculan con la longevidad de semillas.

4.4.3.3. Análisis de la expresión del gen *DOF4.1*

Primeramente, se realizó una búsqueda en la base de datos “eFP Browser” (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>). La Figura 20 muestra el patrón de expresión en los diferentes órganos de *A. thaliana* y a lo largo de los diferentes estados de desarrollo de la planta.

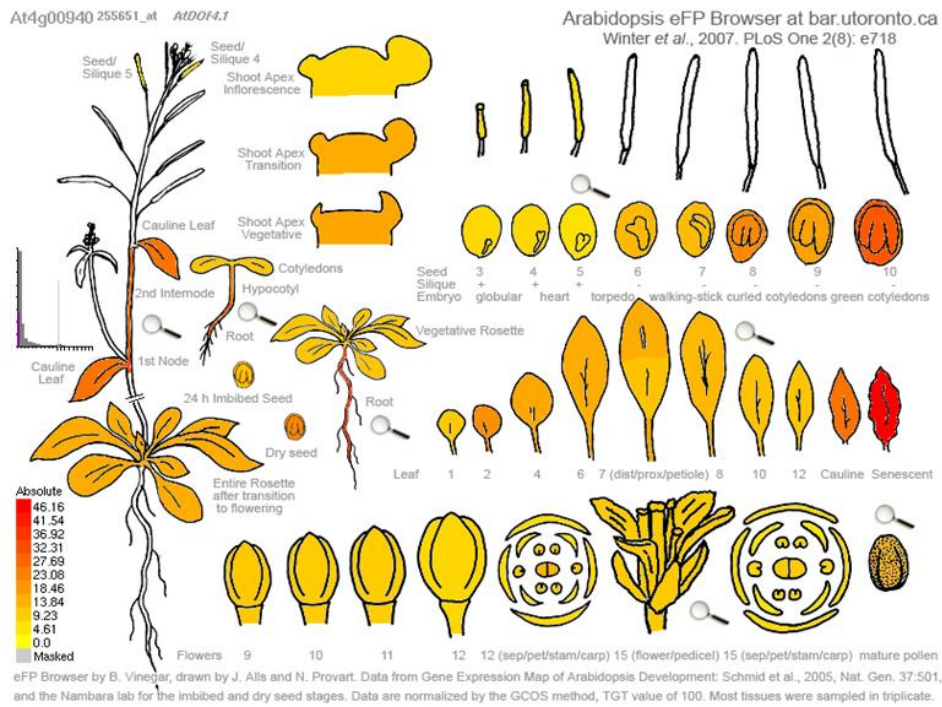


Figura 4. Patrón de expresión obtenido de eFP Browser para At4g00940 (*DOF4.1*).

Puede observarse que la expresión del gen no es muy elevada en ninguna parte de la planta, en vistas a la escala mostrada de expresión absoluta, si bien esto es lógico ya que se trata de un factor de transcripción. En la semilla, la expresión parece aumentar a medida que ésta madura, siendo más elevada en los días 8 y 10 después de la polinización.

Para determinar de manera más precisa el nivel de expresión de *DOF4.1* en semilla, se realizó una qRT-PCR a partir de RNA extraído de semillas a lo largo de su desarrollo desde la polinización (Figura 21).

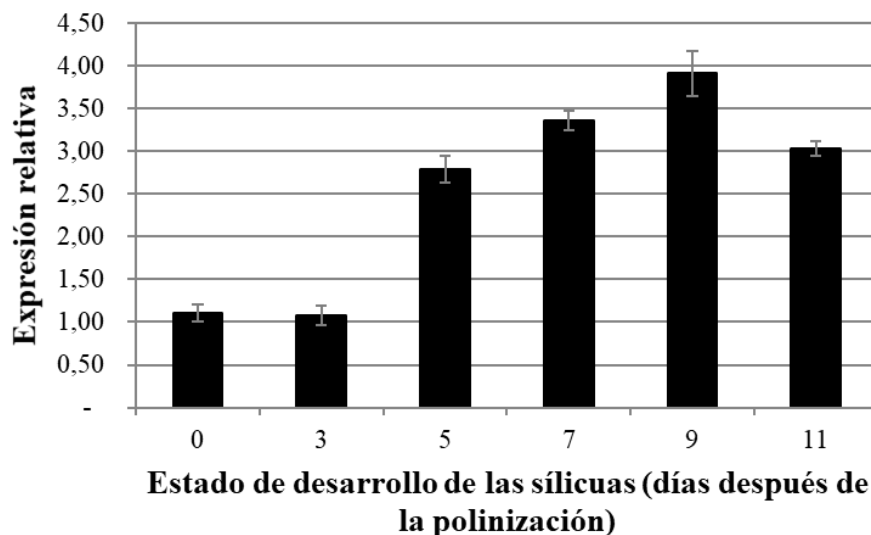


Figura 5. Niveles relativos de expresión del transcrito *DOF4.1* en el genotipo silvestre Col0 a lo largo de diferentes tiempos de desarrollo de la semilla. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas.

En vistas de los resultados de dicho análisis, se pudo comprobar que efectivamente los niveles de expresión relativa aumentaban conforme la semilla se iba desarrollando, alcanzando un pico de máxima expresión al día 9 después de la polinización. Dichos datos serán de utilidad como partida del análisis transcriptómico por RNASeq presentado más adelante en el Apartado 4.4.3.5.

4.4.3.4. Caracterización fenotípica de los mutantes *dof4.1*

4.4.3.4.1. Ensayo de aparición de cotiledones verdes ante diferentes condiciones estresantes del medio

Debido a la escasa información previa sobre los fenotipos causados por la pérdida de función del gen *DOF4.1*, se decidió fenotipar los mutantes de pérdida de función con ensayos de aparición de cotiledones en presencia de algunos estreses abióticos. Asimismo, se estudió también la situación del balance hormonal más importante en la germinación, que implica una respuesta adecuada a ABA y giberelinas, en dichos mutantes *dof4.1-1* y *dof4.1-3* (Figura 22).

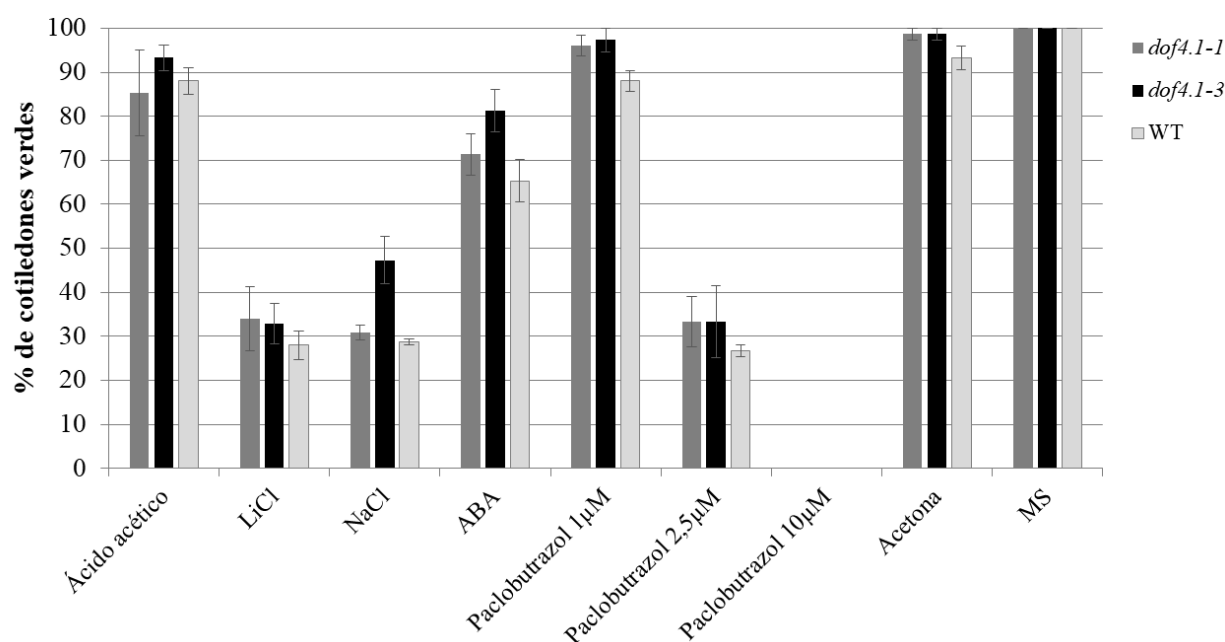


Figura 22. Fenotipo de los genotipos mutantes *dof4.1-1* y *dof4.1-3* en presencia de diferentes estreses abióticos: ácido acético 4 mM, paraquat 0,7 µM, LiCl 20 mM, NaCl 125 mM, ABA 0,8 µM, paclobutrazol 1, 2,5 y 10 µM (en acetona). El medio con acetona 0,46 M se tomó como control del ensayo con paclobutrazol. Se muestra el porcentaje de cotiledones verdes a los 5 días post-siembra en el caso del ácido acético, NaCl y MS, 7 días para LiCl, paclobutrazol y acetona, 9 para el paraquat y 11 para el ABA. Cada columna representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas. “WT”: *wild type*

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de función de *DOF4.1* a pesar de ser más tolerante a envejecimiento acelerado, no implica una mayor resistencia a los demás estreses ensayados.

4.4.3.4.2. Estudio de la permeabilidad de la cubierta de la semilla

Se ha descrito que una reducción en la permeabilidad de la cubierta de la semilla a factores externos tales como agua u oxígeno, que llevarían a una producción final de ROS y al consecuente daño del embrión, puede provocar un aumento su longevidad (Finkelstein *et al.*, 2008; Bueso *et al.*, 2014). Por lo tanto, se quiso comprobar si el fenotipo de tolerancia a envejecimiento acelerado observado en los mutantes de pérdida de función de *DOF4.1*, se debía a una alteración en permeabilidad de su cubierta. Con este objetivo, se plantearon 2 ensayos: tinción de la capa de suberina de la cubierta y permeabilidad a sales de tetrazolio.

4.4.3.4.2.1. Tinción de la capa de suberina

De acuerdo a su papel como barrera impermeable, una capa de suberina de mayor grosor otorgaría *a priori* mayor impermeabilidad a la cubierta de la semilla y, con ello, mayor protección ante agentes externos dañinos. Tras su tinción, se pudo visualizar su presencia en los mutantes *dof4.1-1* y *dof4.1-3*, aunque no se apreciaron diferencias entre las pérdidas de función de *DOF4.1* y el *wild type* (Figura 23).

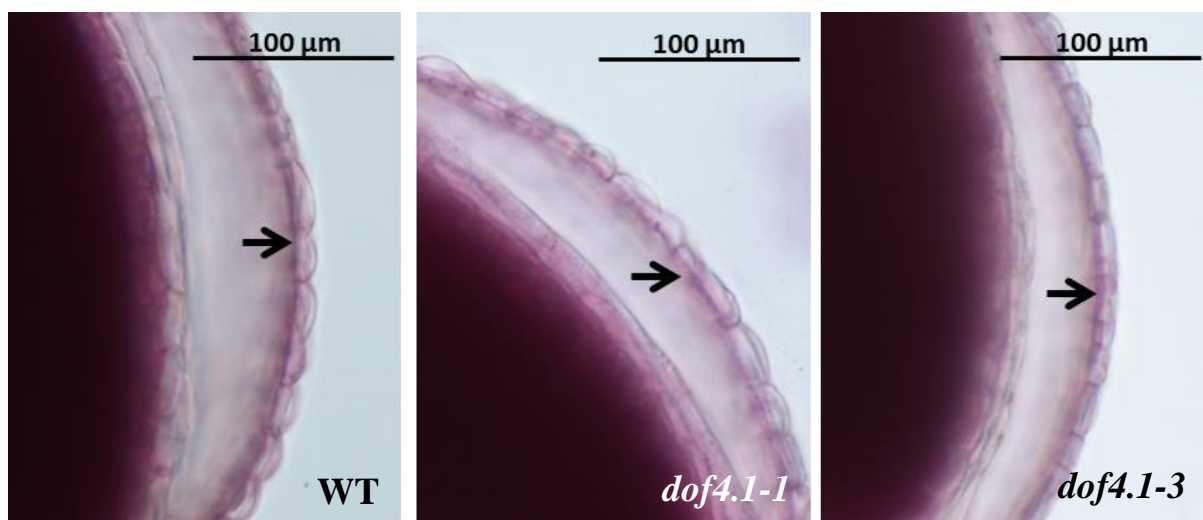


Figura 23. Semillas de los mutantes *dof4.1-1*, *dof4.1-3* y del WT (Col0) tras tinción con Sudan Red 7B. La flecha indica la capa de suberina. “WT”: *wild type*. Objetivo empleado: 20X; tiempo de exposición: 20 ms.

4.4.3.4.2.2. Medida de la permeabilidad a las sales de tetrazolio

Con el fin de cuantificar la permeabilidad de la cubierta de las semillas, se midió la entrada de sales de tetrazolio al interior de la misma. Estas sales de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), incoloras en disolución acuosa, son reducidas a formazano en el interior de la semilla gracias a la acción de las dehidrogenasas celulares, dando lugar a un precipitado de color rojizo e insoluble en agua. La absorbancia del producto final de extracción con etanol a partir de las semillas molidas informará de una mayor o menor permeabilidad de la cubierta. Cuanto mayor sea dicha absorbancia, mayor cantidad de tetrazolio habrá entrado en la semilla (más permeable). Los resultados de dichas mediciones se muestran en la figura 24.

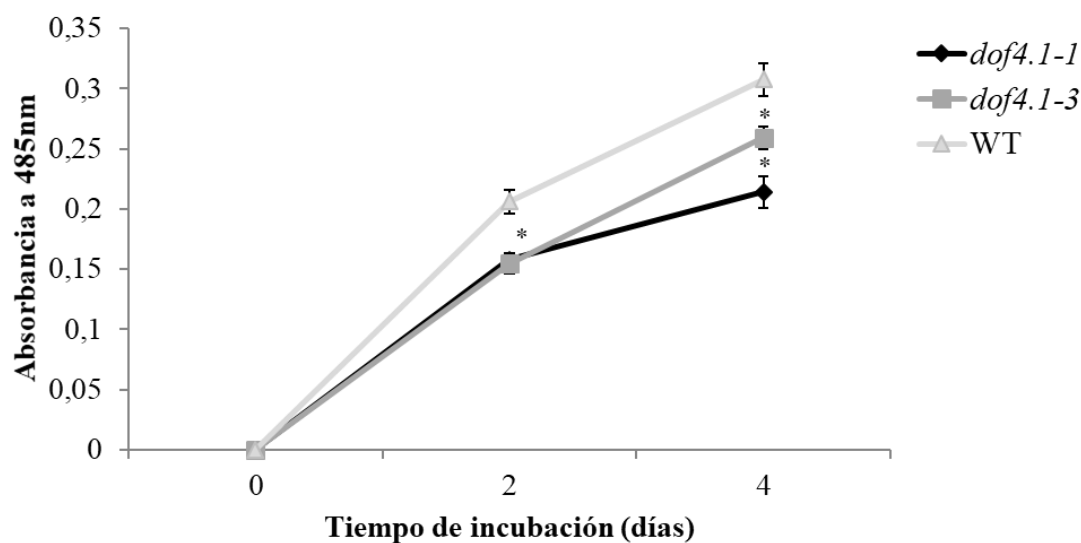


Figura 24. Permeabilidad de la pérdida de función de DOF4.1 a sales de tetrazolio. Se muestra la absorbancia a 485 nm de los distintos genotipos a los diferentes tiempos de incubación (0, 2 y 4 días) en una solución de tetrazolio al 1%. Cada punto representa la media y error estándar de 3 repeticiones biológicas y 2 repeticiones técnicas. El asterisco (*) simboliza que existe una diferencia significativa entre la media del mutante y la del *wt* con un *p-value* menor al 0,05 en la prueba *t-student*. “WT”: *wild type*.

Como se puede observar, a los 2 días de incubación los genotipos mutantes muestran ya una ligera menor permeabilidad que el *wt*, diferencia más evidenciada a los 4 días de incubación en la solución de tetrazolio, para los cuales el genotipo *dof4.1-1* muestra la menor permeabilidad.

En vista de estos resultados, parece que las diferencias en permeabilidad entre los mutantes y el *wt*, a pesar de no ser muy drásticas, podrían contribuir parcialmente al fenotipo de mayor longevidad observado en los mutantes.

4.4.3.5. Análisis transcriptómico

Debido a que la proteína DOF4.1 es un factor de transcripción, es previsible un perfil transcripcional diferencial entre un genotipo silvestre y la pérdida de función del gen. Con el fin de conocer estas diferencias a nivel de RNA entre el mutante y el genotipo silvestre, y así arrojar algo de luz sobre el posible papel de DOF4.1 en la longevidad de semillas, se llevó a cabo un análisis RNAseq a partir de RNA extraído de semilla en desarrollo. Concretamente, se emplearon semillas tomadas 9 días post-polinización (momento de máxima expresión en semilla de *DOF4.1* según los datos del Apartado 4.4.3.3). Se eligió el alelo *dof4.1-3* para el RNASeq al encontrarse la inserción de T-DNA en un exón y también debido a que los datos técnicos consultados sobre dicho mutante GABI-KAT garantizaban la presencia de una única inserción de T-DNA en su genoma. Por el contrario, el mutante *dof4.1-1* presentaba la inserción en un intrón y además podría incluir más inserciones, ya que no se garantizaba dicha exclusividad.

Una vez comprobada la calidad del RNA extraído a partir de semilla mediante electroforesis y bioanalyzer, se llevó a cabo el RNAseq, con las premisas marcadas en el apartado 3.6.6.6.

En primer lugar, se determinó que había 882 genes que variaban significativamente su expresión (adjusted pvalue <0,05) : 259 veían inducida su expresión en el mutante *dof4.1-3* y 623 reprimida.

Una vez claros los genes diferencialmente expresados, se quiso averiguar si había alguna categoría funcional sobre-representada en el listado de genes inducidos y reprimidos comparado con el genoma completo de *Arabidopsis thaliana*. Para este fin, se empleó la aplicación FatiGO (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). Los resultados de las categorías GO de genes inducidos y reprimidos se muestran en la Tabla 3 y Tabla 4, respectivamente.

Tabla 2. Resultado del análisis FatiGO para los genes inducidos. Se muestra el porcentaje de genes perteneciente a cada categoría funcional (GO) en la lista de genes inducidos, y en el resto del genoma. Se incluye también el p-value ajustado, que indica el grado de significancia estadística por el que los genes de estas categorías se han sobre-representado.

Categoría funcional	p-value ajustado
Actividad de reserva de nutrientes (GO 0045735)	4e-4

Tabla 3. Resultado del análisis FatiGO para los genes reprimidos. Se muestra el porcentaje de genes perteneciente a cada categoría funcional (GO) en la lista de genes reprimidos, y en el resto del genoma. Se incluye también el p-value ajustado, que indica el grado de significancia estadística por el que los genes de estas categorías se han sobre-representado.

Categoría funcional	p-value ajustado
Región extracelular (GO 0005576)	3,6e-5
Muerte de células de otro organismo (GO 0031640)	5,6e-4

Dentro del conjunto de genes inducidos incluidos dentro de la categoría funcional de reserva de nutrientes, se encontraron los genes indicados en la tabla 5:

Tabla 4. Genes de la categoría funcional de "actividad reserva de nutrientes" entre los genes inducidos en semillas en el mutante *dof4.1-3* respecto al *wt*.

Locus	Nombre
AT4G27150	2S Seed storage protein 2 or Seed storage albumin 2 (<i>At2S2</i> or <i>SESA2</i>)
AT2G28490	<i>RmlC-like cupins superfamily protein</i>
AT2G18540	<i>RmlC-like cupins superfamily protein</i>
AT4G28520	12S Seed storage protein, <i>Cruciferin 3</i> or <i>Cruciferin C</i> (<i>CRC</i> or <i>CRU3</i>)
AT1G03880	12S Seed storage protein, <i>Cruciferin 2</i> or <i>Cruciferin B</i> (<i>CRB</i> or <i>CRU2</i>)
AT5G54740	2S Seed storage protein 5 or Seed storage albumin 5 (<i>At2S5</i> or <i>SESA5</i>)
AT3G22640	<i>Vicilin-like seed storage protein</i> (<i>PAP85</i>)
AT4G27140	2S Seed storage protein 1 or Seed storage albumin (<i>At2S1</i> or <i>SESA1</i>)

Se consultó de nuevo la base de datos *eFP Browser*, para observar el patrón de expresión de dichos genes. La figura 25 ejemplifica el resultado de la búsqueda. Como se aprecia, se trata de genes cuya expresión resulta muy específica de semilla, aumentando ésta progresivamente a lo largo del desarrollo de la semilla.

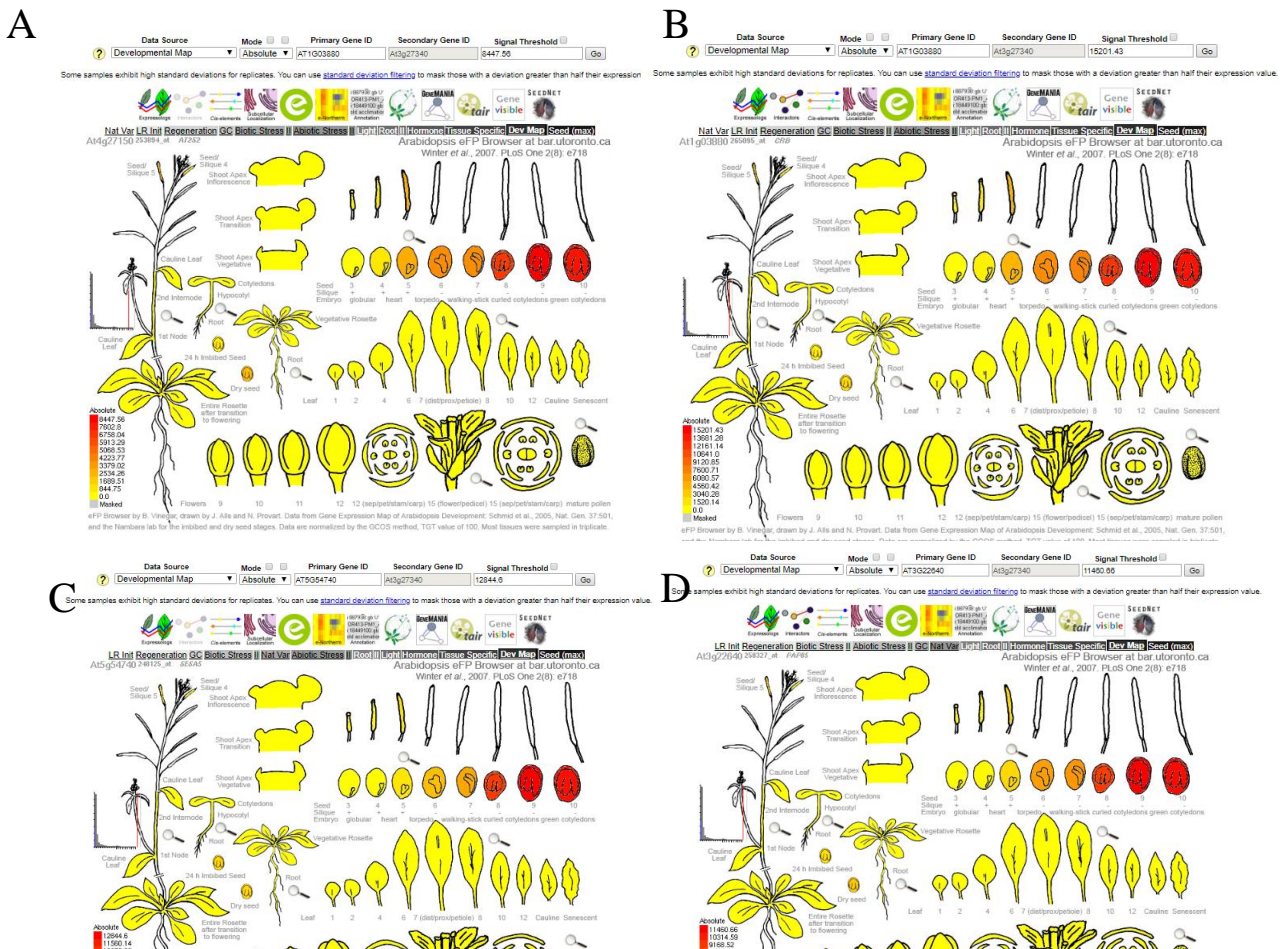


Figura 25. Patrones de expresión obtenidos de la base de datos *eFP Browser*, para: A) *At4g27150* (*SESA2*), B) *Ag1g03880* (*CRB*), C) *At5g54740* (*SESA5*) y D) *At3g22640* (*PAP85*)

and the Numbers tab for the Imbibed and dry seed stages. Data are normalized by the GCOG method, TOT value of 100. Most tissues were sampled in triplicate.

En cuanto a los pertenecientes a la categoría GO de componente celular: región extracelular, la cual es mayoritaria entre los genes reprimidos, se muestra en los anejos (Anejo IV).

Asimismo, también la categoría funcional de muerte de células de otros organismos se encontraba sobre-representada entre los genes reprimidos, cuyos genes se muestran en la Tabla 6.

Tabla 5. Genes de la categoría funcional GO: muerte de células de otros organismos entre los genes reprimidos en semillas al 9° día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*.

Locus	Nombre
AT1G13607	<i>Defensin-like protein 286</i>
AT5G19175	<i>Putative defensin-like protein 48</i>
AT4G29300	<i>Low-molecular-weight cysteine-rich 27 (LCR27)</i>
AT5G40155	<i>Defensin-like protein 313</i>
AT5G44973	<i>Defensin-like protein 285</i>
AT5G19172	<i>Defensin-like protein 49</i>
AT5G42242	<i>Putative defensin-like protein 179</i>
AT2G14365	<i>Defensin-like protein 71</i>
AT3G04943	<i>Putative defensin-like protein 188</i>
AT3G27835	<i>Putative defensin-like protein 29</i>
AT3G23167	<i>Putative defensin-like protein 185</i>
AT2G17723	<i>Putative defensin-like protein 256</i>
AT3G17155	<i>Defensin-like protein 46</i>
AT2G02147	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 73 (LCR73)</i>
AT4G22115	<i>SCR-like 14 (SCRL14)</i>
AT1G13755	<i>Defensin-like protein 260</i>
AT1G49435	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 16 (LCR16)</i>
AT3G43505	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 30 / Defensin-like protein 122 (LCR30)</i>
AT2G33233	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 49 / Defensin-like protein 50 (LCR49)</i>
AT3G04945	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 18 / Putative defensin-like protein 184 (LCR18)</i>
AT4G17718	<i>Putative defensin-like protein 307</i>
AT3G42473	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 47 / Defensin-like protein 91 (LCR47)</i>
AT3G48231	<i>Low-molecular-weight Cysteine-Rich 48 / Defensin-like protein 51 (LCR48)</i>

Esta vez con el eFP Browser se comprobó que el patrón de expresión de los genes pertenecientes a la categoría “región extracelular”, mayoritaria entre los reprimidos, resultaba más ubicuo en la planta (datos aquí no mostrados). Para la categoría funcional “muerte de células de otros organismos”, sin embargo, casi su totalidad no presenta datos registrados de expresión en (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Por otro lado, se quiso saber la función de los genes que variaban su expresión en mayor medida. Para ello, se seleccionaron aquellos con variación estadísticamente significativa (p -value ajustado $\leq 0,05$) y que se encontraran más de 5 veces inducidos o más de 10 veces reprimidos. De los 259 genes inducidos, 21 cumplían esos requisitos (Tabla 7); mientras que de entre los 623 totales reprimidos, los cumplían 33 genes (Tabla 8). Listas más completas se encuentran adjuntas en los anejos, con hasta un factor de inducción y de represión de 3 y 5 respectivamente (Anejo V y Anejo VI, respectivamente). Entre los genes más expresados, encontramos 2 de los incluidos en la categoría *Seed Storage Protein* (marcados en rojo suave en la tabla). También pertenecientes a dicha categoría, aparecen 3 genes codificantes para cruciferinas (*CRA*, *CRB* y *CRC*) y una *Seed Storage Albumin* (*SESA5*) en el Anejo V. De entre los más reprimidos, 3 pertenecen a la categoría de “Muerte de células de otros organismos” (marcados en verde en la Tabla 8).

Tabla 6. Genes más inducidos en semillas al 9º día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*

Locus	Factor de inducción	Nombre
AT3G44006	124.7	<i>Unknown protein</i>
AT1G75945	70.7	<i>Hypothetical protein</i>
AT3G60730	46.8	<i>Pectinesterase</i>
AT1G61050	16.8	<i>Alpha 1,4-glycosyltransferase family protein</i>
AT4G38080	15.9	<i>Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein</i>
AT4G09200	14.8	<i>SPIa/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein</i>
AT2G36295	11.2	<i>Hypothetical protein</i>
AT5G45690	9.9	<i>Oil body-associated protein 2A / histone acetyltransferase</i>
AT1G03870	8.9	<i>FASCICLIN-like arabinogalactan 9 (FLA9)</i>
AT3G20087	8.7	<i>Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 17 pseudogene</i>
AT4G36600	8.5	<i>Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein</i>
AT4G03540	8.2	<i>CASP-like protein 1C1 (CASPLIC1)</i>
AT5G04380	7.1	<i>S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>
AT5G44020	6.9	<i>HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase</i>
AT2G47120	5.9	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>
AT4G27140	5.7	<i>Seed Storage Albumin 1 / 2S Seed Storage Protein 1 (SESA1)</i>
AT1G03890	5.7	<i>12S Seed Storage Protein CRD</i>
AT1G14950	5.5	<i>Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein</i>
AT1G21540	5.3	<i>Probable acyl-activating enzyme 9</i>
AT3G28220	5.1	<i>TRAF-like family protein</i>
AT2G05580	5.1	<i>Glycine-rich protein family</i>

Tabla 7 . Genes más reprimidos en semillas al 9° día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*

Locus	Factor de represión	Nombre
AT2G25700	90.7	<i>SKP1-like protein 3 (SK3)</i>
AT3G28853	88.6	<i>Putative B3 domain-containing protein</i>
AT3G54550	70.4	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta-beta protein, putative</i>
AT4G04580	54.3	<i>Homeodomain-like superfamily protein</i>
AT1G26796	54.2	<i>Plant self-incompatibility protein S1 family</i>
AT4G28775	53.3	<i>Hypothetical protein</i>
AT3G50020	52.0	<i>Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein</i>
AT1G08985	40.9	<i>AP2/B3-like transcriptional factor family protein</i>
AT1G27250	24.4	<i>Paired Amphipathic Helix (PAH2) superfamily protein</i>
AT2G34890	23.3	<i>CTP Synthase 5 (CTPS5)</i>
AT3G13370	23.2	<i>Formin-like protein</i>
AT1G59800	21.1	<i>Cullin-like protein 3</i>
AT2G20170	20.5	<i>NEP-interacting protein, putative (DUF239)</i>
AT2G12475	18.3	<i>Defensin-like protein 112</i>
AT1G19320	15.8	<i>Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein</i>
AT2G24950	14.1	<i>Transmembrane protein, putative (DUF239)</i>
AT4G22430	14.1	<i>Putative F-box/kelch-repeat protein</i>
AT1G43666	14.1	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT4G39760	13.3	<i>Putative F-box/kelch-repeat protein</i>
AT2G21420	12.8	<i>RBR-type E3 ubiquitin transferase</i>
AT2G04205	12.6	<i>ncRNA</i>
AT5G19700	12.2	<i>Protein detoxification 52/ MATE efflux family protein</i>
AT5G05960	11.9	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT1G47317	11.9	<i>Defensin-like protein 289</i>
AT1G31255	11.6	<i>Hypothetical protein</i>
AT2G01667	11.2	<i>Unknown protein</i>
AT1G43667	11.2	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT1G61093	11.1	<i>Hypothetical protein</i>
AT2G44970	11.0	<i>Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein</i>
AT1G21395	10.9	<i>Transmembrane protein</i>
AT4G12825	10.6	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT5G38960	10.3	<i>Putative germin-like protein subfamily 1 member 12</i>
AT3G53980	10.3	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>

4.4.3.6. Generación de herramientas para ensayos posteriores

Para continuar la caracterización del gen *DOF4.1* en *Arabidopsis*, de la misma manera que se estudió el comportamiento de los mutantes de pérdida de función, se quiso saber cómo germinaban y respondían al envejecimiento semillas sobreexpresando dicho gen. Se pidieron semillas (Ahmad *et al.*, 2013) de sobre-expresión con el fin de realizar un ensayo CDT, aunque desafortunadamente dichas semillas no llegaron a germinar en MS. Probablemente este hecho se debiera al tiempo que habían pasado esas semillas desde su recogida (envejecimiento natural) y/o a posibles deterioros del transporte. A falta de comprobación, esto sugeriría que la sobreexpresión del gen podría causar mutantes más sensibles al envejecimiento, al contrario que la pérdida de función.

Para corroborar esta hipótesis, se quiso obtener plantas transgénicas de complementación del mutante *dof4.1*. Para ello, se transformaron plantas con un fondo mutante *dof4.1-3* con *A. tumefaciens* portando el plásmido pUBQ10 que contiene el gen *DOF4.1* de *Arabidopsis thaliana* bajo el control de un promotor constitutivo de ubiquitina. Asimismo, dicha construcción presenta un tag 2xHA, procedente del vector anterior PTEX:2xHAMCS del proceso de clonaje (Apartado 3.6.6.7). Dicho tag permitirá posteriores análisis del tipo Secuenciación de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP Seq) para completar así el estudio funcional de este factor de transcripción y conocer a qué secuencias del genoma se une.

En el presente Trabajo de Fin de Máster, por motivos de tiempo, solo se llegó a la obtención de la población de semillas T1, por lo que no se ha podido incluir el fenotipo de estas plantas tras un tratamiento de envejecimiento acelerado.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Empleo del tratamiento EPPO como método de envejecimiento acelerado

En el presente Trabajo de Fin de Máster, se han ensayado un total de 3 tratamientos diferentes para simular el envejecimiento natural: *Controlled Deterioration Treatment* (CDT) y *Elevated Partial Pressure of Oxygen* (EPPO) a humedad relativa baja (alrededor del 30%) y a muy baja humedad relativa (alrededor del 10%). Esta diversidad surge de la necesidad de buscar una alternativa al método de CDT, que es el más reconocido y ampliamente utilizado. Estudios relativamente recientes han señalado que la humedad y temperatura elevadas empleadas en los tanques de ensayo CDT no simulan correctamente las condiciones de envejecimiento en un contexto agronómico, mucho más secas y a menor temperatura (Groot *et al.*, 2012). Concretamente, la elevada humedad propia del CDT transformaría el citoplasma de las células de la semilla desde un *glassy state* típico de semilla madura y seca a un estado mucho más fluido, en el que habría una mayor actividad del agua, tendría lugar una cierta reactivación de las reacciones enzimáticas y, en consecuencia, de un mayor número de procesos fisiológicos (Buitink and Leprince, 2008). Esos procesos, si bien pueden concurrir en generación de estrés oxidativo y ROS y, por tanto, simular el envejecimiento real, no ocurren durante el envejecimiento “natural” de las semillas, en el que se mantendría el *glassy state*. Por otra parte, los ensayos CDT podrían estar provocando cierto estrés por la elevada temperatura desencadenando respuestas propias de estrés por calor que, de nuevo, no se observarían a las temperaturas comúnmente empleadas para el almacenamiento en ese contexto agronómico.

Precisamente con el fin de evitar posibles falsos positivos debidos a las condiciones del CDT y centrar la atención en el efecto de la oxidación producida durante el envejecimiento de semillas, en nuestro grupo se decidió emplear el tratamiento EPPO para realizar un GWAS. Aunque en otras especies dicho método había sido eficaz, nunca antes había sido utilizado en *A. thaliana* (Groot *et al.*, 2012). Aunque el GWAS se llevó a cabo manteniendo una cierta humedad (aproximadamente 30% RH), en este trabajo se quiso plantear también otro ensayo con muy baja humedad, manteniéndola en torno al 10%, de forma similar a lo realizado en trabajos previos (Groot *et al.*, 2012).

Los resultados del presente trabajo muestran, en primer lugar, que el método de muy baja humedad (10%) es mucho menos agresivo que el que mantiene la humedad en torno al 30%, ya que en el primer caso es necesario esperar 9 meses para ver un efecto, mientras que este tiempo se reduce a 5 meses en el segundo caso. Esto corrobora el gran efecto del factor humedad durante la degradación de la semilla y muestra cuán importante es minimizarla para la correcta conservación de las mismas (tal y como se realiza en bancos de germoplasma).

Por otra parte, en los resultados del presente trabajo se observa una escasa agresividad de los tratamientos EPPO realizados en comparación con el CDT (figuras 8^a, 11, 17 y 18), a pesar de requerir tiempos mayores (5-9 meses frente a 10-15 días). Dado que es justamente el tiempo el factor limitante en los tratamientos de envejecimiento acelerado, surge la necesidad de reducir, por un lado el tiempo del tratamiento EPPO, al mismo tiempo que se aumenta la fuerza de dicho tratamiento. Para ello, una posibilidad sería incrementar la humedad relativa, pero siempre sin llegar a provocar la ruptura del *glassy state*, efecto que se pretende evitar. El otro factor a modificar es el de la presión de oxígeno aplicada. En nuestro caso, los resultados sugieren que los 5 bares de presión no resultan suficientes. Debido a limitaciones técnicas, en el presente trabajo no se pudo aplicar una presión mayor, pero en futuros ensayos sería necesario ajustarla para poder minimizar el tiempo e incrementar el efecto tóxico del tratamiento, manteniendo la humedad alrededor del 30%. idealmente rondando los 180 bares, reproduciendo las condiciones de Groot *et al.*, 2012.

Por último, es interesante destacar que, a excepción del alelo *dhar1-4*, en todos los demás casos los fenotipos evidenciados mediante el GWAS (EPPO) han podido ser confirmados mediante el método CDT. Esto sugiere que el daño oxidativo producido en el tratamiento EPPO está ocurriendo también cuando se emplea el CDT.

5.2. La proteína de la familia de las quitinasas (CFP) no participa en la longevidad de semilla en *A. thaliana*

En un primer momento, los resultados fueron muy prometedores para el gen *CFP*, ya que el mutante *cpf* (S9) mostró una drástica sensibilidad al tratamiento CDT (Ver figura 5). Sin embargo, en vista de los resultados de confirmación del fenotipo tanto por CDT como por EPPO, el gen *CFP* ha sido descartado debido a la escasa reproducibilidad de su fenotipo. Ni siquiera el mismo alelo en otra generación de semillas y en el mismo tratamiento que el GWAS reprodujo el fenotipo de sensibilidad inicial. Por ello, se abandonó su estudio y se centró la atención en los otros dos candidatos. Dado que este tipo de genes está involucrado en la defensa frente a hongos, las condiciones en que se obtuvieron las plantas y semillas en las diferentes generaciones, especialmente si sufrieron algún ataque por patógenos, podrían determinar sensibilidad inicial y la falta de reproducibilidad posterior del fenotipo. La longevidad resulta un carácter muy sensible a pequeñas variaciones en las condiciones ambientales durante el crecimiento en la planta madre, siendo también susceptible a variaciones fenotípicas entre diferentes lotes de semillas. Los resultados ponen en manifiesto por tanto la necesidad de un máximo control en el crecimiento de la planta madre y en la obtención de las semillas.

5.3. La expresión de la dehidroascorbato reductasa 1 (*DHAR1*) es necesaria para mantener una correcta longevidad de la semilla en *A. thaliana*

En cuanto al gen *DHAR1*, tanto en EPPO como en CDT se demuestra que la pérdida de función del gen repercute negativamente en la longevidad de las semillas. Coherentemente, no solo el gen *DHAR1* sino también los genes que codifican para las otras dos isoformas ensayadas (*DHAR2* y *DHAR3*), cuando se encuentran delecionados (tanto mutantes simples como dobles o triples), provocan el fenotipo de sensibilidad al envejecimiento. Asimismo, los resultados sugieren que la enzima *DHAR1* podría presentar un mayor peso en la longevidad de semilla que las isoformas *DHAR2* y *DHAR3*, visto que el fenotipo de su pérdida de función es más acusado, especialmente con el tratamiento EPPO (ver figura tratamiento EPPO (y CDT)).

Los resultados obtenidos son lógicos debido a la conocida actividad detoxificadora de ROS por parte del ciclo del glutatión-ascorbato, en el que actúa la enzima *DHAR1*. Se propone que la ausencia de la enzima desregula dicho ciclo, sobre todo cuando no están presentes varias isoformas que realizasen la reducción del dehidroascorbato en ascorbato, suponiendo un compromiso en la reposición de este último. Consecuentemente, la detoxificación de ROS se verá afectada y los mutantes sufrirán un mayor estrés oxidativo. De hecho, se ha demostrado la sensibilidad de los mutantes *dhar* de *A. thaliana* frente a estrés oxidativo, causado por paraquat (Rahantaniaina *et al.*, 2017). Dado que durante el envejecimiento de la semilla (y concretamente mediante los métodos EPPO y CDT) se produce estrés oxidativo, es de esperar que los mutantes muestren también una menor longevidad de semillas. En consonancia con este modelo, se ha descrito que la sobreexpresión de los genes codificantes para la Cu/Zn-superóxido dismutasa (*CuZnSOD*) y ascorbato peroxidasa (*APX*) (otros enzimas pertenecientes al ciclo del glutatión ascorbato) mejoraba la longevidad de semillas de tabaco (Lee *et al.*, 2010).

5.4. El factor de transcripción *DOF4.1* juega un papel relevante en la longevidad de semillas de *Arabidopsis thaliana*

DOF4.1 ha destacado uno de los genes más prometedores tras demostrar mejoras significativas en la longevidad de semillas con respecto al *wt* en los 2 tipos de tratamiento de envejecimiento acelerado

Para iniciar su caracterización fenotípica se hizo un ensayo de aparición de aparición de cotiledones verdes en presencia de diferentes sustancias a concentraciones tóxicas (Figura 22), que no

mostró una mayor tolerancia de los mutantes *dof4.1* ante estos estreses. Solamente se observó una posible mayor tolerancia al estrés salino por NaCl que, sin embargo, no fue robusta al aparecer únicamente en uno de los dos alelos (*dof4.1-3*). Estos resultados implican, en primer lugar, que la mejor germinación de *dof4.1* ante tratamientos de envejecimiento, que hemos asumido como aumento de longevidad, era tal, y no se debía a una simple ganancia en capacidad germinativa y vigor de manera más general, frente a cualquier estrés, de los mutantes *dof4.1*. Por otra parte, también han demostrado que los mutantes *dof4.1* no presentan alteraciones en la respuesta ante las dos hormonas vegetales implicadas mayoritariamente en la germinación: ácido abscísico (ABA) y giberelinas, en vista de los resultados tras tratamiento con ABA y paclobutrazol, respectivamente.

Para tratar de explicar el mecanismo por el que los mutantes *dof4.1* toleran mejor el envejecimiento, se quiso estudiar la permeabilidad de sus semillas y el grosor capa de suberina del mutante, ya que ambos factores han sido implicados previamente en la longevidad. Efectivamente, se observó una ligera diferencia en la permeabilidad de las semillas de los mutantes *dof4.1* respecto al *wt*, gracias al ensayo de permeabilidad en sales de tetrazolio. Las semillas mutantes *dof4.1-1* y *dof4.1-3* son algo menos permeables que el control *wt* (figura). Esto puede haber contribuido parcialmente al fenotipo de mayor longevidad de las semillas, como ha sido el caso en estudios anteriores que establecen que semillas menos permeables presentan mayor longevidad (Bueso *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a que la reducción de la permeabilidad es muy ligera, no creemos que ello explique la totalidad el fenotipo. Con respecto a la capa de suberina, teñida y observada al microscopio, no pareció tener mayor espesor que la del *wt*. Por lo tanto, o bien son necesarias otras técnicas para su visualización, o bien la mayor permeabilidad es debida a otras causas diferentes a la suberina.

Por otra parte, se llevó a cabo un RNAseq para ayudar a desentrañar el mecanismo por el cual actúa *DOF4.1*. Los resultados de este ensayo mostraron que entre los genes inducidos en el mutante *dof4.1-3* respecto al *wt*, aparecía sobrerrepresentada la categoría funcional de “actividad de reserva de nutrientes”. En los genes incluidos en dicha categoría se encontraban, principalmente, proteínas pertenecientes al grupo de las *Seed Storage Proteins* (SPPs) (Tabla 5). Asimismo, algunas SSP aparecían en las listas de genes más inducidos (Tabla 7).

Las SSPs son uno de los dos tipos de proteínas vegetales de almacenamiento junto con las *Vegetative Storage Proteins*. Las SSPs se acumulan a altos niveles en la semilla durante los últimos estadios de su desarrollo (Dure *et al.*, 1981). Durante la germinación, son rápidamente movilizadas y degradadas y los aminoácidos resultantes se vuelven disponibles para el embrión como fuente de nutrientes, especialmente como fuente de nitrógeno reducido, pero también como fuente carbono y azufre (Krishnan and CoeJr, 2001; Otegui *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, existen 2 clases principales de SSPs: las globulinas 12S (también llamadas cruciferinas, solubles en agua) y las albúminas 2S (o napinas, solubles en soluciones salinas). También, aunque menos importantes, pertenecen a las SSPs las globulinas 7S (o vicilinas) (Fujiwara *et al.*, 2002).

Concretamente en nuestro análisis RNASeq se encontraron entre la lista de genes más inducidos albúminas 2S como la SESA1 y las cruciferinas CRA, CRB y CRC. De hecho, constituían el grupo de la categoría funcional más sobrerrepresentada en el mutante. Por tanto, se plantea ahora la cuestión del papel que puedan jugar estas proteínas SSPs en la longevidad de las semillas. En este punto, se nos plantean dos hipótesis:

La primera hipótesis plantea que los mayores niveles de expresión de SSPs encontrados en el mutante lleven a una mayor disponibilidad de nutrientes en el momento de germinar, en una semilla que además ha sufrido daños tras el envejecimiento. Los resultados de Shen *et al.*, 2018 parecen apoyar esta hipótesis. En su trabajo, demostraron que semillas mutantes de pérdida de función para la enzima ASPG1, una proteasa encargada de degradar las SSPs de la semilla en la reactivación del metabolismo de la semilla después del almacenamiento, presentaban menor movilización de estas SSPs e, interesantemente, menor longevidad tras envejecimiento real y CDT.

Sin embargo, las funciones de las SSPs no son únicamente de almacenamiento de nutrientes para el embrión en el momento de la germinación. Se ha observado en estudios anteriores que durante el almacenamiento a largo plazo de las semillas en seco, las proteínas SSPs eran frecuentemente carboniladas, oxidadas así irreversiblemente, lo que les llevaría a su degradación (Rajjou *et al.*, 2008; Rajjou and Debeaujon, 2008). Este hecho junto con la gran abundancia de SSPs en la semilla, ha llevado a la hipótesis de su posible papel también como tampones de estrés oxidativo, o “trampas” de ROS.

Por lo tanto, una segunda hipótesis sería que la consecuencia de esa mayor expresión de SSPs en el mutante *dof4.1* fuese un mayor efecto de tampón de ROS. Con ello, las semillas del mutante serían más capaces de hacer frente el estrés oxidativo generado durante el envejecimiento, gracias a una mayor cantidad de SSPs acumuladas que serían oxidadas preferentemente a cambio de preservar de la oxidación a otras proteínas de la semilla. En este caso, apoyarían esta hipótesis los resultados obtenidos por Nguyen *et al.*, 2015, en cuyo trabajo demostraron la menor longevidad de las semillas de un triple mutante en cruciferinas (*crua crub cruc*) de *A. thaliana* ante tratamientos de envejecimiento acelerado.

Además de las ya discutidas proteínas SSPs, entre los genes más inducidos, cabe destacar la presencia de dos genes codificantes para proteínas de tipo *Late Embryogenesis Abundant* (LEA): At4g36600 (Tabla 7) y LEA76 (At3g15670, en Anejo V). Las LEA son un tipo de proteínas altamente hidrofílicas que se descubrieron inicialmente por su acumulación en las últimas etapas de la embriogénesis, aunque posteriormente se ha visto que están igualmente presentes en tejidos vegetativos (Dure *et al.*, 1981; Ramanjulu and Bartels, 2002). Comúnmente se les atribuye un papel protector ante el estrés por sequía, pero también presentan otras funciones, sobre todo de tolerancia a estreses (Ingram and Bartels, 1996; Thomashow, 1999). Los 2 genes mencionados pertenecen al grupo

3 de las proteínas LEA, y tienen una expresión característica de semilla (Hundertmark and Hinch, 2008). Estudios previos han demostrado la acumulación de una proteína del grupo 3 de las LEA, SBP65, en las células embrionarias de la semilla desde el momento del descenso de la actividad metabólica al final de la maduración hasta la adquisición del estado quiescente (Dehaye *et al.*, 1997). Su actividad es la de acumular y secuestrar biotina libre durante la maduración para después liberarla en la germinación y. Ya que la biotina es necesaria como cofactor para muchas enzimas carboxilasas que oxidan proteínas durante el almacenamiento, se ha sugerido por tanto la contribución positiva de SBP65 a la longevidad de semilla, al impedir posiblemente la acción de esas carboxilasas mediante el secuestro de biotina (Sano *et al.*, 2016). Funciones similares se podrían atribuir a las 2 LEA cuyos genes se encontraban inducidos en el mutante *dof4.1*.

Con respecto al análisis FatiGO de los genes reprimidos, se obtuvo que la categoría “muerte de células de otros organismos” estaba sobrerrepresentada. Además, 3 de los genes más reprimidos en el mutante *dof4.1*, pertenecen a dicha categoría funcional. Concretamente, 2 son *Defensin-like proteins* (112 y 289) y un *Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein*. Las defensinas y las proteínas tipo defensina son uno de los tipos de péptidos antimicrobianos (AMP, del inglés *Antimicrobial Peptides*). Presentan papeles principalmente en defensa biótica, como por ejemplo ante hongos (de Oliveira Carvalho and Moreira Gomes, 2011).

Aunque es ampliamente aceptado que la longevidad de semilla se encuentra muy influenciada por las condiciones ambientales durante su formación y almacenamiento, hay muy pocos estudios en la bibliografía referidos a la relación entre patógenos y longevidad de semillas. A este respecto, existen muy pocos estudios en la bibliografía referidos a la relación entre patógenos y longevidad de semillas. Bueso *et al.* (2017) observaron que la infección por diferentes virus afectaba de forma distinta a la longevidad de las semillas. Por todo ello, serían necesarios más estudios para poder corroborar o explicar el papel de los genes pertenecientes a esta categoría en la longevidad de semilla observada en el mutante *dof4.1*.

Además, es importante destacar que en este trabajo se han generado líneas transgénicas de sobreexpresión del gen *DOF4.1* bajo control del promotor ubiquitina en el fondo mutante *dof4.1*. Esta herramienta permitirá, por un lado, comprobar la complementación del fenotipo del mutante. Por otra parte, y dado que la construcción incluye un tag de HA, se podrá llevar a cabo un ensayo ChIPSeq para poder determinar las dianas directas del factor de transcripción y ayudar a corroborar las actuales hipótesis.

Por último, cabe destacar que las características de los mutantes *dof4.1* lo convierten en un gen de gran interés para la modificación de su expresión con perspectivas agrícolas. Las plantas *dof4.1* presentaron a lo largo de los ensayos un fenotipo no aberrante y sus semillas no se han mostrado más sensibles a estreses. La expresión del gen en el *wt* resulta baja, y no es ubicua. Por tanto, la mayor tolerancia al envejecimiento de los mutantes no se haya contrarrestada con fenotipos negativos. Todo ello alza al gen *DOF4.1* como un buen candidato para la realización de edición génica mediante CRISPR, en especies agrícolas. El fenotipo del mutante de pérdida de función presenta un 20-30% extraordinario de germinación con respecto a semillas *wt*, porcentajes que aunque no parezcan muy elevados, a nivel agrícola supondrían una gran mejoría tras el almacenamiento, lo que permitiría un aprovechamiento mayor de los lotes de semillas almacenados.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- El tratamiento EPPO llevado a cabo en este Trabajo de Fin de Máster ha permitido encontrar genes implicados en la longevidad de las semillas. Sin embargo, se propone aumentar la presión de oxígeno en futuros ensayos para incrementar sus efectos y reducir el tiempo de tratamiento necesario.
- Los resultados obtenidos en relación a los mutantes *dhar* sugieren que la detoxificación de ROS mediada por el ciclo glutatión-ascorbato juega un papel relevante en la longevidad de semillas de *Arabidopsis thaliana*. Probablemente, la menor tolerancia al envejecimiento de estos mutantes se debe a una menor eficacia en la eliminación de las ROS producidas durante dicho proceso.
- La mayor tolerancia del mutante *dof4.1* al envejecimiento no parece ser consecuencia de una desregulación del balance hormonal en las dos principales hormonas implicadas en germinación: ABA y giberelinas. Tampoco parece ser consecuencia de una mayor tolerancia a estreses abióticos durante la germinación y establecimiento de la plántula.
- La menor permeabilidad de la semilla de los mutantes *dof4.1*, medida por la menor entrada de sales de tetrazolio, podría explicar, parcialmente, su mayor tolerancia al envejecimiento, si bien falta determinar el mecanismo molecular responsable.
- Las proteínas de reserva de semilla inducidas en el mutante podrían contribuir a la longevidad por aportar los nutrientes necesarios para el proceso de germinación, o por actuar como tampón frente al estrés oxidativo que se produce durante el almacenamiento de las semillas (especialmente las crucíferas).
- En este trabajo se han generado plantas transgénicas *pUBI::DOF4.1-HA*, que podrán emplearse como herramienta para el futuro estudio de la regulación génica llevada a cabo por DOF4.1, mediante ChIPSeq. Dichas líneas permitirán complementar, asimismo, el fenotipo de longevidad del mutante *dof 4.1*.
- En el presente Trabajo Final de Máster se han encontrado dos genes implicados en longevidad de semilla: *DHAR1* y *DOF4.1*. Este conocimiento adquirido en *A. thaliana* podría ser aplicado para obtener plantas de interés agronómico con semillas más longevas, por sobreexpresión de enzimas del ciclo ascorbato-glutatión o por pérdida de función del gen *DOF4.1*. Esto último podría abordarse con técnicas de editado genético como el CRISPR, con mayor aceptación a nivel social que las plantas transgénicas.

7. REFERENCIAS

- Ahmad, M., Rim, Y., Chen, H., and Kim, J.Y. (2013) Functional characterization of Arabidopsis Dof transcription factor AtDof4.1. *Russ J Plant Physiol* **60**: 116–123.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science (80-)* **301**: 653–657.
- Bailly, C., and Bailly, C. (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* **14**: 93–107.
- Bekker, R.M., Bakker, J.P., Ozinga, W.A., and Thompson, K. (2003) Seed traits: essential for understanding seed longevity. *Asp Appl Biol* **69**: 1–9.
- Bent, A.F. (2000) Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. *Plant Physiol* **124**: 1540–1547.
- Biedermann, S., Mooney, S., and Hellmann, H. (2011) Recognition and repair pathways of damaged DNA in higher plants. *Sel Top DNA Repair* **1**: 201–236.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* **282**: 1183–1192.
- Bray, C.M., and West, C.E. (2005) DNA repair mechanisms in plants: Crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* **168**: 511–528.
- Bueso, E., Munoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martinez, L., Sayas, E., *et al.* (2014) ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 Uncovers a Role for Gibberellins in Seed Longevity. *Plant Physiol* **164**: 999–1010.
- Bueso, E., Munoz-Bertomeu, J., Campos, F., Martinez, C., Tello, C., Martinez-Almonacid, I., *et al.* (2016) Arabidopsis COGWHEEL1 links light perception and gibberellins with seed tolerance to deterioration. *Plant J* **87**: 583–596.
- Bueso, E., Serrano, R., Pallás, V., and Sánchez-Navarro, J.A. (2017) Seed tolerance to deterioration in arabidopsis is affected by virus infection. *Plant Physiol Biochem* **116**: 1–8.
- Buitink, J., Hemminga, M.A., and Hoekstra, F.A. (2000) Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiol* **122**: 1217–1224.
- Buitink, J., and Leprince, O. (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus - Biol* **331**: 788–795.
- Chen, H., Ahmad, M., Rim, Y., Lucas, W.J., and Kim, J.Y. (2013) Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *New Phytol* **198**: 1250–

1260.

Chen, H., Chu, P., Yuliang Zhou, Li, Y., Liu, J., Ding, Y., *et al.* (2012) Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *J Exp Bot* **63**: 4107–4121.

Chen, X., Wang, D., Liu, C., Wang, M., Wang, T., Zhao, Q., and Yu, J. (2012) Maize transcription factor Zmdof1 involves in the regulation of Zm401 gene. *Plant Growth Regul* **66**: 271–284.

Debeaujon, I. (2003) Proanthocyanidin-Accumulating Cells in Arabidopsis Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *PLANT CELL ONLINE* **15**: 2514–2531.

Dehaye, L., Duval, M., Viguier, D., Yaxley, J., and Job, D. (1997) Cloning and expression of the pea gene encoding SBP65, a seed-specific biotinylated protein. *Plant Mol Biol* **35**: 605–621.

Dure, L., Greenway, S.C., and Galau, G.A. (1981) Developmental Biochemistry of Cottonseed Embryogenesis and Germination: Changing Messenger Ribonucleic Acid Populations As Shown by in Vitro and in Vivo Protein Synthesis. *Biochemistry* **20**: 4162–4168.

Ebeed, H.T., Stevenson, S.R., Cuming, A.C., and Baker, A. (2018) Conserved and differential transcriptional responses of peroxisome associated pathways to drought, dehydration and ABA. *J Exp Bot* **69**: 4971–4985.

Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C. (2008) Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 387–415.

Fujiwara, T., Nambara, E., Yamagishi, K., Goto, D. B., & Naito, S. (2002) Storage Proteins. *Arab B* **1**: 50–58.

Gabriele, S., Rizza, A., Martone, J., Circelli, P., Costantino, P., and Vittorioso, P. (2010) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene AtGA3ox1. *Plant J* .

Groot, S.P.C., Surki, A.A., Vos, R.C.H. De, and Kodde, J. (2012) Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Ann Bot* **110**: 1149–1159.

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

Horton, M.W., Hancock, A.M., Huang, Y.S., Toomajian, C., Atwell, S., Auton, A., *et al.* (2012) Genome-wide patterns of genetic variation in worldwide Arabidopsis thaliana accessions from the RegMap panel. *Nat Genet* **44**: 212–216.

Hundertmark, M., and Hinch, D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **9**: 1–22.

Ingram, J., and Bartels, D. (1996) THE MOLECULAR BASIS OF DEHYDRATION TOLERANCE IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 377–403.

ISTA (2018) International Rules for Seed Testing. In *International Rules for Seed Testing*. Bassersdorf.

- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., and Watanabe, Y. (2007) Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett* **581**: 2455–2459.
- Job, C. (2005) Patterns of Protein Oxidation in Arabidopsis Seeds and during Germination. *PLANT Physiol* **138**: 790–802.
- Kerchev, P., Mühlenbock, P., Denecker, J., Morreel, K., Hoeberichts, F.A., Kelen, K. Van Der, *et al.* (2015) Activation of auxin signalling counteracts photorespiratory H₂O₂-dependent cell death. *Plant, Cell Environ* **38**: 253–265.
- Kranner, I., Birtić, S., Anderson, K.M., and Pritchard, H.W. (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* **40**: 2155–2565.
- Krishnan, H.B., and Coe Jr, E.H. (2001) *Seed Storage Proteins*. Encycloped.,.
- Lee, Y.P., Baek, K.H., Lee, H.S., Kwak, S.S., Bang, J.W., and Kwon, S.Y. (2010) Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *J Exp Bot* **61**: 2499–2506.
- McKinney, E.C., Ali, N., Traut, A., Feldmann, K.A., Belostotsky, D.A., McDowell, J.M., and Meagher, R.B. (1995) Sequence-based identification of T-DNA insertion mutations in Arabidopsis: actin mutants act2/1 and act4/1. *Plant J* **8**: 613–622.
- Mudgett, M.B., Lowenson, J.D., and Clarke, S. (1997) Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants. Phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds. *Plant Physiol* **115**: 1481–1489.
- Nagel, M., Kodde, J., Pistrick, S., Mascher, M., Börner, A., and Groot, S.P.C. (2016) Barley Seed Aging: Genetics behind the Dry Elevated Pressure of Oxygen Aging and Moist Controlled Deterioration. *Front Plant Sci* **7**.
- Nguyen, T.P., Cueff, G., Hegedus, D.D., Rajjou, L., and Bentsink, L. (2015) A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. *J Exp Bot* **66**: 6399–6413.
- Noguero, M., Atif, R.M., Ochatt, S., and Thompson, R.D. (2013) The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Sci* **209**: 32–45.
- Oge, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., *et al.* (2008) Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase1 Is Involved in Both Seed Longevity and Germination Vigor in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **20**: 3022–3037.
- Oliveira Carvalho, A. de, and Moreira Gomes, V. (2011) Plant Defensins and Defensin-Like Peptides - Biological Activities and Biotechnological Applications. *Curr Pharm Des* **17**: 4270–4293.
- Otegui, M.S., Herder, R., Schulze, J., Jung, R., and Staehelin, L.A. (2006) The Proteolytic Processing of Seed Storage Proteins in Arabidopsis Embryo Cells Starts in the Multivesicular Bodies. *Plant Cell Online* **18**: 2567–

2581.

Papi, M., Sabatini, S., Altamura, M.M., Hennig, L., Schafer, E., Costantino, P., and Vittorioso, P. (2002) Inactivation of the Phloem-Specific Dof Zinc Finger Gene DAG1 Affects Response to Light and Integrity of the Testa of Arabidopsis Seeds. *PLANT Physiol* **128**: 411–417.

Papi, M., Sabatini, S., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P., and Vittorioso, P. (2000) Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev* **14**: 28–33.

Park, D.H., Lim, P.O., Kim, J.S., Cho, D.S., Hong, S.H., and Nam, H.G. (2003) The Arabidopsis COG1 gene encodes a Dof domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J* **34**: 161–71.

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B. (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236–246.

Prieto-Dapena, P., Castano, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (2006) Improved Resistance to Controlled Deterioration in Transgenic Seeds. *Plant Physiol* **142**: 1102–1112.

Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Issakidis-Bourguet, E., Mhamdi, A., and Noctor, G. (2017) Cytosolic and Chloroplastic DHARs Cooperate in Oxidative Stress-Driven Activation of the Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiol* **174**: 956–971.

Rajjou, L., and Debeaujon, I. (2008) Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus - Biol* **331**: 796–805.

Rajjou, L., Lovigny, Y., Groot, S.P.C., Belghazi, M., Job, C., and Job, D. (2008) Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. *Plant Physiol* **148**: 620–641.

Ramanjulu, S., and Bartels, D. (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell Environ* **25**: 141–151.

Ratajczak, E., Małecka, A., Bagniewska-Zadworna, A., and Kalemba, E.M. (2015) The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *J Plant Physiol* **174**: 147–156.

Raviv, B., Aghajanyan, L., Granot, G., Makover, V., Frenkel, O., Gutterman, Y., and Grafi, G. (2017) The dead seed coat functions as a long-term storage for active hydrolytic enzymes. *PLoS One* **12**: 1–21.

Riechmann, J.L., J. Heard, G.M., Reuber, L., Jiang, C.-Z., Keddie, J., Adam, L., *et al.* (2000) Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes. *Science (80-)* **290**: 2105–2110.

Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B. (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**: 247–259.

Sano, N., Rajjou, L., North, H.M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., and Seo, M. (2016) Staying alive: Molecular

aspects of seed longevity. *Plant Cell Physiol* **57**: 660–674.

Santopolo, S., Boccaccini, A., Lorrai, R., Ruta, V., Capauto, D., Minutello, E., *et al.* (2015) DOF AFFECTING GERMINATION 2 is a positive regulator of light-mediated seed germination and is repressed by DOF AFFECTING GERMINATION 1. *BMC Plant Biol* **15**: 1–11.

Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-lundback, M., Pollard, M., and Dellapenna, D. (2013) Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination Dean DellaPenna. *Plant Cell* **16**: 1419–1432.

Shen, W., Yao, X., Ye, T., Ma, S., Liu, X., Yin, X., and Wu, Y. (2018) Arabidopsis aspartic protease ASPG1 affects seed dormancy, seed longevity and seed germination. *Plant Cell Physiol* **59**: 1415–1431.

Stevenson, D.E., and Hurst, R.D. (2007) Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci* **64**: 2900–2916.

Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., Carranco, R., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., and Jordano, J. (2010) Loss of function of the HSFA9 seed longevity program. *Plant, Cell Environ* **33**: 1408–1417.

Thomashow, M.F. (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571–599.

Treutter, D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environ Chem Lett* **7**: 581–591.

Verdier, J., Lalanne, D., Pelletier, S., Torres-Jerez, I., Righetti, K., Bandyopadhyay, K., *et al.* (2013) A Regulatory Network-Based Approach Dissects Late Maturation Processes Related to the Acquisition of Desiccation Tolerance and Longevity of *Medicago truncatula* Seeds. *Plant Physiol* **163**: 757–774.

Verma, P., Kaur, H., Petla, B.P., Rao, V., Saxena, S.C., and Majee, M. (2013) PROTEIN L-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2 Is Differentially Expressed in Chickpea and Enhances Seed Vigor and Longevity by Reducing Abnormal Isoaspartyl Accumulation Predominantly in Seed Nuclear Proteins. *PLANT Physiol* **161**: 1141–1157.

Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M., and West, C.E. (2010) A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* **63**: 848–860.

Weissbach, H., Resnick, L., and Brot, N. (2005) Methionine sulfoxide reductases: History and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* **1703**: 203–212.

Western, T.L., Skinner, D.J., and Haughn, G.W. (2000) Differentiation of Mucilage Secretory Cells of the Arabidopsis Seed Coat. *Plant Physiol* **122**: 345–356.

Wilson, D.O.J., and McDonald, M.B.J. (1986) Lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci Technol* **14**: 269–300.

Woody, S.T., Austin-Phillips, S., Amasino, R.M., and Krysan, P.J. (2007) The WiscDsLox T-DNA collection: An arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing

pipeline. *J Plant Res* **120**: 157–165.

Xi, D.M., Liu, W.S., Yang, G.D., Wu, C.A., and Zheng, C.C. (2010) Seed-specific overexpression of antioxidant genes in *Arabidopsis* enhances oxidative stress tolerance during germination and early seedling growth. *Plant Biotechnol J* **8**: 796–806.

Yanagisawa, S. (2000) Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J* **21**: 281–288.

Yanagisawa, S. (2002) The Dof family of plant. *Trends Plant Sci* **7**: 555–560.

Yanagisawa, S., and Schmidt, R.J. (1999) Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* **17**: 209–214.

Zhang, F., Tang, W., Hedtke, B., Zhong, L., Liu, L., Peng, L., *et al.* (2014) Tetrapyrrole biosynthetic enzyme protoporphyrinogen IX oxidase 1 is required for plastid RNA editing. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 2023–2028.

Zhu, C., Gore, M., Buckler, E.S., and Yu, J. (2008) Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *Plant Genome J* **1**: 5–20.

ANEJOS

Anejo I: Secuencia de los cebadores empleados en el trabajo para PCR diagnósticas

Nomenclatura candidato	Secuencia cebador "forward"	Secuencia cebador "reverse"
S1	5' AAAAATCAAATGGCCCTATCAG 3'	5' CAACATTACCACACCAACGATC 3'
S3	5' GGATCGTCCATTTGGTATGG 3'	5' TTCAATTTACACCAACCTCC 3'
S4	5' GATGAGAACAATCGGGCAAG 3'	5' ACCTTCTTGCTTGGCAAATC 3'
S5	5' GTTCTTCTGTTGACCGACC 3'	5' TACGGTGGTCTTGCTCACAG 3'
S6	5' TTTGCCTCGAATGAAAATATG 3'	5' TTGCTTGAGTTGCATCTTGG 3'
G2	-	5' GGCTCCATTAGACAAAAGACAAAG 3'
S7	5' ACATTCGTCTGATCCAACCAC 3'	5' TTCCACAAAGAACCATGGAAG 3'
S8	5' GGAAACTAGAGCAAAATGGTGG 3'	5' CCTAATTTAAGTGGATCGGTCCG 3'
S9 L3	5' TTTTTCCTCTAACCTCAGTTAACC 3'	5' TTCGAGCTCTGATCGAGTCTC 3'
S10	5' TCTGGTTTCAATACACCCCC 3'	5' CATCCATCATTAGTGGCAG 3'
S11	5' ATTTGCTATTCTTTGACCTCCG 3'	5' GCTCGAATTGATTTTCGGTAAC 3'
S12	5' CAAGAGCCAAGAGTTGACCC 3'	5' GGCCAGCTAGTTTCGCATAC 3'
S13	5' TCCATTGGCATTCTTAGGG 3'	5' TCAGTGTATGTGAGGCAGGC 3'
S14	5' GTTACGTCCCCTAAAAGCAGTG 3'	5' TTGGCTCTTGTCTAGCTTCTCC 3'
S16	5' TACTGGACTAGACCCGACTTGG 3'	5' GTACTTTTCGGGCTTTCACAAC 3'
SALK_LBb1.3	5' ATTTTGCCGATTTCCGGAAC 3'	-
GABIKAT	-	5'ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT 3'

Anejo II: Secuencia de los cebadores empleados en el trabajo para las RT-PCR semicuantitativas

Nomenclatura cebador	Secuencia cebador
F1 <i>cfp1</i> (FOR)	5' TAAACCGTCCTGCCATAACG 3'
F2 <i>cfp1</i> (FOR)	5' AGGAAGAGGTCCCATTC AAC 3'
R1 <i>cfp1</i> (REV)	5' GGTCTTTGGTTCTCGCAGTC 3'
F1 <i>dhar1-4</i> (FOR)	5' TGAAGACTCTGTTCTCGCTC 3'
R1 <i>dhar1-4</i> (REV)	5' TCAAGGGTTAACCTTGGGAG 3'
F1 <i>dof4.1-1/dof4.1-3</i> (FOR)	5' AGAGTATGATCATGAGCACC 3'
F2 <i>dof4.1-1/dof4.1-3</i> (FOR)	5' ATCTCTTTGAACATCAGGGATT 3'
R1 <i>dof4.1-1</i> (REV)	5' AGGATGATTCCGCTCCATAG 3'
R2 <i>dof4.1-1</i> (REV)	5' TTGCTTGAGTTGCATCTTGG 3'
F3 <i>dof4.1-3</i> (FOR)	5' TGGACCATCATCAGTATCATC 3'
R2 <i>dof4.1-3</i> (FOR)	5' GGCTCCATTAGACAAAAGACAAAG 5'
FT (FOR)	5' ATTTTGCCGATTTCCGGAAC 3'
FOR genC	5' GATGATATTGCAGTTTGTACCCGT 3'
REV genC	5' CACTGTCTTGCTTGTCTTGTCTG 3'

Anejo III: Secuencia de los cebadores empleados en el trabajo para el clonaje del gen *DOF4.1*.

Nomenclatura cebador	Secuencia cebador
<i>DOF4.1 BamHI</i> FOR	5' TAGCGGATCCATGGACCATCATCAGTATCAT 3'
<i>DOF4.1 BamHI</i> REV	5' TGAGGGATCCCCATGTTGGTCCACCACTAT 3'

Anejo IV: Genes de la categoría GO de componente celular: región extracelular entre los genes reprimidos en semillas al 9º día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*.

Locus	Nombre
AT4G23690	<i>Dirigent protein 6 (DIR6)</i>
AT1G13607	<i>Defensin-like protein 286</i>
AT5G19175	<i>Putative defensin-like protein 48</i>
AT4G29300	<i>Low-molecular-weight cysteine-rich 27 (LCR27)</i>
AT1G62760	<i>Pectinesterase inhibitor 10</i>
AT5G03820	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase family protein</i>
AT5G40155	<i>Defensin-like protein 313</i>
AT5G05110	<i>Cysteine proteinase inhibitor 7</i>
AT3G45970	<i>Expansin-like A1 (EXLA1)</i>
AT5G01190	<i>Laccase-10 (LAC10)</i>
AT5G08260	<i>Serine carboxypeptidase-like 35</i>
AT5G45650	<i>Subtilisin-like protease SBT5.6</i>
AT2G47030	<i>Pectinesterase 4 (VGDH1)</i>
AT5G07510	<i>Glycine-rich protein (GRP14)</i>
AT2G47670	<i>Pectinesterase inhibitor 6</i>
AT4G03930	<i>Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 42</i>
AT5G39160	<i>Germin-like protein subfamily 1 member 18</i>
AT5G42242	<i>Putative defensin-like protein 179</i>
AT2G14365	<i>Defensin-like protein 71</i>
AT3G04943	<i>Putative defensin-like protein 188</i>
AT2G14900	<i>Gibberellin-regulated protein 7</i>
AT1G71250	<i>GDSL esterase/lipase</i>
AT3G05930	<i>Germin-like protein subfamily 2 member 3</i>
AT5G26700	<i>Probable germin-like protein subfamily 2 member 5</i>
AT3G27835	<i>Putative defensin-like protein 29</i>
AT3G23167	<i>Putative defensin-like protein 185</i>
AT4G39650	<i>Glutathione hydrolase 2</i>
AT2G17723	<i>Putative defensin-like protein 256</i>
AT1G11590	<i>Probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor</i>

AT4G12910	<i>Serine carboxypeptidase-like 20</i>
AT5G26120	<i>Alpha-L-arabinofuranosidase 2</i>
AT1G19940	<i>Endoglucanase 2</i>
AT3G17155	<i>Defensin-like protein 46</i>
AT4G21650	<i>Subtilisin-like protease SBT3.13</i>
AT2G02147	<i>Defensin-like protein 8</i>
AT4G22115	<i>Putative defensin-like protein 234</i>
AT1G13755	<i>Defensin-like protein 260</i>
AT2G02990	<i>Ribonuclease 1</i>
AT1G49435	<i>Putative uncharacterized protein</i>
AT1G69940	<i>Pectinesterase PPME1</i>
AT3G48580	<i>Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein</i>
AT5G36910	<i>Thionin 2.2 (THI2.2)</i>
AT5G38960	<i>Putative germin-like protein subfamily 1 member 12</i>
AT1G04645	<i>S-protein homolog 5</i>
AT3G13650	<i>Dirigent protein 7</i>
AT3G43505	<i>Defensin-like protein 122</i>
AT5G59845	<i>Gibberellin-regulated protein 10</i>
AT3G62170	<i>Pectinesterase</i>
AT4G11180	<i>Dirigent protein 12</i>
AT3G45970	<i>Expansin-like A1</i>
AT2G33233	<i>Defensin-like protein 50</i>
AT3G04945	<i>Putative defensin-like protein 184</i>
AT1G69970	<i>CLAVATA3/ESR (CLE)-related protein 26</i>
AT1G13590	<i>Phytosulfokines 1</i>
AT1G50650	<i>Stigma-specific STIG1-like protein 4</i>
AT3G48460	<i>GDSL esterase/lipase At3g48460</i>
AT5G01190	<i>Laccase-10</i>
AT4G17718	<i>Putative defensin-like protein 307</i>
AT3G49780	<i>Phytosulfokines 3</i>
AT5G66460	<i>Endo-beta-mannase 7 (MAN7)</i>
AT4G12960	<i>Gamma interferon responsive lysosomal thiol (GILT) reductase family protein</i>
AT1G23147	<i>Protein RALF-like 3</i>
AT3G42473	<i>Defensin-like protein 91</i>
AT1G09550	<i>Pectin acetylsterase 1</i>
AT4G20860	<i>Berberine bridge enzyme-like 22</i>
AT3G17060	<i>Probable pectinesterase 67</i>
AT3G48231	<i>Defensin-like protein 51</i>
AT5G59120	<i>Subtilisin-like protease SBT4.13</i>
AT1G49570	<i>Peroxidase</i>
AT5G05340	<i>Peroxidase 52</i>

Anejo V: Genes más inducidos en semillas al 9° día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*. Se muestran los genes más inducidos ordenados de mayor a menor inducción hasta un factor de inducción de 2.9.

Locus	Factor de inducción	Nombre
AT3G44006	124.7	<i>Unknown protein</i>
AT1G75945	70.7	<i>Hypothetical protein</i>
AT3G60730	46.8	<i>Pectinesterase</i>
AT1G61050	16.8	<i>Alpha 1,4-glycosyltransferase family protein</i>
AT4G38080	15.9	<i>Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein</i>
AT4G09200	14.8	<i>SPIa/Ryanodine receptor (SPRY) domain-containing protein</i>
AT2G36295	11.2	<i>Hypothetical protein</i>
AT5G45690	9.9	<i>Oil body-associated protein 2A / histone acetyltransferase</i>
AT1G03870	8.9	<i>FASCICLIN-like arabinogalactan 9 (FLA9)</i>
AT3G20087	8.7	<i>Cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 17 pseudogene</i>
AT4G36600	8.5	<i>Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein</i>
AT4G03540	8.2	<i>CASP-like protein 1C1 (CASPL1C1)</i>
AT5G04380	7.1	<i>S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein</i>
AT5G44020	6.9	<i>HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase</i>
AT2G47120	5.9	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>
AT4G27140	5.7	<i>Seed Storage Albumin 1 / 2S Seed Storage Protein 1 (SESA1)</i>
AT1G03890	5.7	<i>12S Seed Storage Protein CRD</i>
AT1G14950	5.5	<i>Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein</i>
AT1G21540	5.3	<i>Probable acyl-activating enzyme 9</i>
AT3G28220	5.1	<i>TRAF-like family protein</i>
AT2G05580	5.1	<i>Glycine-rich protein family</i>
AT5G13580	4.95	<i>ATP-Binding Cassette G6 (ABCG6)</i>
AT1G06490	4.4	<i>Callose Synthase 7 (CALS7)</i>
AT2G13550	4.2	<i>Hypothetical protein</i>
AT2G21220	4.1	<i>Putative auxin-regulated protein</i>
AT4G30290	3.9	<i>Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 19 (XTH19)</i>
AT4G01970	3.9	<i>Stachyose synthase</i>
AT1G03880	3.8	<i>Cruciferin 2 / Cruciferin B (CRU2 or CRB)</i>
AT2G39250	3.7	<i>AP2-like ethylene-responsive transcription factor SNZ</i>
AT2G18540	3.7	<i>RmlC-like cupins superfamily protein</i>
AT4G28520	3.6	<i>Cruciferin 3, Cruciferin C or 12S seed storage protein (CRU3 or CRC)</i>
AT3G03341	3.6	<i>Cold-regulated protein</i>
AT1G05510	3.6	<i>Oil body-associated protein 1A (OBAP1A)</i>
AT1G77950	3.6	<i>AGAMOUS-like 67 (AGL67)</i>
AT3G29260	3.6	<i>Short-chain dehydrogenase reductase 5</i>
AT2G03090	3.5	<i>Expansin A15 (EXPA15)</i>

AT2G19900	3.4	<i>NADP-dependent Malic Enzyme 1 (NADP-ME1)</i>
AT4G36360	3.4	<i>Beta-galactosidase 3 (BGAL3)</i>
AT3G56350	3.4	<i>Iron/manganese superoxide dismutase</i>
AT2G02450	3.3	<i>NAC domain-containing protein 35</i>
AT1G27990	3.3	<i>Transmembrane protein</i>
AT2G45900	3.2	<i>Ton1 Recruiting Motif 13 (TRM13)</i>
AT5G24950	3.2	<i>Cytochrome P450 71A15</i>
AT4G16140	3.1	<i>Proline-rich family protein</i>
AT2G40435	3.1	<i>Transcription factor SCREAM-like protein</i>
AT5G48850	3.1	<i>Sulphur Deficiency-induced 1 (SDI1)</i>
AT5G16460	3.1	<i>Seipin-1</i>
AT5G46680	3.0	<i>Pentatricopeptide repeat-containing protein</i>
AT5G54740	3.0	<i>Seed Storage Albumin 5 (SESA5)</i>
AT1G17830	3.0	<i>Hypothetical protein</i>
AT5G44120	3.0	<i>12S Seed Storage Protein (CRA1)</i>
AT3G54510	3.0	<i>Hyperosmolality-gated Ca²⁺ permeable channel 2.5</i>
AT3G14950	3.0	<i>Tetratricopeptide-repeat Thioredoxin-like 2 (TTL2)</i>
AT5G15780	3.0	<i>Pollen Ole e 1 allergen and extensin family</i>
AT4G31000	2.9	<i>Calmodulin-binding protein 60 F</i>
AT5G55240	2.9	<i>Peroxygenase 2 (PXG2)</i>
AT3G15670	2.9	<i>Late Embryogenesis Abundant protein 76</i>

Anejo VI: Genes más reprimidos en semillas al 9º día post-polinización de *dof4.1-3* respecto al *wt*. Se muestran los genes más reprimidos ordenados de mayor a menor factor de represión, hasta un factor de 3.

Locus	Factor de represión	Nombre
AT2G25700	90.67463537	<i>SKP1-like protein 3 (SK3)</i>
AT3G28853	88.56122181	<i>Putative B3 domain-containing protein</i>
AT3G54550	70.36619073	<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta-beta protein, putative</i>
AT4G04580	54.30827824	<i>Homeodomain-like superfamily protein</i>
AT1G26796	54.2495393	<i>Plant self-incompatibility protein S1 family</i>
AT4G28775	53.30463827	<i>Hypothetical protein</i>
AT3G50020	52.00259489	<i>Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein</i>
AT1G08985	40.86556317	<i>AP2/B3-like transcriptional factor family protein</i>
AT1G27250	24.36972879	<i>Paired Amphipathic Helix (PAH2) superfamily protein</i>
AT2G34890	23.25122982	<i>CTP Synthase 5 (CTPS5)</i>
AT3G13370	23.16253636	<i>Formin-like protein</i>
AT1G59800	21.13323679	<i>Cullin-like protein 3</i>

AT2G20170	20.54145811	<i>NEP-interacting protein, putative (DUF239)</i>
AT2G12475	18.33358079	<i>Defensin-like protein 112</i>
AT1G19320	15.76206515	<i>Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein</i>
AT2G24950	14.14396685	<i>Transmembrane protein, putative (DUF239)</i>
AT4G22430	14.1191094	<i>Putative F-box/kelch-repeat protein</i>
AT1G43666	14.07011157	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT4G39760	13.31407547	<i>Putative F-box/kelch-repeat protein</i>
AT2G21420	12.80753352	<i>RBR-type E3 ubiquitin transferase</i>
AT2G04205	12.62620694	<i>ncRNA</i>
AT5G19700	12.19403138	<i>Protein detoxification 52/ MATE efflux family protein</i>
AT5G05960	11.92249482	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT1G47317	11.89729953	<i>Defensin-like protein 289</i>
AT1G31255	11.60636197	<i>Hypothetical protein</i>
AT2G01667	11.23896407	<i>Unknown protein</i>
AT1G43667	11.16263096	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT1G61093	11.08727762	<i>Hypothetical protein</i>
AT2G44970	11.00050106	<i>Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein</i>
AT1G21395	10.85335903	<i>Transmembrane protein</i>
AT4G12825	10.60268689	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT5G38960	10.30595452	<i>Putative germin-like protein subfamily 1 member 12</i>
AT3G53980	10.25756622	<i>Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein</i>
AT3G01415	9.919206111	<i>Tubulin-tyrosine ligase</i>
AT1G26797	9.902039139	<i>Plant self-incompatibility protein S1 family</i>
AT2G02147	9.865330242	<i>Defensin-like protein 8</i>
AT2G19802	9.466517654	<i>Transmembrane protein</i>
AT5G05030	9.382471351	<i>NEP-interacting protein, putative (DUF239)</i>
AT2G04750	9.151202076	<i>Fimbrin-4 (FIM4)</i>
AT2G44250	9.09907065	<i>Protein of Unknown Function (DUF239)</i>
AT4G00295	9.072748832	<i>Fringe-like protein (Fragment)</i>
AT3G60010	8.886290076	<i>SKP1-like protein 13 (ASK13)</i>
AT5G62040	8.854872166	<i>Protein BROTHER of FT and TFL 1 (BFT)</i>
AT2G44240	8.522948641	<i>NEP-interacting protein, putative (DUF239)</i>
AT4G21650	8.317286572	<i>Subtilisin-like protease SBT3.13</i>
AT5G26692	8.269416355	<i>Putative membrane lipoprotein</i>
AT5G52655	8.001319968	<i>Hypothetical protein</i>
AT1G02980	7.964606268	<i>Cullin-2 (CUL2)</i>
AT1G11765	7.908521435	<i>Plant self-incompatibility protein S1 family</i>
AT1G32350	7.834416058	<i>Alternative oxidase 1D (AOX1D)</i>
AT3G42473	7.814167907	<i>Defensin-like protein 91</i>

AT4G22115	7.650893345	<i>Putative defensin-like protein 234</i>
AT3G18470	7.537964422	<i>Protein Plant Cadmium Resistance 7 (PCR7)</i>
AT5G50480	7.426735152	<i>Nuclear factor Y, subunit C6 (NF-YC6)</i>
AT3G49307	7.420681678	<i>Unknown protein</i>
AT1G62760	7.394940333	<i>Pectinesterase inhibitor 10</i>
AT4G01160	7.349324842	<i>BTB/POZ/Kelch-associated protein (LRB3)</i>
AT2G19970	7.311941938	<i>Unknown protein</i>
AT1G59670	7.304796092	<i>Glutathione S-transferase TAU 15 (GSTU15)</i>
AT3G49760	7.191500644	<i>Basic leucine-zipper 5 (BZIP5)</i>
AT4G21040	7.136901677	<i>DOFZinc Finger Protein DOF4.3 (DOF4.3)</i>
AT2G27700	7.02026489	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 family protein / eIF-2 family protein</i>
AT3G45248	6.883668103	<i>ECA1 gametogenesis related family protein</i>
AT1G11593	6.87606226	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein</i>
AT2G01422	6.870800102	<i>ncRNA</i>
AT5G40155	6.821498092	<i>Defensin-like protein 313</i>
AT5G07160	6.787993343	<i>Activator of spomin LUC3 (ASML3)</i>
AT2G19796	6.753675505	<i>Other RNA</i>
AT5G19175	6.720983491	<i>Putative defensin-like protein 48</i>
AT3G48950	6.663159592	<i>Endo-polygalacturonase-like protein</i>
AT1G53282	6.454877543	<i>Plant thionin family protein</i>
AT3G24068	6.359773563	<i>Plant self-incompatibility protein S1 family</i>
AT3G05945	6.238052597	<i>ncRNA</i>
AT3G16895	6.225023101	<i>Defensin-like protein 47</i>
AT1G53285	6.159919753	<i>Plant thionin family protein</i>
AT2G44790	6.072623825	<i>Uclacyanin-2 (UCC2)</i>
AT3G21570	6.064888836	<i>Proline-rich nuclear receptor coactivator</i>
AT3G05930	5.79060073	<i>Germin-like protein subfamily 2 member 3</i>
AT5G11220	5.742709692	<i>Uncharacterized protein F2H11_110</i>
AT1G61095	5.726197732	<i>Hypothetical protein</i>
AT1G54070	5.695515135	<i>Dormancy-associated protein homolog 4</i>
AT5G42242	5.667424352	<i>Putative defensin-like protein 179</i>
AT1G69940	5.518678538	<i>Pectinesterase (PPME1)</i>
AT4G03930	5.488356245	<i>Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily (PPME42)</i>
AT2G33233	5.487614275	<i>Defensin-like protein 50</i>
AT3G21830	5.449268104	<i>SKP1-Like 8 (SK8)</i>
AT5G40360	5.417452728	<i>MYB domain protein 115</i>
AT3G62950	5.394139376	<i>Glutaredoxin-C11</i>
AT1G13607	5.38509701	<i>Defensin-like protein 286</i>
AT3G17155	5.369806835	<i>Defensin-like protein 46</i>
AT1G59930	5.33287509	<i>F23H11.24 protein</i>

AT3G25165	5.320348289	<i>RALFL25</i>
AT3G21860	5.303233105	<i>SKP1-like protein 10</i>
AT1G75250	5.270311142	<i>RAD-like 6</i>
AT1G29140	5.219883382	<i>F28N24.16 protein</i>
AT1G76930	5.199444775	<i>Extensin 4</i>
AT3G27835	5.187534845	<i>Putative defensin-like protein 29</i>
AT2G43660	5.185891063	<i>Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein</i>
AT5G03840	5.118619885	<i>Protein TERMINAL FLOWER 1</i>
AT1G55570	5.104574886	<i>SKU5 SIMILAR 12</i>
AT4G18320	5.019539658	<i>Unknown protein</i>