



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y Celular de Plantas

Estudio para la caracterización de los componentes  
ambientales y genéticos implicados en la longevidad de  
semillas.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Gil Villar, Daniel

Tutor/a: Gadea Vacas, José

Director/a Experimental: NIÑOLES RODENES, REGINA

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

# Estudios para la caracterización de los componentes ambientales y genéticos implicados en la longevidad de semillas

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

**Autor:** Daniel Gil Villar

**Tutor:** José Gadea Vacas

**Director experimental:** Regina Niñoles Ródenes

**Valencia, enero 2022**



## RESUMEN

Las semillas constituyen el principal modo de propagación de las plantas y suponen, por sí mismas, una esencial fuente de alimento, por lo que el estudio de factores que determinen su calidad tiene no sólo importancia para el mantenimiento de la biodiversidad sino también interés agronómico. Por ejemplo, las semillas van perdiendo gradualmente viabilidad durante el almacenamiento y las empresas productoras de semillas demandan mecanismos para retrasar ese “envejecimiento”, que depende tanto de factores ambientales como genéticos. Lo mismo ocurre con otros aspectos de calidad de la semilla, como su tamaño o velocidad germinativa.

En este laboratorio hemos investigado en los últimos años algunos factores genéticos que determinan la calidad de la semilla y trabajos anteriores del grupo han identificado varios mutantes de *Arabidopsis* que presentan una longevidad alterada. Entre otros, el mutante *tt7* tiene afectado un enzima de biosíntesis de flavonoides y presenta una sensibilidad extrema al envejecimiento. Por otra parte, se conoce que las condiciones de crecimiento de la planta madre influyen en el comportamiento posterior de su descendencia, por ejemplo, mediante mecanismos epigenéticos. Por lo tanto, es muy relevante esclarecer cómo factores ambientales como la luz o la temperatura de crecimiento del parental pueden llegar a condicionar la calidad de sus semillas, incluyendo aspectos como longevidad, tamaño, vigor o velocidad de germinación.

En este TFM se estudia cuál es la influencia del ambiente en el que vive la planta madre (luz y temperatura) sobre la calidad de sus semillas. Asimismo, se profundiza en los componentes moleculares que provocan la sensibilidad a envejecimiento acelerado del mutante *tt7*. Por lo tanto, este trabajo investiga los factores ambientales y genéticos que determinan la calidad de las semillas, con el fin último de ofrecer semillas más vigorosas y capaces de mantenerse viables por más tiempo.

## ABSTRACT

Seeds are the main mode of propagation of plants and are, by themselves, an essential source of food, so the study of factors that determine their quality is not only important for the maintenance of biodiversity but also of agronomic interest. For example, seeds are likely to lose its viability during storage and seed companies are demanding mechanisms to delay this “aging”, which depends on both environmental and genetic factors. The same happens with other aspects of seed quality, such as its size or germination speed.

In our laboratory we have investigated in recent years some genetic factors that determine seed quality, and previous work by the group has identified several *Arabidopsis* mutants that have altered longevity. Among others, the *tt7* mutant has an affected flavonoid biosynthesis enzyme and is extremely sensitive to ageing. On the other hand, it is known that the growth conditions of the mother plant influence the subsequent behaviour of its offspring, for example, through epigenetic mechanisms. Therefore, it is very relevant to clarify how environmental factors such as light or the parental growth temperature can condition the quality of its seeds, including aspects such as longevity, size, vigour, or germination speed.

In this TFM we study the influence of the environment in which the mother plant lives (light and temperature) on the quality of its seeds. Likewise, the molecular components that cause sensitivity to accelerated aging of the *tt7* mutant will be studied. Therefore, this work investigates the environmental and genetic factors that determine the quality of the seeds, with the ultimate goal of offering more vigorous seeds capable of stabilizing viability for longer periods.

El presente TFM, se alinea perfectamente con el ODS 13: “Acción por el clima: adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos”, donde la agricultura es considerada como uno de los sectores más vulnerables a los impactos del cambio climático. Nuestros resultados han determinado cómo afecta un cambio ambiental a la calidad de las semillas de diferentes accesiones de *A. thaliana*, lo que ayuda a establecer las condiciones más apropiadas para obtener semillas de calidad. Dada la importancia de las semillas en la alimentación humana, esta propuesta se alinea también con el ODS 2: “Hambre cero”. Por último, aumentar la longevidad de las semillas contribuye al mantenimiento de la biodiversidad y, por tanto, se alinea con el ODS 15: “Vida de ecosistemas”: donde se incluye detener la pérdida de biodiversidad.

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

## INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. La semilla: un éxito evolutivo.....	1
1.2. Longevidad de semillas: concepto e importancia .....	1
1.3. La semilla de <i>Arabidopsis thaliana</i> L. ....	2
1.3.1. La cubierta de la semilla .....	2
1.3.2. Tejidos zigóticos.....	3
1.4. Factores que afectan a la viabilidad de las semillas.....	4
1.4.1. Factores ambientales durante el desarrollo de la semilla. ....	4
1.4.2. Factores durante el almacenamiento .....	4
1.5. Mecanismos protectores contra el envejecimiento de la semilla .....	5
1.5.1. Primera barrera protectora: la cubierta .....	5
1.5.2. Segunda barrera protectora: el estado vítreo .....	7
1.5.3. Tercera barrera protectora: antioxidantes pasivos no enzimáticos .....	7
1.5.4. Mecanismos para la reparación y detoxificación celular.....	8
1.6. Trabajos previos para la mejora de la longevidad en semillas .....	9
1.7. Tratamientos y ensayos de la longevidad de semilla.....	10
1.8. Variabilidad natural de la longevidad de semillas en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
OBJETIVOS .....	12
2.1. Componente ambiental .....	13
2.2. Componente genético.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
3.1. Material vegetal.....	15
3.2. Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
3.2.1. Esterilización y estratificación de semillas.....	15
3.2.1.1. Esterilización con gas cloro y estratificación de semillas .....	15
3.2.1.2. Esterilización con EtOH y estratificación de semillas .....	16
3.2.2. Cultivo in vitro.....	16
3.2.2.1. Método de cultivo in vitro en medio sólido .....	16
3.2.3. Cultivo en invernadero .....	17
3.2.3.1. Solución nutritiva .....	17
3.2.3.2. Condiciones de cultivo .....	18
3.2.3.3. Recolección y almacenamiento de semillas .....	18
3.2.4. Separación testa y embrión de semillas en desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
3.3. Caracterización de semillas. ....	19
3.3.1. Ensayo de envejecimiento acelerado ( <i>Controlled Deterioration Treatment</i> , CDT).....	19
3.3.2. Análisis de dormancia en semillas. ....	19
3.3.3. Ensayo de permeabilidad de sales de tetrazolio .....	20
3.4. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos .....	20
3.4.1. Extracción de RNA en testa y embrión de semillas de <i>A. thaliana</i> .....	20
3.4.2. <i>RNAseq</i> y análisis bioinformático de datos.....	21
RESULTADOS.....	23
4.1. Influencia de las condiciones ambientales de la planta madre en la calidad de sus semillas .....	24
4.1.1. Ensayo de longevidad de semillas .....	24
4.1.1.1. Germinación en ausencia de envejecimiento acelerado.....	24
4.1.1.2. Germinación tras envejecimiento acelerado .....	25
4.1.2. Ensayo de dormancia de semillas .....	27
4.1.2.1. Análisis de la dormancia de las accesiones con germinación inferior al 50% inmediatamente tras la recolección.....	28
4.1.2.2. Análisis comparativo de la dormancia de todas las accesiones .....	28

4.1.3. Análisis de la correlación entre la longevidad y la dormancia de las semillas de accesiones crecidas en diferentes condiciones de luz y temperatura .....	30
4.1.3.1. Correlación para todas las accesiones y bajo todas las condiciones de cultivo .....	30
4.1.3.2. Correlación para todas las accesiones en cada una de las condiciones estudiadas .....	30
4.1.3.3. Correlación para cada accesión en todas las condiciones de crecimiento estudiadas .....	31
4.1.4. Análisis de la permeabilidad de las semillas .....	32
<b>4.2. Búsqueda de componentes/factores moleculares que determinan la reducida longevidad de las semillas de tt7 .....</b>	<b>34</b>
4.2.1. Análisis transcriptómico mediante RNAseq de testas de mutantes <i>tt3 tt7cr</i> .....	34
4.2.1.1. Análisis de categorías funcionales de los genes obtenidos en la testa .....	34
4.2.1.2. Análisis para la identificación de factores de transcripción (TF) mediante TF2Network .....	36
4.2.2. Análisis transcriptómico mediante RNAseq de embriones mutantes <i>tt3 tt7</i> .....	39
4.2.2.2. Análisis de categorías funcionales de los genes obtenidos en el embrión .....	39
4.2.2.3. Análisis para la identificación de factores de transcripción (TF) mediante TF2Network .....	41
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo I. Extracción de semillas de las silicuas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo II. Análisis de la dormancia de las accesiones con germinación inferior al 50% .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo III. Extracto de los 100 primeros genes con mayor expresión en el análisis de la testa del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>Anexo IV. Extracto de los 100 primeros genes con menor expresión en el análisis de la testa del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>Anexo V. Descripción de las dianas de WRKY33 identificadas en TF2Network para la testa del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo VI. Descripción de los factores de transcripción menos expresados, y sus dianas, identificadas en TF2Network para la testa del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo VII. Extracto de los 100 primeros genes con mayor expresión en el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>Anexo VIII. Extracto de los 100 primeros con menor expresión en el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo IX. Descripción de los factores de transcripción con mayor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo X. Descripción de los 139 genes diana comunes para los factores de transcripción con mayor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo X. Descripción de los factores de transcripción con menor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo XI. Descripción de los genes diana comunes para los factores de transcripción menos expresados identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante <i>tt7</i> .....</b>	<b>96</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una semilla desarrollada de <i>A. thaliana</i> y detalle de la cubierta. ....	2
Figura 2. Esquema del desarrollo y composición de semillas en <i>A. thaliana</i> . ....	3
Figura 3. Esquema de los factores que afectan a la viabilidad de la semilla. ....	5
Figura 4. Esquema de la formación de quercetina a partir del kaempferol. ....	6
Figura 5. Esquema del ciclo glutatión-ascorbato. ....	8
Figura 6. Gráfico de distribución de la longevidad de las diferentes accesiones. ....	11
Figura 7. Método de esterilización con gas cloro. ....	16
Figura 8. Detalle de las placas Petri con gel de agarosa. ....	16
Figura 9. Cultivo de semillas en papel Whatman. ....	17
Figura 10. Placas Petri con semillas germinadas. ....	17
Figura 11. Método de envejecimiento controlado (CDT). ....	19
Figura 12. Datos de germinación de las diferentes accesiones cultivadas bajo las cuatro condiciones de luz y temperatura. ....	24
Figura 13. Gráficas mostrando la germinación de las accesiones crecidas en diferentes condiciones ambientales (luz y temperatura) después del proceso de envejecimiento acelerado (CDT). ....	27
Figura 14. Gráficas comparativas de la germinación de todas las accesiones a día 0 ....	29
Figura 15. Gráfica de correlación entre la longevidad y la dormancia de las accesiones. ....	30
Figura 16. Gráfica de correlación entre la longevidad y la dormancia de las accesiones en cada una de las condiciones de cultivo. ....	31
Figura 17. Gráficas comparativas de la longevidad y la dormancia de cada una de las accesiones frente a todas las condiciones de cultivo. ....	32
Figura 18. Imagen representando la permeabilidad de las semillas de las accesiones a sales de tetrazolio. ....	33
Figura 19. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes inducidos en la testa de las semillas del mutante <i>tt3tt7cr</i> mediante Panther. ....	35
Figura 21. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes reprimidos en la testa de las semillas <i>tt3tt7cr</i> mediante Panther. ....	36
Figura 21. Dianas del factor de transcripción (FT) WRKY 33 obtenidas a partir del software TF2Network. ....	37
Figura 22. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes inducidos en el embrión del mutante <i>tt3tt7cr</i> mediante Panther. ....	40
Figura 23. Principales categorías funcionales a partir de los genes reprimidos en el embrión de las semillas del mutante <i>tt7</i> obtenidos mediante Panther. ....	41
Figura 24. Red de interacciones de los factores de transcripción inducidos en el embrión y los genes presentes en el análisis. ....	42
Figura 25. Nivel de interacción y especificidad de los genes frente a cada uno de los factores de transcripción inducidos en el embrión. ....	42
Figura 26. Red de interacción entre los factores de transcripción reprimidos en el embrión y los genes presentes en el análisis. ....	43
Figura 27. Diagrama de Venn para la relación entre los factores de transcripción y los genes. ....	44
Figura 29. Esquema de la síntesis de compuestos flavónicos. ....	50

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de P50 para cada una de las accesiones de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas en el trabajo. ....	26
Tabla 2. Datos de DSDS50 de las accesiones con germinación inferior al 50% tras cosecha. ....	28
Tabla 3. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente inducidos. ....	36
Tabla 4. Dianas del factor de transcripción WRKY33. ....	37



Tabla 5. Detalle de los resultados del análisis del de búsqueda de factores de transcripción utilizando TF2 para los genes reprimidos. ....	37
Tabla 6. Genes diana de los TF de los gnes reprimidos, para los que se ha demostrado interacción directa proteína /DNA .....	38
Tabla 7. Dianas comunes a los distintos factores de transcripción que regulan los genes reprimidos en la testa de tt3 tt7cr. ....	38
Tabla 8. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente inducidos. ....	41
Tabla 9. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente reprimidos. ....	43

## ABREVIATURAS

4CL: 4-coumarate CoA-ligase	M: molar
AA: Accelerated Ageing	MCFW: Moisture Content Fresh Weight
APX: Ascorbato peroxidasa	MDHAR: monodehidroascorbato reductasa
atm: Atmósfera	mM: milimolar
C3H: p-Coumarate 3-Hydroxylase	MOPS: Acido 3-(n-Morfolino)-Propanosulfónico
C4H: Cinnamate 4-Hydroxylase	mRNA: RNA mensajero
CAD: Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase	MS: Murashige-Skoog
CAT: Catalasa	MSR: metionina sulfóxido reductasa
CCoAOMT: Caffeoyl-CoA O-Methyltransferase	MST: $\beta$ -mercaptopiruvato sulfurotransferasa
CCR: Cinnamoyl-CoA Reductase	NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido reducido
cDNA: DNA complementario	NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
CDT: Controlled Deterioration Treatment	P50: Predicción 50% de la germinación
CHI: Chalcone Isomerase	PA: Proantocianidina
CHS: Chalcone Synthase	PAL: Phenylalanine Ammonia-Lyase
Col-0: Columbia 0	PCI: fenol -cloroformo - alcohol isoamílico
COMT: Caffeic acid O-Methyltransferase	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
CSE: Caffeoyl Shikimate Esterase	PEG: polietilenglicol
DAP: Days After Pollination	PER: Peroxidase
DHAR: Dehidroascorbato reductasa	PHT: Hydroxycinnamoyl-CoA:Putrescine HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE
DNA: ácido desoxirribonucleico	PIMT: L-isoaspartil O-metiltransferasa
DOF: DNA-Binding One Zinc Finger	PMT: p-Coumaroyl-CoA Monolignol Transferase
Dpp: Días después de la polinización	PPFD: Photosynthetic Photon Flux Density, densidad de flujo de fotones fotosintéticos
DSDS50: Days of Seed Dry Storage required to reach 50% germination	p/v: peso/volumen
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	QTL: Quantitative Trait Locus
EPPO: Elevated Partial Pressure of Oxygen	Rev: cebador sentido reverse o reverso
F3'H: Flavonoid 3'-Hydroxylase	RNA: ácido ribonucleico
F5'H: Flavonoid 5'-Hydroxylase	RNASeq: secuenciación del RNA
F5H: Ferulate 5-Hydroxylase	ROF: Oligosacárido de la familia de la rafinosa
FMT: Feruloyl-CoA Monolignol Transferase	ROS: Reactive Oxygen Species
FNS: Flavone synthase	Rpm: revoluciones por minuto
For: cebador sentido forward o directo	RT PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
GR: Glutación reductasa	SDS: dodecil sulfato sódico
GSH: Glutación en forma reducida	SNP: Single Nucleotide Polymorphism
GSSG: Glutación en forma oxidada	SOD: Superóxido dismutasa
GWAS: Genome Wide Association Study	SSP: Seed Storage Protein
Hcaldh: Hydroxycinnamaldehyde Dehydrogenase	STS: Stilbene Synthase
HCT:p-Hydroxycinnamoyl-CoA:Quinate/SHIKIMATEp-Hydroxycinnamoyltransferase	TAL: Tyrosine Ammonia-Lyase
HR: Humedad relativa	THT: Hydroxycinnamoyl-CoA:TyramineN-Hydroxycinnamoyltransferase
HSP: Heat Shock Protein	Tm: Temperatura de melting
K-3-7-R: kaempferol-3-7-dirhamnosido	UV: ultravioleta
K-3-G-7-R: kaempferol 3-glucósido-7-rhamnosido	v/v: volumen/volumen
K-3-G: kaempferol-3-glucósido	wt (wild type): silvestre
K-3-R: kaempferol-3-rhamnósido	$\mu$ M: micromolar
LB: Lysogeny broth	$\mu$ L: microlitro
LEA: Late Embryogenesis Abundant	



# **INTRODUCCIÓN**

## 1.1. La semilla: un éxito evolutivo

¿Qué hubiera sido la humanidad sin las semillas? El cambio evolutivo que se dio en las plantas pteridófitas (vasculares sin semillas) por duplicación genómica supuso la aparición de las plantas espermatofitas (vasculares con semillas). Las primeras basaban su reproducción en la formación de estructuras específicas de propagación, como rizomas o estolones, que no les permitía expandirse más allá de sus límites radiculares, lo cual se traduce en una escasa colonización de otros territorios. La aparición de las semillas proporcionó la posibilidad de dispersarse a largas distancias haciendo uso de agentes ambientales, como el agua o el viento, o con la ayuda de los seres vivos. Este salto evolutivo fue crucial para la propagación vegetal y la exploración y adaptación de las plantas a otros hábitats, permitiéndoles ocupar nichos ecológicos distintos a los de su origen y favoreciendo que las plantas fueran capaces de desarrollarse en todo tipo de climas y edafologías (Peris *et al.*, 2010). Esta nueva adaptación también fue, mucho más tarde, decisiva para el ser humano, que convirtió el uso y consumo de semillas en uno de los principales pilares de la civilización. Las semillas se definen como unidades diseminativas individuales que encapsulan el embrión gracias a una cubierta, la cual permite preservarlo a lo largo del tiempo y conservar su viabilidad frente a los factores ambientales. De este modo el embrión podrá, tras recibir los estímulos necesarios, germinar con ayuda de los nutrientes que se encuentran presentes en la semilla y que, durante el desarrollo post-embriionario, se movilizarán para promover el crecimiento de la plántula hasta que ésta pueda realizar la fotosíntesis de forma eficiente. La protección del embrión va a ser determinante para que la semilla sea capaz de germinar, y va a estar dictada tanto por la estructura física de la semilla como por su composición nutritiva, contenido en antioxidantes y su genética.

## 1.2. Longevidad de semillas: concepto e importancia

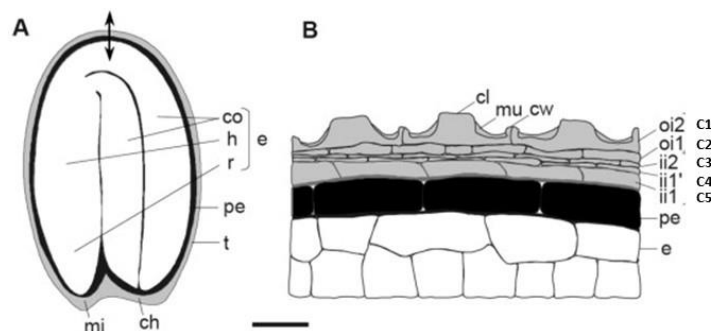
La longevidad de las semillas se define como el periodo máximo de tiempo que una semilla puede conservar su viabilidad (Sano *et al.*, 2016). La propagación a través de semillas no sólo resulta de interés para la industria agroalimentaria, sino que es también importante a nivel ecológico y para su conservación. Este sistema precisa de un menor coste económico si se compara con la conservación y propagación de recursos fitogenéticos *in situ* (esquejado, mantenimiento de plantas madre, propagación *in vitro*...), tanto por sus características intrínsecas como por su pequeño tamaño (Pita Villamil, 2001), lo que ha permitido crear los denominados bancos de semillas. Aunque la conservación de semillas comerciales en este tipo de instalaciones está perfectamente establecida y controlada, esto no ocurre en condiciones de almacenamiento menos controladas, como es el caso en empresas distribuidoras de semillas o, desde luego, en la naturaleza, donde las semillas están en el suelo sometidas a condiciones muy variables. El principal problema tras un largo periodo de almacenamiento de las semillas es una implantación en campo tardía, aparición de anomalías en las plántulas y una pérdida de viabilidad gradual. Esto genera grandes pérdidas económicas, además de una posible pérdida de diversidad genética (Rajjou & Debeaujon, 2008). Con todo esto, es importante comprender los mecanismos que determinan la viabilidad de las semillas. La viabilidad se empieza a determinar durante la última etapa del desarrollo de la semilla, a la vez que se va adquiriendo tolerancia a la desecación (Verdier *et al.*, 2013). Esta adquisición va a estar determinada por los factores genéticos de cada semilla, es decir, su genotipo (Bekker *et al.*, 2003), así como por

aspectos del ambiente, como es el caso de su contenido en agua, la humedad relativa ambiental, o la temperatura a las que las semillas están sometidas (Groot et al., 2012; Sano et al., 2016).

### 1.3. La semilla de *Arabidopsis thaliana* L.

#### 1.3.1. La cubierta de la semilla

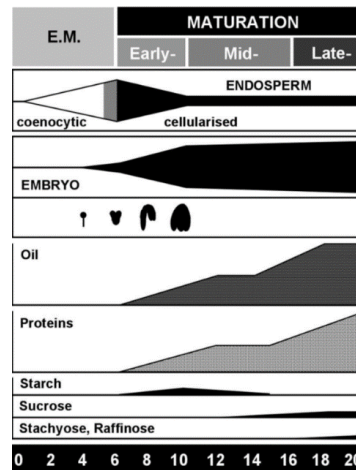
La formación de la semilla debe coordinar el crecimiento de tejidos de origen diverso. La formación de las semillas comienza tras la fertilización del óvulo o, más concretamente, la doble fertilización del saco embrionario que resulta en la formación de tres tejidos diferentes desde un punto de vista genético. (Figura 1). Dos de ellos corresponden al tejido zigótico: siendo el embrión, que contiene una dotación genética diploide, a partir del cual se obtendrá la planta; y el endospermo, que posee una dotación genética triploide con un equivalente genómico materno y otro paterno, y que contiene los compuestos de reserva que nutrirán el embrión. El tejido más externo es el que dará lugar a la cubierta de la semilla, de origen materno (Berger et al., 2006). En *Arabidopsis thaliana*, la cubierta consta de cinco capas bien diferenciadas, dos en el integumento externo, y tres en el interno. Será en las células de este último (capa 5) donde se sintetizan unos compuestos antioxidantes conocidos como proantocianidinas (PA), o taninos condensados, que dotan de color marrón a la semilla, mientras que las dos capas más externas (3 y 4) se condensan en las etapas finales del desarrollo. En el integumento externo se encuentran dos filas de células. En la capa interior que corresponde a la subepidermis (capa 2), se engrosa la pared celular interna formando una empalizada y se sintetiza suberina, cuyo cometido es evitar que fluidos como el agua y gases penetren hacia el interior de la semilla formando una barrera impermeable (Pollard et al., 2008). Finalmente, las células de la epidermis (capa 1) serán las encargadas de sintetizar y secretar al apoplasto un polisacárido constituido por pectinas, el mucílago, que se depositará en una pared celular secundaria llenando por completo el espacio de la columna citoplasmática, dando lugar a la columela. El mucílago envuelve la semilla encapsulándola por completo, y su función es proteger de los factores ambientales, así como ayuda adicional para la correcta germinación de la semilla por su alta capacidad de hidratación (Western et al., 2000). Resumiendo, el tejido de la cubierta ejerce de barrera para el embrión, ofreciendo una notable defensa frente a los factores ambientales a lo largo del periodo de embriogénesis, latencia y posterior germinación, así como en el proceso de dispersión (Windsor et al., 2000; Haughn & Chaudhury, 2005).



**Figura 1. Esquema de una semilla desarrollada de *A. thaliana* y detalle de la cubierta. A.** Imagen global de la semilla y su embrión, de la cual nos centraremos en la cubierta (t, testa). **B.** Detalle exhaustivo de las capas de la cubierta de la semilla. En la imagen se aprecia el embrión (e), endospermo de la periferia (pe), el integumento interno (ii) que corresponden a las capas 3-5, el endotelio (ii1 capa 5, ii1' capa 4, ii2 capa 3) y el integumento externo (oi), donde se diferencia la capa de suberina (oi1, capa 2), la epidermis (oi2, capa 1) y el mucílago (mu). Modificado de Rajjou & Debeaujon (2008).

### 1.3.2. Tejidos zigóticos

Podemos definir la generación de la semilla en dos etapas: la morfogénesis y la maduración embrionarias. La segunda etapa se distingue por ser el periodo del desarrollo donde se acumulan compuestos de almacenamiento y se establecen las características para la tolerancia a la desecación y para la entrada en el período de latencia. (**Figura 2**).



**Figura 2. Esquema del desarrollo y composición de semillas en *A. thaliana*.** Se evidencia el volumen relativo, y la evolución, durante el desarrollo de la semilla del endospermo y embrión, del cual quedan representadas las etapas globulares, torpeda, cotiledón temprano doblado y en U hacia arriba. En la zona inferior se puede ver como aumentan los niveles de los compuestos de almacenamiento aceites (como triacilglicérols) y proteínas, así como el contenido en carbohidratos, conforme va madurando la semilla. E.M., morfogénesis embrionaria. **Adaptado de Baud et al., 2008**

Como se comentó anteriormente, el cigoto ( $2n$ ) y el endospermo ( $3n$ ) se forman después de una doble fertilización en el saco embrionario. El embrión pasa por una fase de morfogénesis embrionaria, mientras que el endospermo precisa de dos fases para desarrollarse. Cuando el embrión está formado, la semilla entra en la fase de maduración, momento en el que se acumulan compuestos de almacenamiento para preparar la semilla para la latencia y la tolerancia a la desecación (**Goldberg et al., 2012**).

La fase de maduración se puede dividir en tres etapas. La primera de ellas se conoce como **maduración temprana**, que se da entre los siete y diez días después de la polinización (DAP), y pertenece a la fase de crecimiento embrionario que resulta en la ocupación total de la cavidad seminal. A lo largo de este periodo la proporción entre el volumen que ocupa el embrión y el endospermo tienen una relación inversa: en el embrión se da un proceso de división y expansión celular, mientras que el endospermo se ve degradado y pasa a ser una capa de células que cubren al embrión. Este proceso va acompañado de una síntesis y acumulación de pigmentos fotosintéticos que dotan la semilla de una tonalidad glauca, además de una alta concentración de almidón que será de utilidad hasta que se complete la síntesis y acumulación de proteínas y lípidos de reserva.

La segunda etapa corresponde a la **maduración per se**, comprendida entre los once y dieciséis DAP, y caracterizada por una caída progresiva de los niveles de almidón y una alta actividad de síntesis de ácidos grasos y proteínas, lo que implica un incremento ininterrumpido del peso de la semilla a lo largo del proceso.

Por último, la semilla entra en la etapa de **maduración tardía**, comprendida entre los diecisiete y veinte DAP. Esta etapa queda definida por la finalización de la síntesis de los compuestos de reserva y la inactivación del metabolismo, manteniendo únicamente la síntesis y almacenamiento de rafinosa y estaquiosa que, junto a la sacarosa y la trehalosa, ejercen una función protectora de membranas y proteínas, otorgando los atributos de tolerancia a la desecación que queda acompañado de una caída drástica del contenido hídrico del 32% al 10% (Baud et al., 2008).

## **1.4. Factores que afectan a la viabilidad de las semillas**

### **1.4.1. Factores ambientales durante el desarrollo de la semilla.**

Las condiciones ambientales en las que se desarrolla una semilla van a condicionar su viabilidad. Uno de los factores es el estrés hídrico en la planta madre durante la formación y maduración de la semilla. Al parecer este comportamiento está determinado por la señalización del Ácido Abscísico (ABA), que interviene en la inactivación de los cloroplastos durante la maduración de la semilla (Zinsmeister et al., 2020). La temperatura es otro de los factores determinantes para la longevidad de las semillas, y tiene un efecto distinto sobre diferentes especies vegetales. Las semillas de algunas especies ven incrementada su longevidad por temperaturas cálidas durante su desarrollo; otras, por el contrario, sufren un descenso de la longevidad con este tipo de temperaturas. Algo similar sucede cuando las plantas se someten a periodos de temperaturas bajas durante el desarrollo de las semillas. En *Arabidopsis thaliana* las bajas temperaturas influyen en la composición de fenilpropanoides y en la permeabilidad de la cubierta (MacGregor et al., 2015), tejido que si se ve afectado se ha comprobado que reduce la longevidad de las semillas (Debeaujon et al., 2000; Penfield & MacGregor 2017). La luz a la que la planta madre está sometida también puede causar un efecto importante en la viabilidad de la semilla. Las semillas verdes pueden captar hasta un 20-30% de luz, efecto que va a estar determinado por la presencia de cloroplastos activos en el embrión durante la maduración de la semilla. Una alta actividad fotosintética genera radicales de oxígeno, por lo que es importante arrestar la actividad fotosintética para el futuro almacenamiento, inhibiendo la actividad del fotosistema II, y degradando la clorofila (Allorent et al., 2015; Li et al., 2017; Smolikova et al., 2018).

### **1.4.2. Factores durante el almacenamiento**

El ambiente en el cual se almacena una semilla va a influir en su viabilidad (Figura 3). El agente externo que más daño ocasiona al embrión y que más condiciona, por tanto, la viabilidad de la semilla es el oxígeno, en particular el estrés asociado a las especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (Bailly, 2004). Los daños provocados por las ROS se traducen en la modificación e inactivación de proteínas, lípidos, RNA y DNA, favoreciendo así disfunciones celulares (Davies, 2005; Møller et al., 2007; Contreras et al., 2008).

En los ácidos nucleicos, la inactivación sucede gracias a la reacción entre el radical hidroxilo y las ribosas, aunque también es posible que las bases nitrogenadas se vean modificadas (Bray & West, 2005). Las proteínas y lípidos también son potenciales dianas, en especial los de tipo ácido graso poliinsaturado o lípidos de reserva, que pueden ser degradados mediante peroxidación lipídica, lo cual compromete la viabilidad de la semilla (Wilson & McDonald, 1986). Otros ácidos grasos que se pueden ver afectados son los lípidos de membrana, cuya degradación resultará en



una desestructuración de la misma repercutiendo en los procesos de transporte transmembrana, especialmente en la salida de iones o "ion leakage". Las enzimas son otros de los compuestos que las ROS son capaces de inactivar, a las cuales pueden alterar sus sitios activos, lo que se conoce como carbonilación proteica (Rajjou et al., 2008). En términos generales, si estos compuestos se ven afectados por las ROS, las funciones quedarán alteradas o inhabilitadas como consecuencia de un desequilibrio en las reacciones RedOx, dando lugar al estrés oxidativo (Ratajczak et al., 2015).

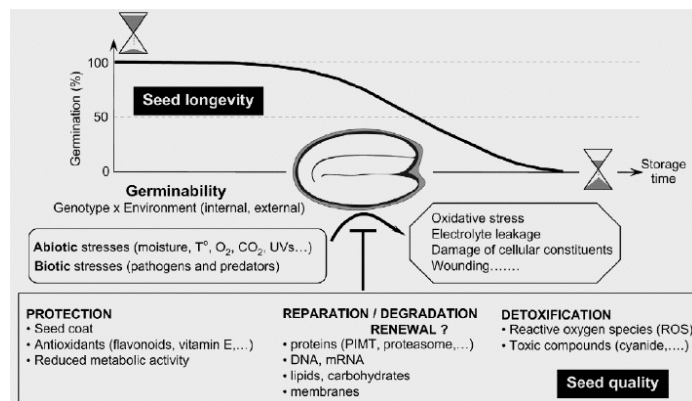


Figura 3. Esquema de los factores que afectan a la viabilidad de la semilla. Queda ilustrado cómo se ve afectado el envejecimiento frente al transcurso del tiempo, dónde intervienen factores ambientales (forma redondeada), factores moleculares (forma hexagonal) y los mecanismos de defensa que posee la semilla para hacer frente al envejecimiento (forma rectangular) (Rajjou & Debeaujon 2008).

## 1.5. Mecanismos protectores contra el envejecimiento de la semilla

El ritmo de envejecimiento de las semillas va a estar determinado por sus factores genéticos (especie, cepa, variedad...) y fisiológicos, por lo que es crítico identificar y entender qué estructuras y mecanismos moleculares son determinantes para generar semillas con mayor longevidad. Sobrevivir durante largo tiempo va a depender de los mecanismos de protección, detoxificación y reparación de daños moleculares que una semilla haya adquirido durante su formación (Rajjou et al., 2008).

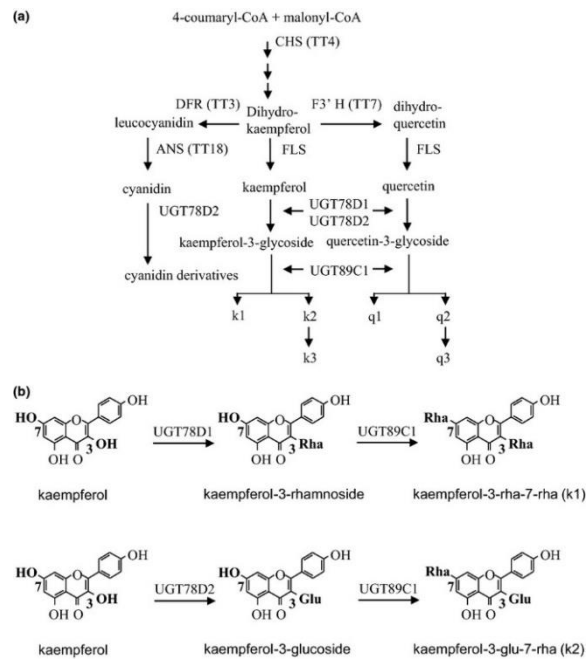
### 1.5.1. Primera barrera protectora: la cubierta

El primer sistema defensivo que tiene la semilla para sortear la acción de los factores ambientales externos es la cubierta o testa. El atributo protector de la cubierta hace referencia a la mitigación de la fluctuación de factores externos como la humedad y la temperatura, o patógenos como hongos y bacterias, siendo además capaz de aumentar su dormancia, evitando germinaciones precoces. Pero no solo cumple funciones de protección física, también es capaz de almacenar compuestos de reserva y enzimas hidrolíticas, que serán liberados una vez ésta se hidrate, y cuya presencia será imprescindible para que pueda germinar. La acumulación de estos metabolitos en la cubierta aumenta significativamente su viabilidad a lo largo del tiempo (Raviv et al., 2017).

De entre los compuestos capaces de proteger la semilla, los flavonoides han sido siempre los que, *a priori*, más protección podrían ofrecer. Inicialmente se pensó que estos pigmentos tenían una función antioxidante estricta, tal como se sugirió en uno de los primeros estudios, donde se

observó que semillas de líneas mutantes deficientes en algunos genes de la síntesis de flavonoides (*transparent testa*, *tt*) tenían mayor sensibilidad al envejecimiento (Debeaujon et al., 2000). Más recientemente, se comprobó que las proantocianidinas (PA) tienen una función estructural por formar parte de la cutícula asociada al endospermo, debido a que los mutantes sin estos flavonoides bien veían su cutícula afectada o, simplemente, no existía este tejido (Loubéry et al., 2018). En definitiva, la falta de PAs se traduce en un incremento de la permeabilidad de la semilla y, consecuentemente, una disminución de su longevidad.

De todas las líneas mutantes deficientes en flavonoides, aquella cuyas semillas presentan una menor viabilidad es la línea mutante en el gen *TT7*, que codifica para una flavonoide hidroxilasa 3' (F3'H), que cataliza la transformación de dihidro-kaempferol a dihidro-quercetina, a partir de la cual se acabará formando la quercetina con la ayuda de la enzima FLS (Figura 4) (Yin et al., 2014). Los mutantes *tt7*, deficientes en la formación de quercetina, acumulan kaempferol 3-glucósido-7-rhamnosido (K-3-G-7-R), kaempferol-3-glucósido (K-3-G) y kaempferol-3-7-dirhamnosido (K-3-7-R) en su embrión, mientras que en la cubierta sobre acumulan Kaempferol-3-rhamnósido (K-3-R), lo que se traduce en una formación incorrecta de la misma y en una disminución drástica de la longevidad. Los defectos causados por la pérdida de función del gen *TT7* con relación a la viabilidad de la semilla son específicos de la cubierta, que no completa su desarrollo, por lo que la semilla "madura" posee una deficiente capa de suberina. Sin embargo, la alteración en la composición de flavonoides que provoca este mutante afecta también al embrión, por lo que este también podría tener funciones alteradas (Niñoles et al., 2022). Un análisis preliminar de transcriptómica indica, de hecho, que el mutante *tt7* presenta alteración en un gran número de categorías funcionales, como el metabolismo de lípidos, el citoesqueleto, los plasmodesmos, la señalización celular o el tráfico de orgánulos. Desafortunadamente, este estudio se realizó sobre semillas completas, por lo que todavía queda por definir qué parte de la semilla (la testa o el embrión) está afectada en cada proceso.



**Figura 4. Esquema de la formación de quercetina a partir del kaempferol. A:** Detalle del esquema de la ruta de biosíntesis. **B:** Detalle de los distintos compuestos de kaempferol y las enzimas que catalizan el proceso. Extraída de Yin et al., 2014.

### 1.5.2. Segunda barrera protectora: el estado vítreo

Como se comentó anteriormente, las semillas ortodoxas reducen su contenido en agua por debajo del 30% de su peso total, lo que les permite mantenerse viables durante periodos de tiempo largos, pudiendo así ser conservadas durante años. Este mecanismo de desecación requiere que se activen mecanismos moleculares para impedir que las células sean dañadas por la imposibilidad de obtener agua. El proceso principal es una disminución drástica de la actividad metabólica, llegando a estabilizarse en un estado de quiescencia, que se da como consecuencia de un cambio en el estado físico-químico del citoplasma celular, lo que se conoce como “estado vítreo” o “*glassy state*” (Buitink et al., 2000). Es entonces cuando el citoplasma adquiere una textura altamente viscosa que imposibilita la difusión molecular, limitando tanto las reacciones químicas como la síntesis de compuestos tóxicos (ROS) que pueden dañar los compuestos celulares, además de mantener los compuestos lipídicos en un estado de fluidez bajo (Buitink & Leprince, 2008; Leprince et al., 2017). Además de la pérdida de agua y las bajas temperaturas, esta alta densidad del citoplasma se ve favorecida por la presencia de sacarosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (ROFs), por las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que son altamente hidrofílicas (Sano et al., 2016) y proteínas de choque térmico (HSP). Se ha comprobado que si la semilla reduce su contenido en LEAs (dehidrinas), su longevidad se verá reducida en hasta un 50% (Hundertmark et al., 2011); de forma similar, una mayor presencia de HSP se traduce en una mejora en la tolerancia al envejecimiento cuando las células pasan del estado vítreo a un estado fluido, debido a que estas proteínas son capaces de corregir los daños producidos tanto en el estado de inactivación como en el momento de la reactivación de la actividad molecular (Prieto-Dapena et al., 2006).

### 1.5.3. Tercera barrera protectora: antioxidantes pasivos no enzimáticos

Una alta presencia de antioxidantes en las semillas secas servirá de escudo frente a daños oxidativos, y favorecerá su longevidad. Antioxidantes pasivos son aquellos compuestos que no presentan actividad enzimática, pero sí una alta funcionalidad protectora frente a agentes oxidativos, como la vitamina E, el glutatión, el ascorbato o los flavonoides, aunque también existen proteínas con actividad antioxidante como son las proteínas de reserva SSPs (*Seed Storage Proteins* o SSPs). La vitamina E previene la peroxidación de los lípidos presentes en las células (antioxidantes lipofílicos), concretamente los lípidos no enzimáticos, durante el almacenamiento de la semilla (Sattler et al., 2004). La falta de actividad de este compuesto (mutantes de genes de síntesis *vte1* y *vte2*) deriva en una menor viabilidad de la semilla (Sattler et al., 2013). Otros dos compuestos con actividad antioxidante son el ascorbato (vitamina C) y el glutatión (tripéptido formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina), ambos compuestos forman parte del ciclo detoxificante, juntamente con otras enzimas. El glutatión es el más importante en la protección de la semilla, funcionando como tampón redox cuando se encuentra en su forma reducida (GSH) y manteniendo un equilibrio entre las reacciones de oxidación-reducción necesarias para la semilla. Los flavonoides también tienen actividad como antioxidantes, siendo capaces de detoxificar ROS y minimizar los efectos del estrés oxidativo (Treutter, 2006). Es posible encontrar flavonoides tanto en la cubierta como en el embrión de *Arabidopsis*. Su papel como antioxidantes para aumentar la viabilidad de la semilla está en entredicho, como se ha indicado anteriormente. Finalmente, otra de las barreras que pueden frenar la acción de los agentes oxidativos son las proteínas de reserva que contiene la semilla

(SSP, *Seed Storage Proteins*). En este sentido, se ha podido comprobar que proteínas como las cruciferinas tienen capacidad para amortiguar el estrés oxidativo que se pueden dar en las proteínas (Nguyen et al., 2015). La actividad amortiguadora es consecuencia de su facilidad de oxidación y por su alta presencia en la semilla, permitiendo así que la carbonilación se dé en las SSP y no en otras proteínas cuya actividad en la célula puede ser importante. Consecuentemente, no se compromete la supervivencia del embrión y se preserva la longevidad de la semilla.

#### 1.5.4. Mecanismos para la reparación y detoxificación celular

Tras la imbibición de la semilla y la reactivación del metabolismo, entran en juego mecanismos enzimáticos que intentarán reparar el daño oxidativo sufrido durante el almacenamiento, y que protegerán a la plántula emergente del estrés oxidativo que se genera como consecuencia de la reactivación del metabolismo (Sano et al., 2016), para ello se hace imprescindible la presencia de las enzimas que forman parte del ciclo de detoxificación de ROS del glutatión-ascorbato (Figura 5).

Este ciclo se inicia con las superóxido dismutasas (SOD), seguida por otras reacciones catalizadas por las catalasas (CAT) y ascorbato peroxidasas (APx), y que darán paso a la intervención de las monodehidroascorbato reductasas (MDHAR), dehidroascorbato reductasas (DHAR) y, por último, el glutatión reductasas (GR) (Figura 5) (Bailly, 2004). El coste es la oxidación de otros metabolitos, como el ascorbato, el glutatión (GSH, incluyendo glutatión peroxidasa GSHPx y glutatión reductasa GSHPx) o el NADPH, que serán regenerados una vez acabado este proceso y cuya presencia es imprescindible. Cualquier alteración, o daño, en la estructura de estas enzimas derivaría en la disminución de la longevidad de la semilla, impidiéndose la actividad metabólica al inicio de la germinación. (Bailly et al., 2008). Un ejemplo para evaluar la viabilidad y el envejecimiento de la semilla es la determinación del cociente de la presencia entre el glutatión oxidado (GSSG) y el reducido (GSH) (Kranter et al., 2006).

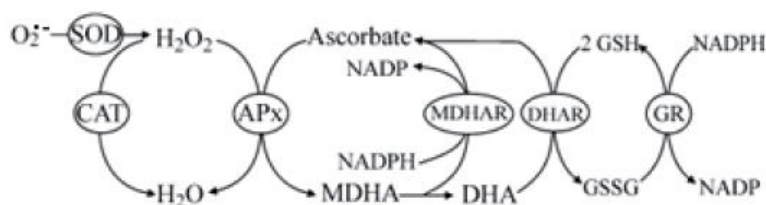


Figura 5. Esquema del ciclo glutatión-ascorbato. Los círculos indican las enzimas que catalizan el ciclo, los sustratos aparecen descritos por sus acrónimos. Esquema modificado de Teixeira et al., (2005).

Otra enzima importante para la detoxificación celular es la enzima  $\beta$ -mercaptopiruvato sulfurotransferasa (MST), capaz de transformar los compuestos cianúricos en otros con una menor toxicidad, ya que la acumulación de cianuro es capaz de afectar a la fisiología de la semilla y a su longevidad (Rajjou & Debeaujon, 2008).

Los daños celulares, o macromoleculares, se pueden dar en proteínas, DNA y RNA, favoreciendo el envejecimiento. En las proteínas se oxida, comúnmente, la metionina por el proceso natural de envejecimiento, pero este daño se puede reparar por la acción de la metionina sulfóxido reductasas (MSR) donde los residuos de sulfóxido de metionina son reducidos de nuevo a metionina (Weissbach et al., 2005). También se pueden oxidar el aspártico y la asparagina, que

son reducidos de nuevo por la acción de las L-isoaspartil O-metiltransferasas (PIMT) (**Mudgett et al., 1997**). Si, por el contrario, pierden su estructura cuaternaria y se despliegan son las chaperonas, o proteínas de choque térmico (HSP, Heat Shock Proteins) las que las repliegan y corrigen plegamientos erróneos, jugando un papel importante para las proteínas de nueva síntesis (**Job et al., 2005; Sano et al., 2016**).

Los ácidos nucleicos también pueden sufrir daños como consecuencia directa de la desecación y el almacenamiento, sobre todo por modificaciones de las bases nitrogenadas. Será la DNA glicosilasas, junto con la acción de las DNA polimerasas (poli ADP-ribosa polimerasas) y las DNA ligasas, las que corrijan estos errores descartando aquellas que han sido modificadas y supliéndolas por la base correcta (**Biedermann et al., 2011**). Este hecho es esencial para iniciar correctamente la germinación temprana (**Hunt et al., 2007**), y se demuestra por la falta de funcionalidad de las DNA ligasas 4 y 6, que evidencian una destacada susceptibilidad al envejecimiento (Waterworth et al., 2010).

### **1.6. Trabajos previos para la mejora de la longevidad en semillas**

A lo largo de los años, diferentes grupos de investigación han abordado el problema de la longevidad de las semillas mediante trabajos de transgénesis, tanto introduciendo como modificando genes que formen parte de los mecanismos implicados en este rasgo.

Como se ha mencionado con anterioridad, la testa o cubierta es la primera barrera defensiva de la semilla para hacer frente a los agentes que aceleran el envejecimiento de la semilla. Algunos estudios han demostrado que mutantes de *Arabidopsis*, que muestran alteraciones en la testa, reducen dramáticamente su tasa de germinación después de largos periodos de almacenamiento (**Debeaujon et al., 2000**). Una de las principales acciones que cumple la cubierta es la de impermeabilizar el interior de la semilla, evitando que se activen ciertos procesos y que dé comienzo la germinación, generando una capa de suberina. De hecho, la sobreexpresión del gen COGWHEEL1 (COG1), que codifica un factor de transcripción tipo DOF, resulta en un incremento de la capa de suberina, lo que se traduce en un aumento de la impermeabilidad y, por tanto, en un aumento de la longevidad de las semillas (**Chen et al., 2012; Chen et al., 2013; Bueso et al., 2016**). Algo similar sucede cuando en la semilla se sobreexpresa el gen *HB25*, manifestándose un refuerzo en la testa debido a una mayor presencia de suberina (**Bueso et al., 2014**).

Uno de los primeros trabajos en este campo demostró que la sobreexpresión de enzimas como la Cu/Zn-superóxido dismutasa (CuZnSOD) o la ascorbato peroxidasa (APX) en *Nicotiana benthamiana* generaban semillas con mayor viabilidad (**Lee et al., 2010**). De igual modo la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* de Mn-superóxido dismutasa (*MSD1*), la catalasa (*CAT1*) y una de las enzimas que sintetizan tocoferol (*HPT1*) demostró un incremento en la tolerancia al estrés oxidativo y, por tanto, favoreciendo la longevidad de las semillas (**Xi et al., 2010**).

De entre los factores que más pueden determinar la longevidad potencial de las semillas cabe destacar el deterioro de las proteínas. Tal como se ha visto hasta el momento, la presencia de la L-isoaspartil O-metiltransferasa 1 (PIMT1) es importante para evitar daños oxidativos en los residuos de las proteínas, por lo que la sobreexpresión del gen que codifica esta enzima favorece

el aumento de la longevidad de semillas y del vigor germinativo en la planta modelo *Arabidopsis* (Oge et al., 2008). Para verificar los resultados, los estudios realizados en semillas de *Arabidopsis* que presentan una sobreexpresión de los genes PIMT1 o de PIMT2 de garbanzo revelaron ser más resistentes a la senescencia (Verma et al., 2013). Del mismo modo, favorecer la presencia de las HSP sobreexpresando el gen que codifica para el factor de transcripción HaHSFA9 ha demostrado aumentar la longevidad, y la calidad, de las semillas de girasol (Prieto-Dapena et al., 2006).

En los estudios realizados acelerando el envejecimiento de forma artificial de las semillas se ha podido comprobar el daño que se produce en el DNA. En estos tratamientos ha demostrado que en las líneas de *Arabidopsis* con sobreexpresión del gen que codifica la enzima bifuncional DNA glicosilasa/AP liasa (AtOGG1) se frena de forma notoria el envejecimiento de la semilla (Chen et al., 2012).

### 1.7. Tratamientos y ensayos de la longevidad de semilla

La viabilidad, de la semilla es un parámetro característico de cada especie. Este poder germinativo irá disminuyendo conforme pase el tiempo, tal como se mencionó al inicio. Las semillas de *Arabidopsis*, por ejemplo, reducen su longevidad a la mitad en 3 años, lo que significa un largo periodo de tiempo, por lo que es necesario realizar tratamientos de envejecimiento acelerado artificial para poder estudiar este parámetro en espacios cortos de tiempo. La intención principal es proporcionar a la semilla una elevada temperatura y humedad relativa (HR), ya que son los factores más determinantes para la supervivencia de la semilla debido a su influencia en el deterioro de esta. Existe dificultad para establecer una nomenclatura a los distintos tratamientos, por ello utilizaremos preferiblemente la que se establece en The International Seed Testing Association (ISTA 2018)

Existen varios tratamientos de deterioro y envejecimiento, uno de los más utilizado y estandarizado es el del CDT (*Controlled Deterioration Treatment*), basado en reproducir las condiciones de deterioro que se producen durante el envejecimiento natural de la semilla (Rajjou et al., 2008). Para ello se mantienen las semillas en un recipiente hermético bajo condiciones constantes, y controladas, de altas temperatura (entre 37-40°C) y humedad relativa (HR) (entre 75-85%), favoreciendo un alto contenido hídrico en la semilla (*Moisture Content Fresh Weight*, MCFW) siempre por encima del 20%. En otros protocolos la semilla queda completamente sumergida en agua durante 24-48h, junto con rangos similares de temperaturas (40-42°C), pasando a nombrarse *seed deterioration* o *accelerated ageing* (AA) (Tejedor-Cano et al., 2010).

Al existir un debate abierto por no poder comparar las condiciones de estos tratamientos con las condiciones de almacenamiento de las semillas comerciales, o por no ser equiparables al potencial envejecimiento natural al no imitar la senescencia a nivel práctico (Groot et al., 2012), se ha establecido un tratamiento para el envejecimiento acelerado mediante elevada presión parcial de oxígeno (EPPO, *Elevated Partial Pressure of Oxygen*) (Groot et al., 2012). Este tratamiento pretende asemejar con mayor precisión que el CDT las condiciones de humedad y temperatura durante el proceso real de envejecimiento natural (*natural aging*, NA), como se demuestra una vez realizada una comparativa de mapeo de QTLs entre EPPO-CDT-NA (Nagel et al., 2016), y queda respaldado al someter una colección de semillas (cebada, col, lechuga y soja)

a una presión e 180 bares, logrando acelerar la senescencia de las semillas en escasas semanas (Groot et al., 2012). No obstante, en este trabajo se llevará a cabo mediante el método de CDT.

### 1.8. Variabilidad natural de la longevidad de semillas en *Arabidopsis thaliana*

Muchos estudios en genética vegetal tienen como punto de partida la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, una especie repartida a lo largo y ancho del planeta, que cuenta con una gran diversidad de adaptación y variabilidad fenotípica (Horton et al., 2012). Nuestro grupo de investigación realizó, previamente a este trabajo, un fenotipado masivo de 360 accesiones de *Arabidopsis* para determinar la viabilidad de sus semillas (Renard et al., 2020).

Este estudio mostró que existe una amplia variabilidad en las diferentes accesiones en lo que respecta a este rasgo. Un estudio de asociación realizado posteriormente indicaba que la viabilidad de la semilla es un rasgo muy poligénico, condicionado por multitud de loci genéticos con poco efecto. Otro estudio que realizó el grupo abordó una comparativa más detallada de las semillas de una colección de accesiones (ecotipos), clasificándolas de más a menos longevas (Figura 6). A partir de esta clasificación, para este trabajo se han utilizado **Da-0**, **Mt-0** y **Chat-1** como muy longevas y **Tou-A1-67**, **Par-4** y **Bor-4** como accesiones poco longevas, usando **Col-0** y **Ler** como accesiones control por la información previa de la que se disponía de ellas. La medición de diferentes parámetros, como la permeabilidad de la cubierta, el contenido en glutatión, y la naturaleza y niveles de mRNAs almacenados sugiere que la viabilidad de la semilla es un rasgo dependiente de cada accesión, sin la existencia de un componente general a todas ellas que determine su mayor o menor viabilidad (Niñoles et al., 2022). Estos datos demuestran que cada accesión podría, por tanto, ser más o menos sensible a las condiciones ambientales en las que las semillas se desarrollan. El presente Trabajo Final de Máster pretende ahondar más en profundidad cómo las condiciones ambientales en las que se desarrollan las semillas afectan a la viabilidad de las mismas, en accesiones con semillas más o menos preparadas genéticamente.

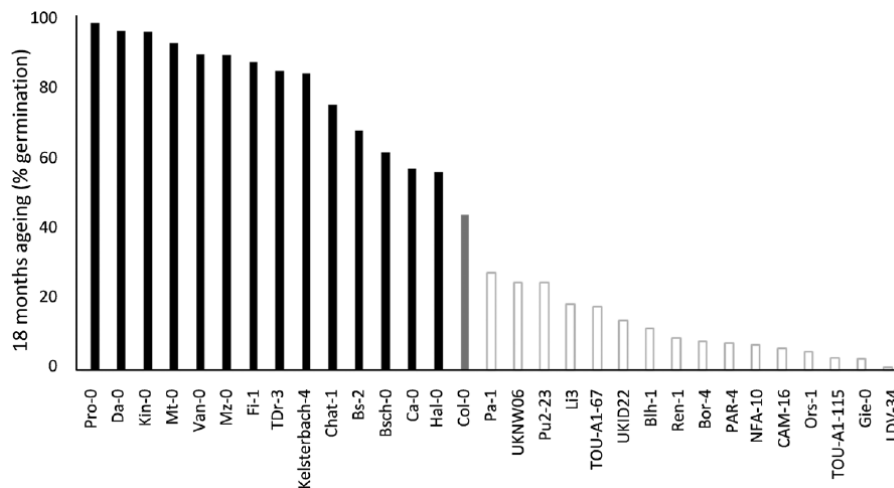


Figura 6. Gráfico de distribución de la longevidad de las diferentes accesiones. Estos datos fueron obtenidos en un estudio previo del grupo (Niñoles et al., 2022).

# **OBJETIVOS**



El presente Trabajo Final de Máster tiene como objetivo general la caracterización de componentes, tanto genéticos como ambientales, que condicionan la viabilidad de las semillas en *Arabidopsis thaliana*. El trabajo tiene dos capítulos, que corresponden al avance realizado en ambos aspectos, y por tanto tiene dos objetivos parciales:

### **2.1. Componente ambiental**

Este objetivo pretende estudiar cómo influyen las condiciones ambientales en las que se cultiva la planta madre en la longevidad de sus semillas. Para ello, se plantean los siguientes sub-objetivos:

- a) Estudio del efecto de la intensidad de luz y la temperatura sobre la longevidad de la semilla en distintas accesiones silvestres
- b) Análisis del impacto de las condiciones ambientales (luz y temperatura) en la dormición de las semillas y en la permeabilidad de las mismas.
- c) Determinación de la correlación entre longevidad y la dormición para semillas de diferentes accesiones crecidas en diferentes condiciones de luz y temperatura.

### **2.2. Componente genético**

Este objetivo pretende avanzar en la caracterización del mecanismo por el cual un mutante en el gen *TT7*, que codifica para una flavonol hidroxilasa, tiene una longevidad de semilla reducida. Para ello, se plantean los siguientes sub-objetivos:

- a) Estudio de la expresión génica en la testa de una línea de longevidad reducida (*tt3 tt7cr*) frente a una accesión silvestre (*wassilewskija*, WS) de *Arabidopsis*.
- b) Estudio de la expresión génica en el embrión de una línea de longevidad reducida (*tt3 tt7cr*) frente a una accesión silvestre (*wassilewskija*, WS) de *Arabidopsis*.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Material vegetal

Para el estudio que aquí se presenta, se utilizó como material vegetal la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. En términos de uso del material vegetal, podemos dividir el presente trabajo en dos bloques: caracterizar el efecto del ambiente en la longevidad de las semillas de *Arabidopsis*; y análisis transcripcional de testa y embrión del mutante *tt3tt7cr*.

El primer bloque, dirigido a estudiar la longevidad de las semillas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a diferentes condiciones de luz y temperatura, se empleó una colección de ocho accesiones, o ecotipos, que diferían en la longevidad de sus semillas, estudiada previamente por el grupo. Las líneas consideradas como más longevas son **Darmstadt (Da-0, Alemania)**, **Martuba (Mt-0, Libia)** y **Chateaudun (Chat-1, Francia)**; los ecotipos con menor longevidad fueron **Toulon sur Arroux (Tou-A1-67)**, **Partisanskij (Par-4, Rusia)** y **Borky (Bor-4, República Checa)**; y como control se usaron los ecotipos **Columbia (Col-0, USA)** y **Landsberg erecta (Ler, Alemania)**; (<https://1001genomes.org>) (Niños et al., 2022).

Para el segundo bloque, se utilizaron dos líneas de *Arabidopsis thaliana*. Por un lado, se utilizó **Wassilewskija (WS, Rusia)**, una de las tres principales accesiones usadas como modelo, junto con Columbia (Col) y Landsberg erecta (Ler). La segunda fue una línea *tt3tt7cr*, un doble mutante para **Transparent Testa 3** y **Transparent Testa 7** con fondo genético de **Wassilewskija (WS)**, caracterizado porque se interrumpe la síntesis de proantocianidinas y se acumulan kaempferoles.

### 3.2. Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

#### 3.2.1. Esterilización y estratificación de semillas

##### 3.2.1.1. Esterilización con gas cloro y estratificación de semillas

La esterilización se realizó inicialmente mediante el uso de gas clorhídrico al 3%. Para realizar este método, se introdujeron las semillas en microtubos Eppendorf de 0'5 ml y estos, a su vez, en un recipiente hermético junto con un vaso de precipitados, en el cual se diluyen 3 mililitros de ácido clorhídrico (HCl, 37% v/v) en 100 mililitros de lejía (NaClO, 5% v/v) para generar el gas. A continuación, se cerró el recipiente y se selló con cinta elástica de parafina (Parafilm®) para garantizar su total hermetismo y evitar que el gas pudiera filtrarse al exterior, manteniendo las semillas en contacto con el gas durante seis horas (**Figura 7**). Para llevar a cabo este proceso, se trabajó en todo momento en campana de extracción para evitar posibles intoxicaciones.

Pasado este tiempo, se añadieron 500µl de agua *Milli-Q*® estéril a cada microtubo y se guardaron, en oscuridad, a una temperatura de 4°C durante siete días. De esta forma se promueve la ruptura de la latencia de las semillas favoreciendo una germinación homogénea y sincronizada (estratificación).



**Figura 7. Método de esterilización con gas cloro.** *Izquierda:* recipiente hermético abierto con las semillas y la solución acuosa para generar el gas clorhídrico. *Derecha:* recipiente hermético cerrado y sellado con parafilm

### 3.2.1.2. Esterilización con EtOH y estratificación de semillas

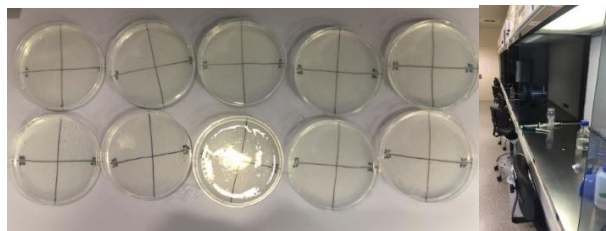
Tras evaluar la germinación obtenida después de realizar el método de esterilización con gas clorhídrico, se decidió realizar la esterilización de las semillas de *Arabidopsis thaliana* mediante inmersión en una solución de etanol 70% (v/v) y el detergente Triton X-100 al 0'1% (v/v) durante cinco minutos, en agitación, dentro de un tubo Eppendorf. Posteriormente, y haciendo uso de las cabinas de flujo laminar para minimizar las posibles contaminaciones post-esterilización, se eliminó el alcohol y se realizaron tres lavados con agua *Milli-Q*<sup>®</sup> estéril. Una vez realizado el último lavado, se mantuvieron los tubos con las semillas a cuatro grados y oscuridad durante siete días.

NOTA (1): Al realizar estas esterilizaciones no se obtuvo una germinación óptima de las semillas, por lo que se acabó optando por no esterilizar las semillas de las accesiones previamente al ensayo de CDT.

### 3.2.2. Cultivo in vitro

#### 3.2.2.1. Método de cultivo in vitro en medio sólido

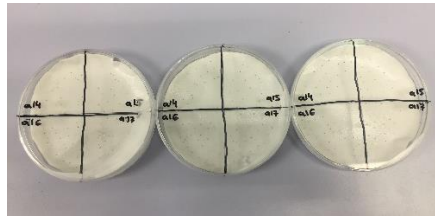
En general, para el cultivo en medio sólido se emplearon placas Petri de 9 cm de diámetro dónde, en cada una, se añadieron 25 ml medio MS (sales MS Duchefa Biochemie<sup>®</sup> al 0'4% p/v, sacarosa 1% p/v, agar bacteriológico Pronidasa<sup>®</sup> 0'9 % p/v) con un pH de 5'7 corregido con MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) Tris 10 mM (**Figura 8**). Una vez realizada la siembra, las placas se sellaron con cinta adhesiva porosa (*Micropore*<sup>®</sup>) y se mantuvieron en cámara de cultivo a veinticuatro grados (24°C) de temperatura, humedad relativa del 70% ( $\pm 5$ ) y fotoperiodo de día largo (16h/luz/día; intensidad lumínica  $100\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ).



**Figura 8. Detalle de las placas Petri con gel de agarosa.** *Izquierda:* placas Petri divididas en cuatro cuadrantes, con sus réplicas. *Derecha:* cabinas de flujo laminar.

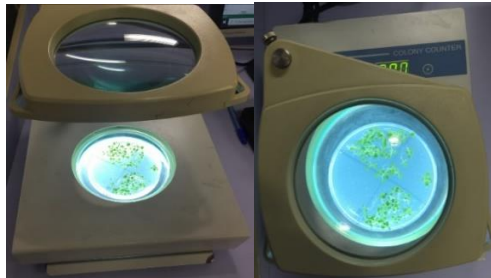
Para los ensayos de dormancia y envejecimiento acelerado, las semillas sin esterilizar se sembraron en placas Petri conteniendo papel Whatman, previamente esterilizado, y un total de 5'5ml de agua *Milli-Q*<sup>®</sup> estéril. Antes de realizar la siembra, las placas fueron divididas en cuatro cuadrantes y, en cada cuadrante, se sembraron veinticinco semillas de cada accesión, en condiciones de esterilidad, y se realizó un triplicado de la siembra de cada una de las accesiones (un total de setenta y cinco semillas por accesión). A continuación, se sellaron con cinta elástica de parafina (*Parafilm*<sup>®</sup>) y se mantuvieron durante 7 días en la cámara de cultivo a 24°C. En ambos

casos se trabajó en todo momento en cabinas de flujo laminar, para evitar posibles contaminaciones (**Figura 9**).



**Figura 9. Cultivo de semillas en papel Whatman.** Petri con las semillas de las accesiones sembradas en papel Whatman y sellada con cinta elástica de parafina.

Una vez pasados siete días tras haber realizado la siembra, se realizó un conteo de todas las placas para determinar la germinación de cada una de las réplicas de las accesiones. Para realizar el conteo nos ayudamos de una lupa, con fuente de luz en la base, para la correcta lectura de las germinaciones (**Figura 10**).



**Figura 10. Placas Petri con semillas germinadas.** Lupa con fuente de luz para el conteo de las placas Petri con la germinación de las distintas accesiones.

### **3.2.3. Cultivo en invernadero**

Las diferentes accesiones de *Arabidopsis thaliana*, descritas en el apartado **3.1.3.1**. Material vegetal, se cultivaron de forma simultánea en invernadero para obtener las semillas que se analizan en el presente trabajo.

Tras pasar 7 días en cámara de cultivo, las plántulas se transfirieron a tierra. El cultivo en invernadero se llevó a cabo en macetas circulares de 12cm de diámetro, transfiriendo un total de 5 plántulas por maceta, y se usó como sustrato una mezcla de turba, vermiculita exfoliada y perlita.

#### **3.2.3.1. Solución nutritiva**

Una vez instaladas en el invernadero, las plantas se irrigaron periódicamente a lo largo del ciclo de cultivo. El riego se basó en una solución nutritiva compuesta de nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ , 4 mM), nitrato de calcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 4 mM), Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ , 1'5 mM), fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0'75 mM), EDTA de sulfato de hierro ( $\text{EDTA FeSO}_4$ , 0'035% p/v), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 70  $\mu\text{M}$ ), cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ , 14  $\mu\text{M}$ ), cloruro sódico ( $\text{NaCl}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$ ), sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ , 0'5  $\mu\text{M}$ ), molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0'2  $\mu\text{M}$ ) y cloruro de cobalto II ( $\text{CoCl}_2$ , 0'01 Mm), con un pH final de 6'5.

### **3.2.3.2. Condiciones de cultivo**

Para la obtención de las semillas que fueron objeto del estudio, se establecieron cuatro condiciones de cultivo distintas y en cada una de ellas se cultivaron dos réplicas de cada accesión (dos macetas con cinco plantas cada una).

El primer lote de cada accesión se obtuvo tras cultivar las plantas a una temperatura de 22°C y una baja intensidad lumínica (una media de 90  $\mu\text{moles fotones}/\text{sm}^2$ ), lo que a partir de ahora llamaremos **22°LL**.

El segundo lote se obtuvo a partir de plantas cultivadas con una temperatura constante de 22°C, pero con una intensidad lumínica más alta (hasta 360  $\mu\text{moles fotones}/\text{sm}^2$ ), definiendo este lote como **22°HL**.

Para el tercer lote, se aumentó la temperatura de cultivo de las plantas hasta los 27°C, y se mantuvo la baja intensidad lumínica (una media de 90  $\mu\text{moles fotones}/\text{sm}^2$ ), estableciendo el lote como **27°LL**.

Finalmente, en el último lote se aumentó tanto la temperatura como la intensidad de la luz de las condiciones de cultivo de las plantas, llegando a los 27°C de temperatura y hasta 360  $\mu\text{moles fotones}/\text{sm}^2$ , denominándose el lote **27°HL**.

### **3.2.3.3. Recolección y almacenamiento de semillas**

Una vez completado su ciclo vital, las plantas se dejaron secar en la cámara de cultivo durante una semana. Cuando la planta estuvo totalmente seca, se separaron las semillas de las silicuas para ser almacenadas en tubos Eppendorf de 1'5 ml, clasificadas por accesión y tratamiento. Los tubos se conservaron en cajas de cartón, con gradilla, a 4°C y oscuridad para minimizar su deterioro.

### **3.2.4. Separación testa y embrión de semillas en desarrollo de *Arabidopsis thaliana***

Para el análisis transcriptómico del mutante *tt3tt7cr* se realizó una extracción de RNA de semillas en desarrollo, separando la testa del embrión.

En primer lugar, se marcaron los primordios foliares de las plantas de ambos genotipos para identificar, posteriormente, las silicuas que se encontrasen entre el día 10 y 14 de su crecimiento.

A partir de estas silicuas, y con la ayuda de una lupa, se extrajeron las semillas y, a continuación, se separó la testa del embrión de un total de setenta y cinco silicuas por genotipo. Durante la separación, las semillas se mantuvieron en frío e inmersas en el tampón de extracción para evitar la acción de las RNAsas. Una vez separadas, se introdujeron en tubos Eppendorf, los cuales fueron conservados en nitrógeno líquido y en cámara frigorífica a -80°C hasta la extracción y análisis del RNA (Este protocolo se detalla en el **Anexo I**).

### 3.3. Caracterización de semillas.

#### 3.3.1. Ensayo de envejecimiento acelerado (*Controlled Deterioration Treatment, CDT*)

Para evaluar la longevidad de las semillas se determinaron los días necesarios para que las semillas de cada accesión tuvieran una germinación igual al cincuenta por ciento (**P50**).

Lo primero que se hizo fue preparar un lote de semillas de cada una de las accesiones del stock de cada accesión, tomando alícuotas de semillas por separado, en microtubos Eppendorf de 0'5ml. Las semillas se mantuvieron en un recipiente hermético junto con una solución salina saturada de cloruro sódico (NaCl 40-50g/100ml) preparada en vaso de precipitados (**Figura 11**), que genera una humedad relativa en el interior del recipiente del 75%, y el recipiente hermético se mantuvo a una temperatura de 37°C.



Figura 4. Método de envejecimiento controlado (CDT). Recipiente hermético en cámara de cultivo, conteniendo las alícuotas de las semillas y la solución salina saturada.

A partir del mismo lote de semillas que se utilizó para preparar las alícuotas, se realizó la primera siembra para realizar una evaluación inicial y así tener un control de la germinación inmediatamente tras la cosecha (día 0), antes de conservar las semillas a 37°C. El resto de las semillas fueron conservadas en cámara a 37°C y, de este lote de semillas, se realizaron siembras periódicas para llevar a cabo cinco evaluaciones distintas: la primera evaluación se realizó después de dos semanas y media de incubación (día 18); la segunda evaluación a las tres semanas y media de incubación (día 25); la tercera evaluación a las cuatro semanas y media (día 32) y la evaluación final a las cinco semanas y media (día 39).

Para realizar estas evaluaciones se tomó para sembrar, de cada microtubo de la cámara a 37°C, una cantidad aproximada de 100-150 semillas, en cada momento concreto, pasándolas a un microtubo nuevo. Las semillas se sembraron directamente, y sin una esterilización previa, en placas Petri con papel Whatman, tal y como se describe en el apartado **3.2.2.1**.

Tras la siembra, se mantuvieron las placas en cámaras de cultivo a 22°C durante siete días, según lo descrito en el apartado **3.2.2.1**. y, a continuación, se realizó el conteo de las plántulas germinadas (con cotiledones abiertos y verdes) para cada accesión y condición. A partir de esos datos se calcularon sus medias, desviaciones y errores. Con las medias, para cada tiempo de tratamiento y accesión, se determinó el valor **P50**.

#### 3.3.2. Análisis de dormancia en semillas.

Con la intención de determinar los días que son necesarios para que el cincuenta por ciento de las semillas de cada accesión germinen (**DSDS50**), se conservó un lote de semillas de cada una de estas accesiones en una cámara de cultivo a una temperatura de 22°C y una humedad relativa entre el 50 y el 55%. Al inicio del ensayo, se realizó una siembra como control y, posteriormente,

se fueron cogiendo alícuotas de las semillas a los 4, 7, 14, 21, 28 y 42 días y se sembraron en placas Petri con Papel Whatman, tal como se comentó anteriormente.

Después de mantener las placas en cámara de cultivo durante siete días, se realizó un conteo del total de semillas germinadas para cada una de las réplicas biológicas para cada accesión. Una vez realizado el conteo para todos los tiempos ensayados, se calculó la media de germinación de cada día y su desviación típica, junto con el error. Con todos estos datos se plantea calcular el **DSDS50** de cada accesión.

### **3.3.3. Ensayo de permeabilidad de sales de tetrazolio**

En función de la permeabilidad que presente la cubierta de la semilla (testa), la solución de tetrazolio (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) será capaz de difundirse, en mayor o menor medida, a través de la cubierta hacia el interior de la semilla. Una vez en el embrión, la enzima deshidrogenasa (NADH) podrá reducir el tetrazolio en los tejidos vivos (**Canuto, 2012**), generando la tinción de las células debido a la formación de un compuesto insoluble, llamado Formazan, que dotará a las semillas de un color rojizo que se podrá detectar a simple vista.

La solución de tetrazolio se prepara al 1% (P/V) y mezclando con un agitador magnético. Una vez obtenida la solución, se cogieron alícuotas de semillas de las distintas accesiones, cultivadas en condiciones ambientales distintas, y se introdujeron en tubos Eppendorf de 1'5 ml y se añadió 100µl de una solución de Tetrazolio al 1%.

Ya añadida la solución en cada uno de los tubos con semillas, se cubrió la gradilla con papel de aluminio y se mantuvieron tres días en cámara a 28°C y oscuridad. Pasado este tiempo se les realizó dos lavados con agua *Milli-Q*® estéril y quedaron listas para su observación.

Este tipo de análisis requiere la ayuda de un macroscopio Leica DMS1000, el cual nos permitirá realizar una observación clara y precisa de las muestras. Los parámetros del macroscopio fueron los siguientes:

- Main objective: 0.5x
- Microscope Zoom Magnificant: 1.41
- Exposure: 30 ms
- Gain: 1.5x
- Gamma: 0.7
- Saturation: 130

## **3.4. Purificación y manipulación de ácidos nucleicos**

### **3.4.1. Extracción de RNA en testa y embrión de semillas de *A. thaliana***

A partir de las testas y los embriones obtenidos de las silicuas recogidas, aproximadamente, a los 12-14 DAP, se realizó la extracción de RNA. Este proceso se realizó siguiendo un método específico para semillas publicado por **Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa (2008)** con algunas modificaciones, tal como se describe a continuación.

Tanto para la testa como para el embrión, se tomaron muestras de las semillas de un total de 75 silicuas. Cada uno de estos tejidos se trituraron por separado añadiéndoles previamente, en los tubos que los contenían, alrededor de 200µl de tampón de extracción (LiCl 0'4 M, Tris 0'2 M



pH 8, EDTA 25 mM y SDS 1%). Después de ser triturados con la ayuda de un homogeneizador mecánico, en frío para no degradar las muestras, se les añadieron a los tubos 300µl más de tampón y 550µl de cloroformo y se mezclaron con el vórtex. Posteriormente se centrifugaron los tubos en frío a 15000 rpm durante 5 minutos para, así, poder recoger el sobrenadante y pasarlo a un tubo Eppendorf de 1'5 ml nuevo. Al sobrenadante se le añadió 700 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (PCI), se homogeneizó y se centrifugó a 14000rpm durante 4 minutos. Tras este proceso se transfirió el nuevo sobrenadante a un tubo limpio y se le añadió cloruro de litio (LiCl 8M) a razón de, aproximadamente, 1/3 de su volumen y se dejó precipitando 24h a 4°C. Transcurrido el tiempo de precipitación, se centrifugó la muestra a 4°C durante 30 minutos para obtener un *pellet* el cual a continuación, y después de haber eliminado el sobrenadante, se disolvió en 500µL de agua *Milli-Q*® estéril. A continuación, se añadieron 7µL de acetato sódico 3 M (pH 5'2) y 250µL de etanol absoluto y se centrifugó durante 10 minutos a 16500rpm para precipitar los carbohidratos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, donde se añadieron 43µL de acetato sódico 3 M y 750µL de etanol absoluto y se mantuvo durante 2 h a 4°C. La mezcla se volvió a centrifugar en frío durante 20 minutos para obtener un nuevo pellet, que fue lavado dos veces con etanol al 70%, resuspendido en 20µL de agua *Milli-Q*® estéril y conservado a -80°C.

El paso final fue la limpieza del RNA eliminando el DNA residual. Este proceso se realizó siguiendo el protocolo establecido en el kit de extracción facilitado por la compañía E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek®), para el que se utilizó DNAsa libre de RNAsa (Omega Bio-Tek®).

### 3.4.2. RNAseq y análisis bioinformático de datos

De los RNAs extraídos de testa y embrión se tomaron 1'2µg que se mandaron a secuenciar a la empresa externa NOVOGEN.

Tras llevar a cabo la secuenciación, los datos obtenidos del RNAseq fueron analizados por el servicio de bioinformática del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), de acuerdo con el siguiente esquema:

- Análisis de las lecturas usando 'FastQC'  
(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)
- Eliminación de zonas de baja calidad y adaptadores con 'cutadapt'  
(<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/>)
- Mapeo de lecturas mediante 'HISAT2' contra el genoma de *Arabidopsis* TAIR10 obtenido de Araport11  
(<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)  
([https://www.araport.org/downloads/TAIR10\\_genome\\_release/assembly](https://www.araport.org/downloads/TAIR10_genome_release/assembly)).
- Correspondencia de lecturas con cada uno de los genes de *Arabidopsis* mediante 'htseq-count' y la ayuda de la última anotación de Araport11.  
([https://htseq.readthedocs.io/en/release\\_0.11.1/count.html](https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/count.html))  
([https://www.araport.org/downloads/Araport11\\_latest/annotation](https://www.araport.org/downloads/Araport11_latest/annotation))
- Análisis de expresión diferencial con el software *R* utilizando el paquete de Bioconductor DESeq2.  
(<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>)

Realizado el análisis de expresión diferencial, se separaron los genes en dos categorías: más y menos expresados. Para ello seleccionamos aquellos que tuvieron un *LogFoldChange* superior (en el caso de los genes más expresados) o inferior (en el caso de los menos expresados) a cero. En ambos casos, se estableció que su p-valor ajustado (padj) debía ser menor a 0'05.

Los datos generados a partir del RNAseq se analizaron mediante el software **Panther**<sup>®</sup> (<http://go.pantherdb.org/webservices/go/overrep.jsp>), para determinar las categorías funcionales de los genes diferencialmente expresados y buscar semejanzas en la base de datos con los resultados obtenidos del RNAseq. También se hizo uso de un segundo software, en este caso el **TF2Network** (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/TF2Network/>), para identificar posibles factores de transcripción que regulan los genes diferencialmente expresados.

# **RESULTADOS**

## 4.1. Influencia de las condiciones ambientales de la planta madre en la calidad de sus semillas

Las plantas se ven sometidas continuamente a los efectos del ambiente, soportando tanto las variaciones del clima como la acción de los agentes bióticos. En cuanto a las condiciones ambientales durante su crecimiento y desarrollo, los cambios fisiológicos producidos en las plantas pueden definir las características de sus semillas.

En este sentido, la adaptación climática afecta a la capacidad de las semillas para romper su latencia, o de conservar su potencial germinativo, a lo largo del tiempo. Por lo tanto, estas características no van a depender únicamente de la genética de la planta madre, sino también de las condiciones climáticas en las que se han desarrollado. Para abordar este tema en el presente trabajo se crecieron, en condiciones variables de temperatura e iluminación, las distintas accesiones de *Arabidopsis thaliana*, seleccionadas por su alta y baja longevidad (**Da-0**, **Mt-0** y **Chat-1** en el primer caso y **Tou-A1-67**, **Par-4** y **Bor-4** para el segundo) y usando **Col-0** y **Ler** como control, ya que tenemos datos de estudios previos sobre ellas, para estudiar cómo se ven afectadas sus semillas.

### 4.1.1. Ensayo de longevidad de semillas

#### 4.1.1.1. Germinación en ausencia de envejecimiento acelerado

Previamente a realizar el ensayo de envejecimiento acelerado, o CDT, se llevó a cabo un ensayo control para comprobar la germinación de las semillas en ausencia de envejecimiento, sembrándolas inmediatamente después de ser recogidas (día 0).

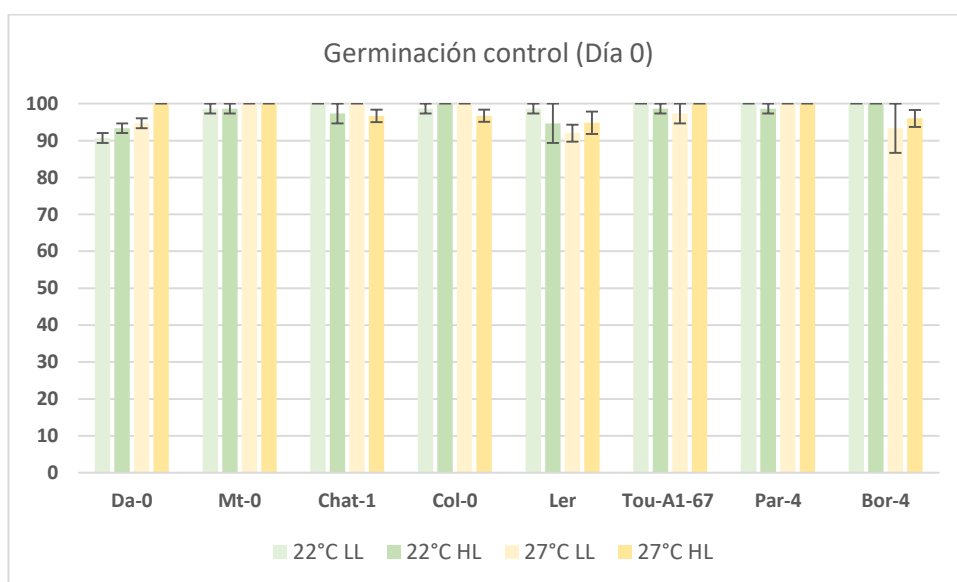


Figura 12. Datos de germinación de las diferentes accesiones cultivadas bajo las cuatro condiciones de luz y temperatura. Se muestra la germinación media y error estándar de las tres réplicas biológicas realizadas.

Como se muestra en la **Figura 12**, la germinación de las distintas accesiones fue, mínimo, del 90% en todo caso, por lo que el ensayo de longevidad de semillas se llevó a cabo en estas condiciones, sin esterilización previa.

#### 4.1.1.2. Germinación tras envejecimiento acelerado

En este ensayo, las semillas de **Col-0**, **Ler** y accesiones con longevidad de semillas alta o baja se mantuvieron a 37°C y 75% RH durante 18, 25, 32 y 39 días y, tal y como se describe en materiales y métodos, se contó su germinación 7 días tras la siembra (**Figura 13**).

En primer lugar, cabe mencionar que la clasificación de las accesiones se realizó en condiciones normales de luz (150  $\mu\text{M}/\text{m}^2\text{s}$ ) y temperatura (22°C) (**Niñoles et al., 2022**). En la figura 13, vemos claramente como el cambio en las condiciones de crecimiento de las plantas, altera los resultados de longevidad de las semillas. En algunos casos se mantiene de forma clara la alta o baja longevidad (como **Chat-1** y **Tou-A1-67**), pero la longevidad de las semillas de otras accesiones como **Bor-4**, **Ler** o **Da-0** puede llegar a variar mucho en función de las condiciones de crecimiento.

Al analizar el efecto de la luz y la temperatura, puede observarse, como tendencia general, que cuando las plantas están expuestas a una alta temperatura y radiación, sus semillas muestran un incremento en la longevidad. Pese a ello, las accesiones incluidas en cada grupo muestran un comportamiento distinto para las distintas condiciones de cultivo.

En las accesiones **Col-0** y **Ler**, se puede observar cómo existe un aumento en la longevidad de las semillas, al aumentar la temperatura, especialmente en condiciones de baja intensidad lumínica. En el caso de **Col-0** los valores de P50 aumentan de 19 a 26 días, mientras que **Ler** ve incrementada su P50 de 10 a 17 días. Del mismo modo, un incremento en la intensidad lumínica también provoca una mejora en la viabilidad de las semillas (especialmente a 22°C), aumentando de 19 a 29 días en el caso de **Col-0**, y de 10 a 24 días en el caso de **Ler** (**Tabla 1**). Es importante destacar que las semillas de la accesión **Ler** se ven más afectadas por las condiciones ambientales (**Figura 13d y e**).

En el grupo de las accesiones clasificadas previamente como más longevas (**Da-0**, **Mt-0** y **Chat-1**) observamos tres comportamientos ligeramente diferentes:

En el primer caso, en la accesión **Da-0**, se aprecia que un incremento de temperatura no varía significativamente su longevidad (ni en LL ni en HL), sin embargo, un aumento en la intensidad lumínica incrementa la longevidad de sus semillas de forma significativa tanto a 22 como a 27°C. A 22°C pasa de un P50 de 21 días a un P50 de 35 días, y a 27 °C el P50 pasa de 24 días a 32 días (**Tabla 1, Figura 13a**).

En la segunda accesión clasificada como longeva, **Mt-0**, un aumento en la intensidad lumínica no mejora significativamente la longevidad de sus semillas cuando las plantas se cultivan a distintas temperaturas. Sin embargo, cuando las plantas han crecido en baja intensidad lumínica, la longevidad de sus semillas aumenta el valor de su P50 de 20 a 33 días al pasar de 22 a 27°C (**Figura 13b**).

Para el caso de la tercera accesión más longeva, **Chat-1**, su comportamiento es similar a **Mt-0**, sólo un aumento de temperatura en plantas crecidas con baja intensidad lumínica consigue incrementar significativamente la longevidad de sus semillas. La diferencia entre las dos accesiones es que esta variación en su longevidad es mucho menor en el caso de **Chat-1**, incrementándose el valor de su P50 únicamente de 24 a 30 días (**Tabla 1, Figura 13c**). Por lo

tanto, podemos decir que, en este caso, el ambiente no causa un efecto drástico, manteniendo una alta longevidad bajo cualquier condición.

Por último, se estudiaron tres accesiones caracterizadas por ser poco longevas (**Tou-A1-67**, **Par-4** y **Bor-4**). La primera de estas accesiones es **Tou-A1-67** que, de forma general, mantiene su condición de baja longevidad sin que esta se vea drásticamente afectada por ninguna de las condiciones ambientales. Aun así, se observa que en condiciones de alta temperatura (27°C), un aumento de intensidad lumínica (LL→HL) aumenta significativamente la longevidad de sus semillas (**Figura 13f**).

En el caso de la accesión **Par-4**, las condiciones ambientales parecen no afectar a la viabilidad de las semillas, a excepción de la tendencia que muestra cuando se ve sometida simultáneamente a una alta temperatura e intensidad lumínica (27°C, HL). Esta condición ambiental dota a **Par-4** de una longevidad exacerbada, aumentando significativamente su P50 en comparación con cualquiera de las otras tres condiciones ambientales, ya que alcanza un valor de P50 próximo a 30 días cuando en el resto de las condiciones no excede los 12 días (**Tabla 1, Figura 13g**).

La accesión menos longeva es **Bor-4**, dónde se observa que un aumento en la temperatura bajo unas condiciones constantes de intensidad lumínica (tanto en baja como alta intensidad) incrementa su longevidad. También se observa un marcado incremento en la longevidad si se comparan las condiciones de baja y alta intensidad lumínica, a cualquiera de las dos temperaturas estudiadas. Esta accesión se caracteriza por su plasticidad para mejorar su longevidad, tanto si se incrementa la temperatura como si lo hace la intensidad de la luz (**Figura 13h**). Esta característica, en este estudio, la hace asemejarse a la accesión **Ler**.

	P50			
	22°C		27°C	
	LL	HL	LL	HL
Da-0	20,83	35,12	23,92	31,50
Mt-0	19,76	28,46	32,96	29,53
Chat-1	24,23	28,88	30,36	26,98
Col-0	18,91	29,40	26,28	31,44
Ler	10,26	24,77	17,07	28,61
Tou-A1-67	10,49	9,95	8,36	13,31
Par-4	11,23	12,92	10,44	28,62
Bor-4	8,14	23,33	14,11	33,88

**Tabla 1. Valores de P50 para cada una de las accesiones de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en el trabajo.** Los valores quedan diferenciados por temperaturas (color verde) y por la baja (azul) y alta (naranja) intensidad lumínica.

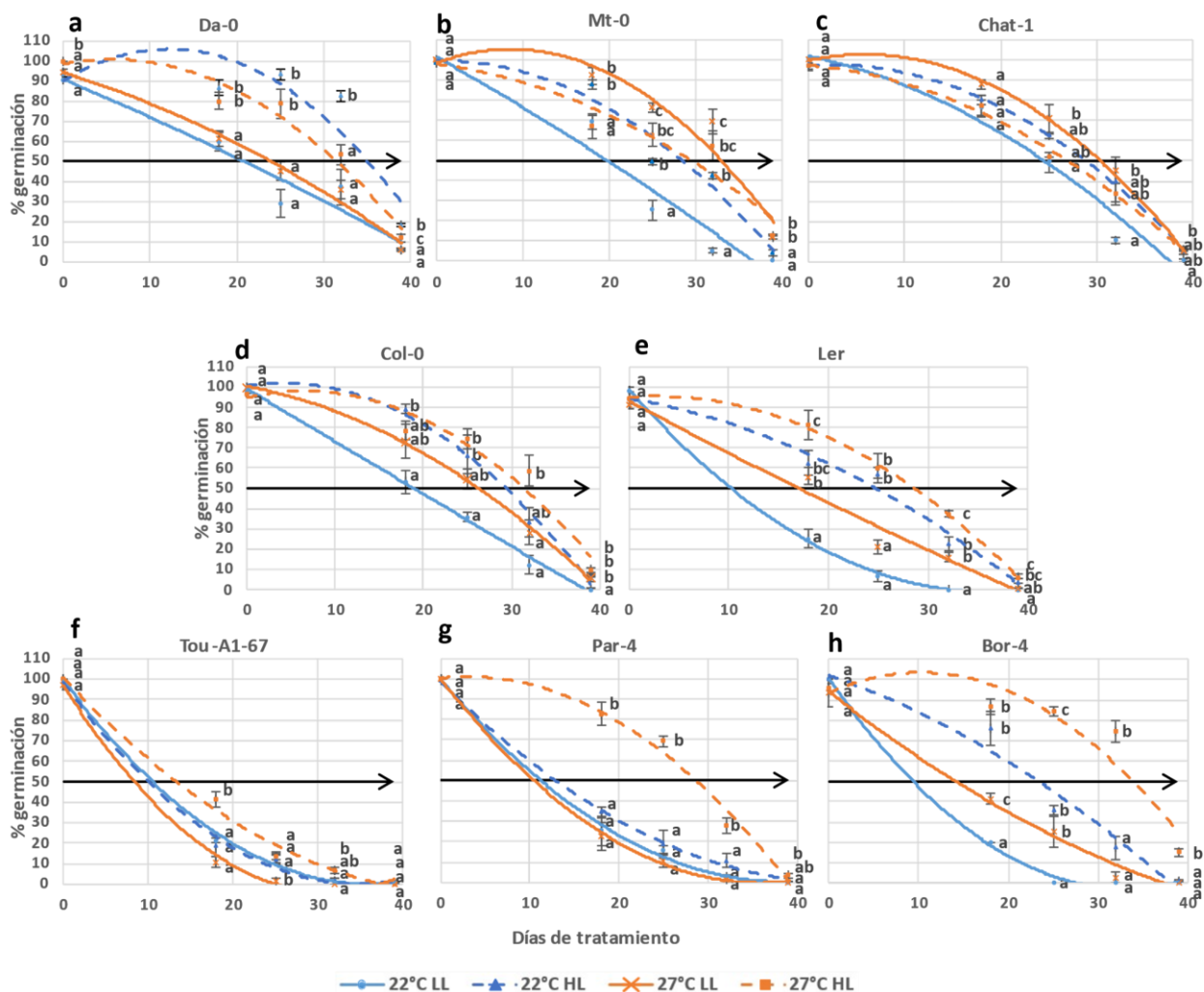


Figura 13. Gráficas mostrando la germinación de las accesiones crecidas en diferentes condiciones ambientales (luz y temperatura) después del proceso de envejecimiento acelerado (CDT). Las accesiones Da-0, Mt-0 y Chat-1 corresponden al grupo clasificado inicialmente como más longevo; Col-0 y Ler poseen una longevidad intermedia; y Tou-A1-67, Par-4 y Bor corresponden al grupo clasificado como menos longevo. Las letras encima de los marcadores explican las diferencias estadísticas entre los valores obtenidos a las distintas temperaturas, y diferentes intensidades lumínicas, para un mismo día de evaluación, calculados mediante una prueba Anova unifactorial seguido de un análisis de Tukey.

#### 4.1.2. Ensayo de dormancia de semillas

En este ensayo se pretendía dilucidar cuál era el efecto que ejercía tanto la temperatura como la luz en la que crece la planta madre en la dormancia de sus semillas. Para ello, como se mencionó en el apartado 3.3.2. Análisis de dormancia en semillas., se realizaron siembras durante 5 semanas seguidas para evaluar el comportamiento por accesión y tratamiento. En general, se comprobó que la mayoría de las accesiones alteraban su dormancia con los estímulos ambientales, a excepción de las accesiones **Mt-0** y **Col-0** que mantenían una dormancia similar tras las diferentes condiciones de cultivo.

El primer paso fue estudiar la germinación de las accesiones al inicio del ensayo, esto es, inmediatamente tras la cosecha (día 0). Uno de los primeros resultados interesantes que se comprobó fue que, cuando las plantas se cultivaron a 22°C, cinco de las ocho accesiones estudiadas tuvieron una germinación inferior al 50%, siendo, en este caso, **Mt-0**, **Col-0** y **Ler** las

accesiones cuya germinación fue superior al resto. Pero, por el contrario, de las semillas obtenidas a partir de las plantas cultivadas a 27°C comprobamos que todas, menos **Tou-A1-67** y **Par-4**, tuvieron una germinación por encima del 50%. En resumen, nuestros resultados confirman que un aumento en la temperatura durante el desarrollo de las semillas se traduce en una disminución en la dormancia de las mismas.

#### 4.1.2.1. Análisis de la dormancia de las accesiones con germinación inferior al 50% inmediatamente tras la recolección

Un modo estandarizado de medir la dormancia es el cálculo del **DSDS50**, es decir, los días de almacenamiento necesarios para alcanzar el 50% de la germinación (*days of seed dry storage required to reach 50% germination*). La dificultad que se afrontó para determinar este parámetro fue que las semillas recién recogidas (día 0) de todas las plantas cultivadas a 27°C, así como tres accesiones cultivadas a 22°C tuvieron una germinación superior al 50%.

Por lo tanto, sólo fue posible determinar el **DSDS50** de las accesiones cuya germinación fue inferior al 50% al inicio del cultivo, es decir, **Da-0**, **Chat-1**, **Tou-A1-67**, **Par-4** y **Bor** cultivadas en condiciones de baja temperatura (22°C) (Tabla 2).

De estas accesiones, las semillas de **Da-0**, **Tou-A1-67** y **Par-4** no presentan cambios importantes en su dormancia cuando han sido crecidas a 22 (Tabla 2, Anexo IIa, c, d).

Sin embargo, en las accesiones **Bor-4** y **Chat-1**, un incremento en la intensidad lumínica aumenta claramente su DSDS50 (mayor dormancia), mientras que una exposición a una intensidad de luz baja rompería antes la dormancia (Tabla 2, Anexo IIb, e).

	DSD50	
	22°C LL	22°C HL
Da-0	24,06	22,72
Chat-1	7,86	15,56
Tou-A1-67	29,10	27,47
Par-4	22,91	21,37
Bor-4	5,06	10,46

Tabla 2. Datos de DSDS50 de las accesiones con germinación inferior al 50% tras cosecha. Los valores mostrados para cada una de las accesiones corresponden al número de días necesarios para que germinen el 50% de las semillas.

#### 4.1.2.2. Análisis comparativo de la dormancia de todas las accesiones

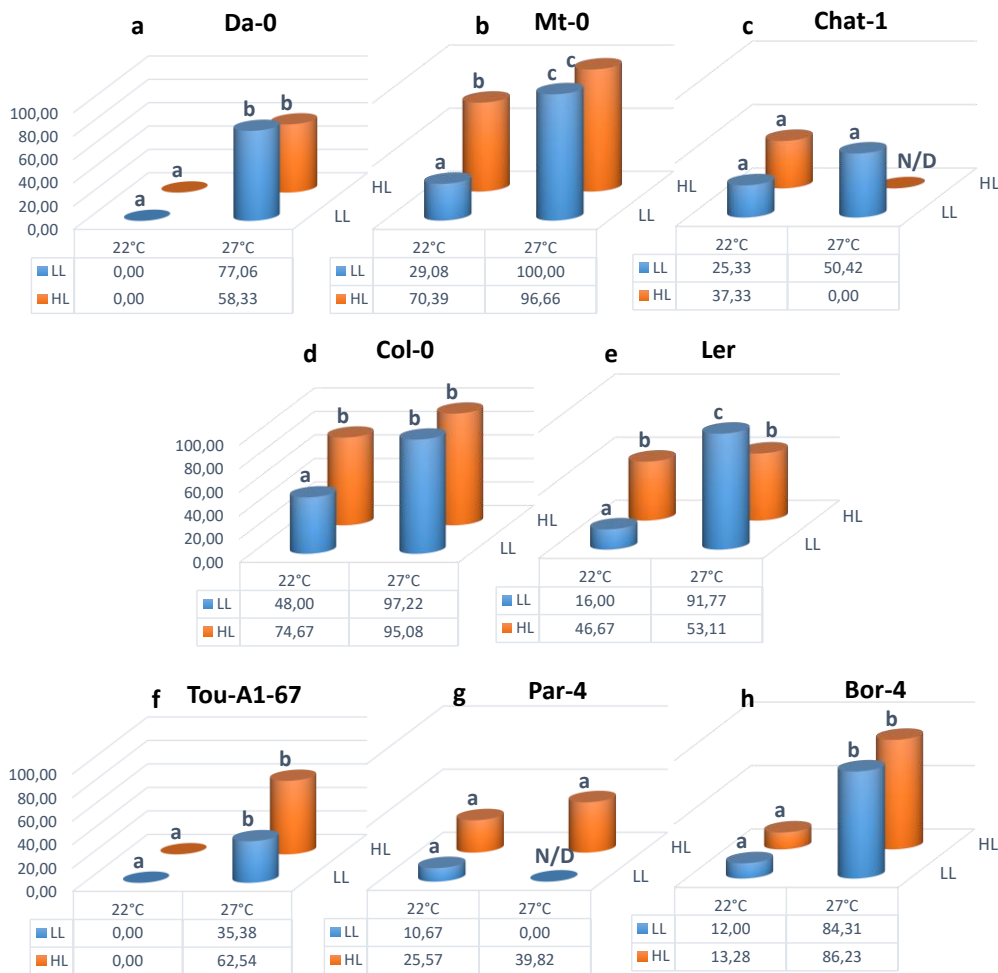
Como con las semillas de las accesiones de las plantas cultivadas a 27°C no pudimos obtener datos para realizar el cálculo del parámetro **DSDS50**, establecimos un criterio de análisis basado en la comparación de la media de germinación de cada una de las accesiones en cada condición inmediatamente tras la recolección de las semillas (día 0) (Figura 14).

Como se observa en la Figura 14, en la mayoría de las accesiones (**Da-0**, **Mt-0**, **Tou-A1-67** y **Bor-4**), un incremento de la temperatura reduce la dormancia de las semillas (mayor germinación a día 0), si bien en accesiones como **Col-0** y **Ler**, este efecto se observa únicamente en condiciones de baja intensidad lumínica y en otras como **Chat-1** o **Par-4**, la temperatura no influye de forma significativa en la dormancia de sus semillas.



El efecto de la intensidad lumínica sobre la dormancia es muy dependiente de la accesión. Observamos que una intensidad lumínica mayor reduce la dormancia de las semillas crecidas a 22°C en accesiones como **Mt-0**, **Col-0** y **Ler** ya que su germinación a día 0 es mayor en esas condiciones (**Figura 14b, d y e**). En el caso de **Chat-1** y **Par-4**, las diferencias no resultan significativas (**Figura 14c y g**). En otros casos, como **Da-0** y **Bor-4**, la luz parece no ejercer ningún efecto sobre la dormancia de las semillas, probablemente porque su germinación a día cero es demasiado baja (**Figura 14a y h**). De hecho, en base a los datos de **DSDS50** mostrados en el apartado anterior, sabemos que la dormancia de las semillas de **Da-0** apenas se ve afectada por la intensidad lumínica, pero las semillas de **Bor-4** aumentan su dormancia al aumentar la intensidad lumínica.

En este sentido, es interesante destacar el caso de la accesión **Ler** cuyas semillas mostraron un comportamiento contrario cuando las plantas se cultivaron a 22°C (a mayor intensidad lumínica, mayor pérdida de dormancia) que cuando fueron cultivadas a 27°C (menor dormancia con menor intensidad lumínica) (**Figura 14e**).



**Figura 14.** Gráficas comparativas de la germinación de todas las accesiones a día 0. La comparativa se realiza entre ambas temperaturas (22 y 27°) y entre las diferentes intensidades de luz (HL y LL). Las columnas con valor 0 y una letra minúscula, están referidas a accesiones no germinadas. Las columnas con un valor "N/D" encima de ellas, están referidas a accesiones que no fueron sembradas por no disponer de semillas y, por lo tanto, no hay valor. Los valores relacionados a la baja intensidad lumínica (LL) se muestran en las columnas de color azul; mientras que los datos de alta intensidad lumínica (HL) quedan definidos por las columnas de color naranja. Para comparar las medias obtenidas en diferentes condiciones, se realizó un anova unifactorial seguido de un análisis Tukey. Las letras minúsculas sobre las columnas representan diferencias significativas para pvalue <0,05.

### 4.1.3. Análisis de la correlación entre la longevidad y la dormancia de las semillas de accesiones crecidas en diferentes condiciones de luz y temperatura

Una de las primeras hipótesis que se establecieron fue que existía una correlación positiva entre la longevidad de las semillas y su dormancia. La idea surgió de los estudios realizados sobre los mutantes *lec1*, *abi3* (Ooms et al., 1993; Clerkx et al., 2004a; Sugliani et al., 2009), *tt*, y *ats* (Debeaujon et al., 2000), por un lado, y con el mutante de pérdida de función del gen *DOG1* (Bentsink et al., 2006) y el mutante *green seed* (enhancer of *abi3*-1; Clerkx et al., 2003) por otro. Esta correlación positiva fue cuestionada tiempo después por Nguyen et al., 2012 que, mediante el uso de poblaciones RILs obtenidas del cruce de *Ler* con una colección de accesiones, determinaron que la correlación entre longevidad y dormancia era negativa. Este trabajo, que se llevó a cabo con accesiones naturales, en condiciones normales de crecimiento, defendía que la correlación positiva se podía deber a un defecto en la maduración de la semilla que se daba en los mutantes que disminuía su dormancia.

En este trabajo queremos ampliar estos estudios y determinar, si en las diferentes condiciones de desarrollo de las semillas y en las diversas accesiones estudiadas, es posible observar dicha correlación (positiva o negativa).

#### 4.1.3.1. Correlación para todas las accesiones y bajo todas las condiciones de cultivo

En primer lugar, se determinó la correlación entre todos los datos obtenidos de dormancia y longevidad, en todas las accesiones y condiciones de crecimiento. La gráfica obtenida (Figura 15) muestra la siguiente tendencia: cuanto mayor es el valor de P50 (más longevidad de semillas), la germinación a día cero es también mayor (menor dormancia). A pesar de no llegar a obtenerse una correlación clara ( $R^2=0,332$ ), parece observarse, por tanto, una leve correlación negativa entre dormancia y longevidad.

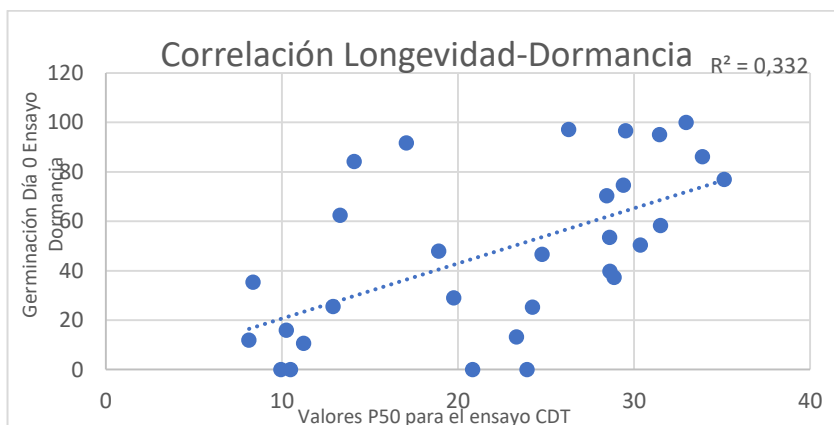


Figura 15. Gráfica de correlación entre la longevidad y la dormancia de las accesiones. En esta gráfica se analiza la posible relación entre los valores de P50 obtenidos en el estudio de la longevidad y la germinación existente a día 0 en el ensayo de dormancia.

#### 4.1.3.2. Correlación para todas las accesiones en cada una de las condiciones estudiadas

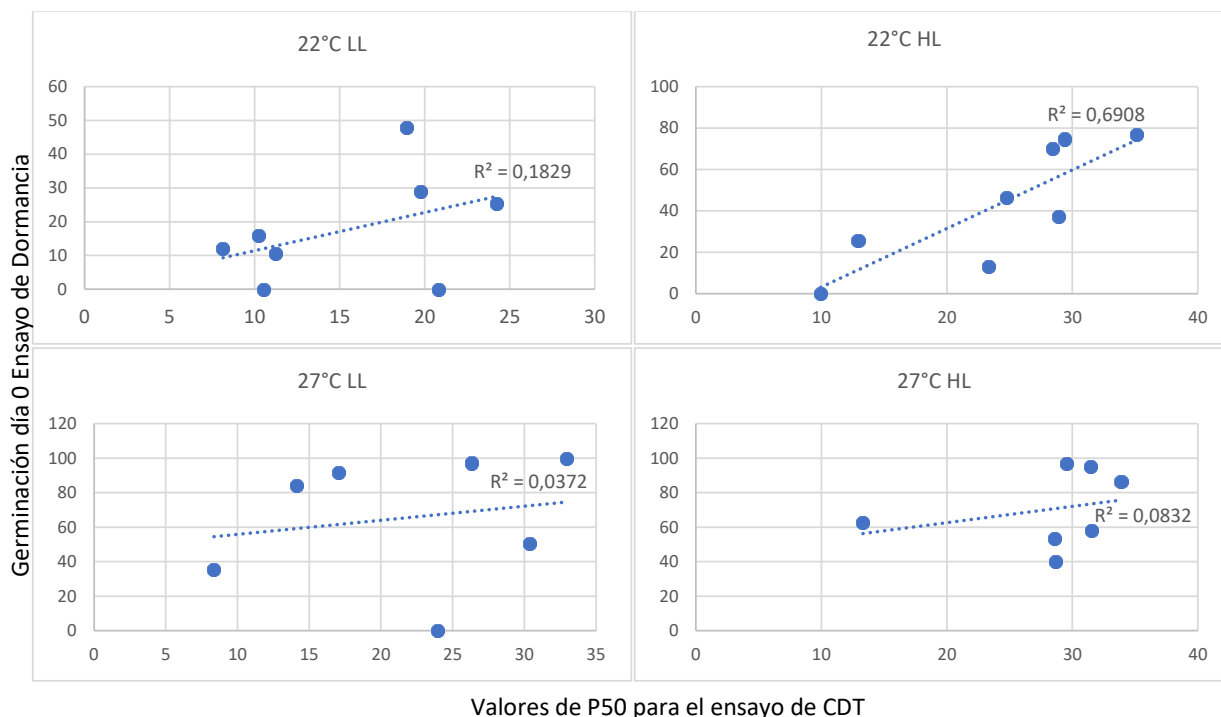
Para conocer cómo afectan las diferentes condiciones de crecimiento a la correlación existente entre dormancia y longevidad, se representaron los valores de P50 (ensayo longevidad) y

germinación tras la cosecha de semillas (día 0, ensayo dormancia) de todas las accesiones en cada condición de crecimiento por separado.

Los resultados de la **Figura 16** muestran que en la condición de 22°C de temperatura y alta intensidad lumínica, cuanto mayor es la longevidad de las semillas (P50), la germinación a día 0 también es mayor ( $R^2=0,69$ ). Es decir, se observa de nuevo una correlación negativa, mucho mayor, entre dormancia y longevidad: las semillas más longevas presentan menor dormición.

Sin embargo, para el resto de las condiciones de crecimiento, no es posible observar ningún tipo de correlación (**Figura 16**).

En las gráficas correspondientes a las condiciones de 27°C LL y 27°C LL se puede observar que solo existen 7 puntos. Esto es debido a que no hubo datos de la accesión **Par-4**, en el primer caso, y **Chat-1**, en el segundo caso, al no disponer de semillas a causa de problemas durante el cultivo de las plantas.



**Figura 16. Gráfica de correlación entre la longevidad y la dormancia de las accesiones en cada una de las condiciones de cultivo.** Esta comparativa se realiza con los valores de P50 obtenidos en el ensayo de longevidad y los valores de germinación a día 0 de todas las accesiones para cada una de las condiciones de cultivo obtenidos en el ensayo de dormancia. En el eje vertical (Y) se muestra la germinación de todas las accesiones obtenida a día 0; el eje horizontal (X) está referido a los valores P50 de cada accesión.

#### 4.1.3.3. Correlación para cada accesión en todas las condiciones de crecimiento estudiadas

Al analizar la correlación entre longevidad y dormancia para cada una de las accesiones estudiadas, encontramos que este valor era muy variable entre accesiones, por lo que el genotipo determina en gran medida la existencia o no de correlación (**Figura 17**)

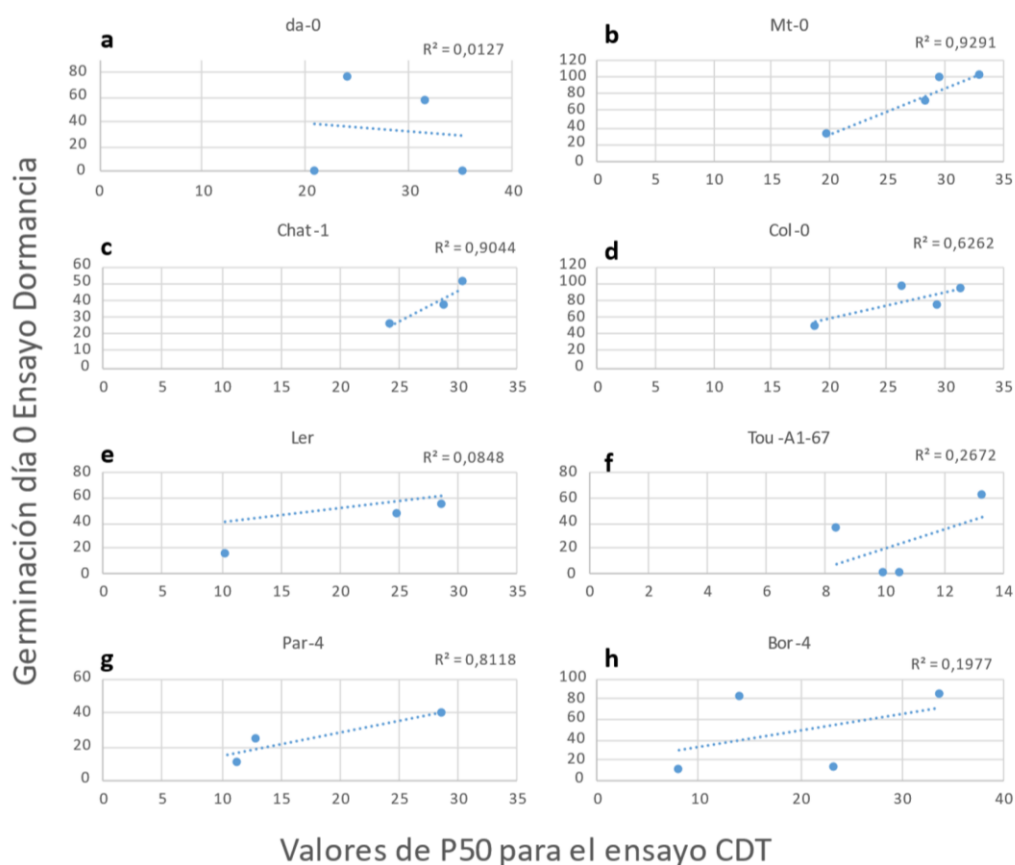
Aunque en este caso, los valores de  $R^2$  se obtienen únicamente a partir de 4 datos, por lo que las conclusiones extraídas no son muy fiables, puede ser de interés la identificación de

diferencias, si las hay, entre las accesiones catalogadas como muy longevas y aquellas identificadas como de longevidad reducida.

En este sentido, en la **Figura 17** se observa que, accesiones clasificadas como longevas, tal como **Mt-0** o **Chat-1**, muestran una muy buena correlación entre la longevidad y la germinación a día cero ( $R^2 > 0.9$ ). Por el contrario, accesiones poco longevas, como **Tou-A1-67** y **Bor-4**, no muestran correlación entre dormancia y longevidad ( $R^2 0.19-0.26$ ).

Como excepciones a esta observación, encontramos la accesión **Par-4**, clasificada como poco longeva pero con una clara correlación entre longevidad y dormancia, y la accesión **Da-0**, muy longeva, que no muestra ninguna correlación.

Entre las accesiones que hemos usado de referencia, o control, **Col-0** sí muestra correlación (aunque en menor medida que las mencionadas anteriormente), pero no **Ler**.



**Figura 17.** Gráficas comparativas de la longevidad y la dormancia de cada una de las accesiones frente a todas las condiciones de cultivo. El análisis se realiza comparando los valores de P50 de cada una de las accesiones, obtenidos en el ensayo de longevidad, frente a los valores de germinación de día 0 del ensayo de dormancia en todas las condiciones de cultivo.

#### 4.1.4. Análisis de la permeabilidad de las semillas

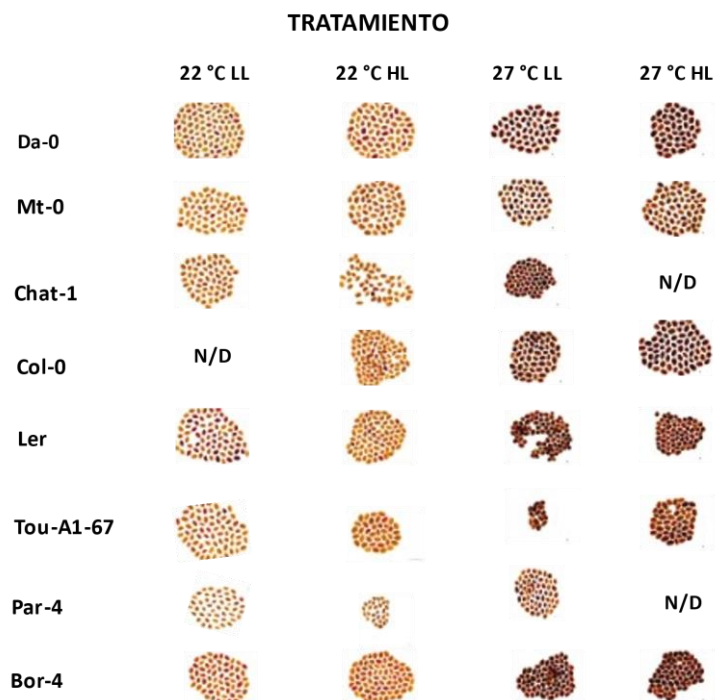
En estudios previos se ha mencionado la posibilidad de que tanto la dormancia como la longevidad de las semillas pueden estar definidas por la cubierta, o testa. Por ello, en paralelo al ensayo de dormancia y longevidad, se procedió a realizar un ensayo de permeabilidad a sales de tetrazolio (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) para determinar la permeabilidad de la

testa de las semillas, después de haber cultivado las plantas bajo las cuatro distintas condiciones.

Este ensayo está basado en la reacción que se produce en las células del embrión a causa de la oxidación de las sales de tetrazolio que atraviesan la cubierta, como consecuencia de la respiración mitocondrial, que dota a la semilla de un color rojizo. Así pues, cuanto mayor sea la intensidad de la coloración, mayor será la permeabilidad de la cubierta.

Nuestros resultados muestran que existe una menor permeabilidad en las semillas provenientes de las plantas cultivadas a 22°C (color amarillo-marrón claro) que en aquellas que se cultivaron a 27°C (color marrón oscuro-burdeos) (**Figura 18**). Los resultados indican que esta diferencia puede ser consecuencia del efecto que ejerce la temperatura en la permeabilidad de la testa de las semillas. Si incidimos un poco más observamos que, si únicamente nos basamos en los parámetros de temperatura de cultivo, no existe una variación evidente entre las accesiones con mayor longevidad frente a las que poseen una longevidad inferior.

A la hora de estudiar cómo afecta la luz a la permeabilidad, comprobamos que esta variante, aparentemente, no es influyente puesto que no existe una clara diferencia en permeabilidad entre las semillas de plantas cultivadas en distintas intensidades de luz, ni entre las accesiones muy longevas frente a las poco longevas.



**Figura 18.** Imagen representando la permeabilidad de las semillas de las accesiones a sales de tetrazolio. Se pueden observar las diferencias entre las accesiones cultivadas a 22°C (color amarillo-marrón claro) y las accesiones cultivadas a 27°C (color marrón oscuro-burdeos). Los huecos marcados como N/D hacen referencia a aquellas accesiones para las cuales no hubo semillas suficientes para realizar el ensayo. Las accesiones están ordenadas, de arriba abajo, de mayor a menor longevidad (determinada por el grupo).

## 4.2. Búsqueda de componentes/factores moleculares que determinan la reducida longevidad de las semillas de *tt7*

Como se ha comentado en la introducción, trabajos anteriores realizados en el laboratorio han servido para caracterizar al mutante *tt7*, cuya semilla tiene una longevidad muy baja. Esta reducida viabilidad de sus semillas se ha atribuido al desarrollo anormal de su testa, como respuesta a una acumulación excesiva de Kaempferol-3-ramnósido. Entre los ensayos realizados para estudiar este mutante, se llevó a cabo un RNAseq de semilla en desarrollo comparándolo con el control *WS* y se observó un completo reajuste transcripcional (Niñoles et al., 2023). En este trabajo, tratamos de diferenciar las respuestas propias de la testa de las que ocurren en el embrión. Para ello, realizamos un RNAseq por separado de la testa y el embrión de un doble mutante *tt3tt7cr*, que acumula diferentes derivados de kaempferol en las diferentes estructuras.

Con este objetivo se puso a punto el método de separación de embrión y testa descrito en el **Anexo I**, optimizando el proceso para obtener un tejido lo más aislado posible, usando para ello tampón de extracción de RNA, y así obtener un RNA lo más limpio e íntegro posible.

### 4.2.1. Análisis transcriptómico mediante RNAseq de testas de mutantes *tt3tt7cr*

Una vez extraído el RNA de las testas, tanto de *WS* como de *tt3tt7cr*, se analizó su calidad (RIN) y se mandó a secuenciar.

De entre todos los genes obtenidos tras el análisis bioinformático seleccionamos aquellos que resultaron estar diferencialmente expresados. Para ello, el primer paso fue determinar qué genes presentaban un p-valor ajustado (padj) inferior al 0'05 y, posteriormente seleccionamos aquellos que presentaron mayor expresión en *tt3tt7cr* con un valor superior a 3 (Log2FoldChange superior al 1'5). Tras realizar este proceso, se obtuvieron un total de 201 genes más expresados en el mutante *tt3tt7cr* con respecto al control. Los 100 primeros se muestran en el **Anexo III**.

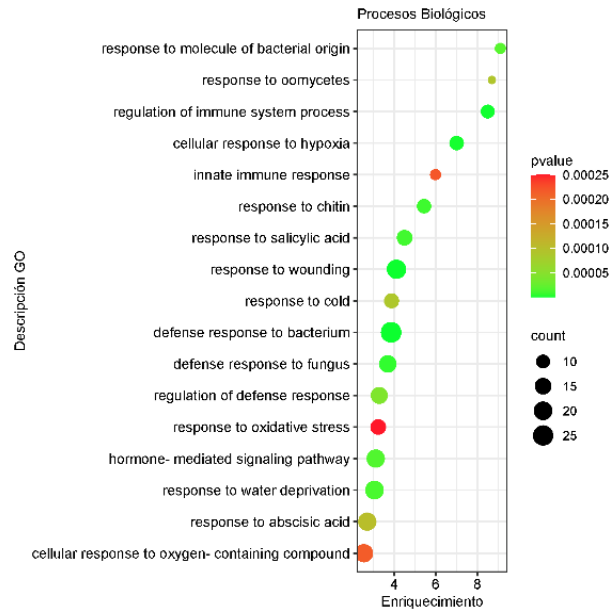
De igual modo, seleccionamos aquellos genes que presentaron menor expresión en *tt3tt7cr*. De entre los genes con el p-valor ajustado (padj) inferior al 0'05 seleccionamos aquellos que presentaron una expresión menor de 3 veces en *tt3tt7cr* (Log2FoldChange inferior a -1'5), obteniendo un total de 464 genes. Los 100 primeros se muestran en el **Anexo IV**.

#### 4.2.1.1. Análisis de categorías funcionales de los genes obtenidos en la testa

Los genes considerados como más o menos expresados en *tt3tt7cr*, en base al criterio descrito anteriormente, se introdujeron en el software **Panther**<sup>®</sup>, herramienta que permite identificar las categorías funcionales (Procesos Biológicos, Funciones Moleculares y Componentes Celulares) que se encuentran enriquecidas en nuestro análisis de RNAseq. Además, usamos el software SRPlot ([SRplot - Free online GO, Pathway bubble plot \(bioinformatics.com.cn\)](http://SRplot - Free online GO, Pathway bubble plot (bioinformatics.com.cn))) para visualizar más fácilmente estas categorías.

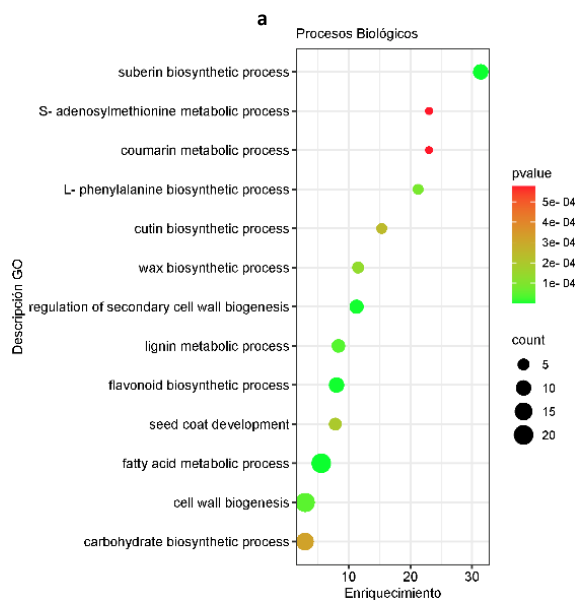
En el caso de los genes más expresados en *tt3tt7cr*, únicamente pudimos identificar categorías funcionales sobrerrepresentadas en Procesos Biológicos. En la **Figura 19** se muestran las

subclases o términos GO más específicos, excluyendo los términos “parentales”, que las englobarían. Estas categorías muestran que estos genes están relacionados con la respuesta a estrés, principalmente biótico (9/17 categorías) aunque también abiótico (6/17 categorías).



**Figura 19. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes inducidos en la testa de las semillas del mutante *tt3tt7cr* mediante Panther.**

Al estudiar las categorías funcionales de los genes menos expresados en *tt3tt7cr* en la testa, encontramos principalmente categorías relacionadas con la síntesis de compuestos propios de la estructura de la testa o pared celular como la suberina, cutina, lignina flavonoides, ceras... (Figura 20a). En cuanto a las funciones moleculares, estos genes intervenían, como era de esperar, en las rutas metabólicas de formación de los compuestos mencionados anteriormente (Figura 21b). En cuanto a los componentes celulares, correspondían principalmente al fotosistema y a la pared celular (Figura 21c).



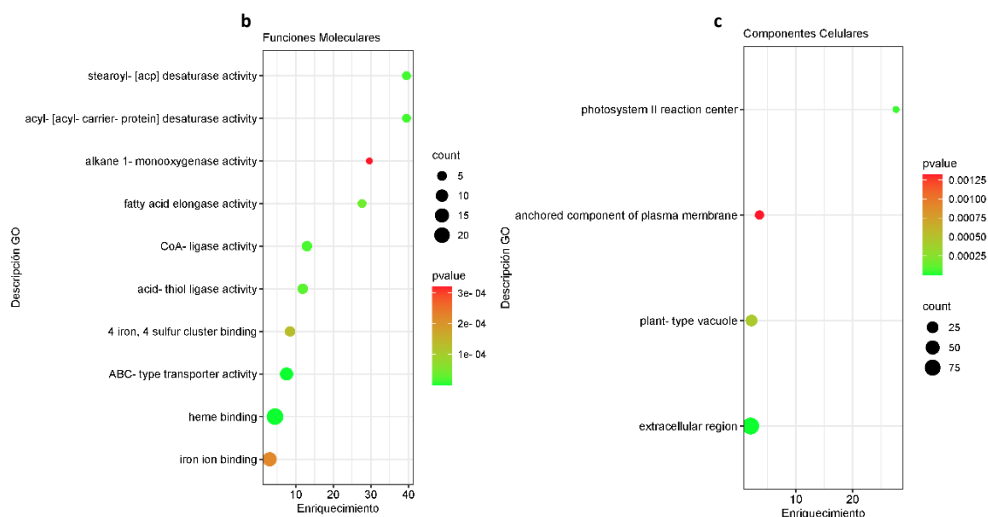


Figura 21. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes reprimidos en la testa de las semillas *tt3tt7cr* mediante Panther.

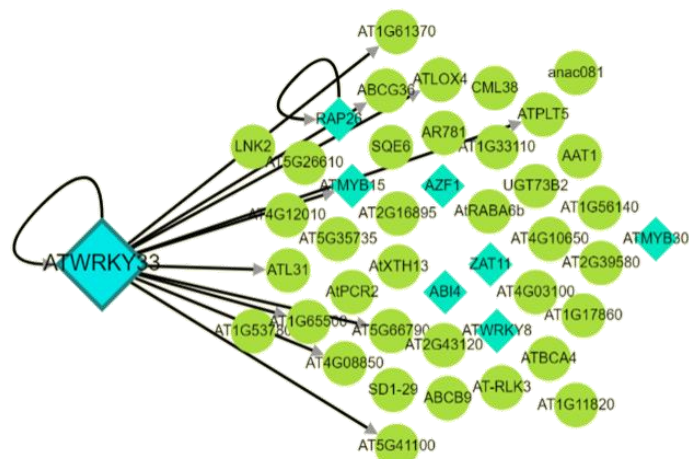
#### 4.2.1.2. Análisis para la identificación de factores de transcripción (TF) mediante TF2Network

Para determinar los factores de transcripción candidatos a regular los genes diferencialmente expresados, usamos el software TF2Network. Este análisis se realizó por separado sobre los genes más o menos expresados en *tt3tt7cr*. En el caso de los genes más expresados, solo obtuvimos como resultado el factor de transcripción **WRKY33**, aunque también aparecieron otros WRKY, que no se ajustaban a nuestro criterio de selección, ya que el valor de PD (valor de la interacción Proteína/DNA) fue igual a 0 (Tabla 3). A partir del WRKY 33 pudimos identificar sus genes diana (Figura 21, Tabla 4). Una vez identificadas sus dianas, estudiamos cuales podían ser sus funciones principales. (Anexo V), viéndose activados la mayoría de los genes relacionados con respuesta a estrés biótico o abiótico.

Regulador	Symbol	PD	q-value
AT2G38470	<b>ATWRKY33</b>	20%	2,78E-02
AT3G01970	ATWRKY45	0%	3,49E-03
AT2G30590	WRKY21	0%	2,72E-02
AT1G69310	ATWRKY57	0%	2,46E-02
AT5G43290	ATWRKY49	0%	2,46E-02
AT4G30935	ATWRKY32	0%	2,78E-02
AT2G23320	AtWRKY15	0%	2,99E-02
AT2G46400	ATWRKY46	0%	2,99E-02

Tabla 3. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente inducidos. Se resalta en verde el factor de transcripción WRKY33 que es el único que cumple el criterio de selección: PD mayor que cero (PD= Proteín-DNA interaction).





**Figura 21.** Dianas del factor de transcripción (FT) WRKY 33 obtenidas a partir del software TF2Network. Los genes señalados con flechas son aquellos para los que se ha comprobado interacción proteína/DNA.

Factor de transcripción (TF)	Descripción	Diana	Descripción
WRKY33	Proteína WRKY 33 de unión a DNA. Regula la relación antagonica entre las vias de defensa que median las respuestas a <i>P. syringae</i> y los patógenos fúngicos necrotrofos. Situado en núcleo, actúa como respuesta a varios estreses abióticos, especialmente estrés salino. Regula el gen CYP94B1 del citocromo P450 para controlar la formación de una barrera apoplástica en las raíces para conferir tolerancia a la sal.	ABCG36	Proteína de plantas de la familia de los transportadores tipo ABC, ABC2 y PDR.
		ATL31	Insensible carbono/nitrógeno1
		ATLOX4	Proteína de la familia lipogenasa con dominio PLAT/LH2
		ATMYB15	Proteína 15 del dominio myb
		ATPLT5	Transportador 5 de poli/monosacáridos
		AT1G61370	Familia de la proteína kinasa del locus S de lectina
		AT1G65500	Desconocido
AT4G08850	Familia de las proteína kinasa tipo receptor de repeticiones ricas en leucina		
AT5G41100	Familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina		
AT5G66790	Superfamilia de proteínas kinasas		

**Tabla 4.** Dianas del factor de transcripción WRKY33. En la columna "Diana" se muestran los genes con los que WRKY33 interactúa de forma directa.

Cuando hicimos el análisis de los genes menos expresados en *tt3tt7cr*, los resultados que obtuvimos fueron 6 factores de transcripción con PD (interacción Proteína-DNA) mayor que cero (**Tabla 5**). Las dianas de dichos factores de transcripción se muestran en la **Tabla 6**. Es interesante destacar que en muchos casos las dianas de estos FT coinciden (**Tabla 7**).

Regulador	Symbol	PD	q-value
AT1G22640	ATMYB3	17%	3,50E-05
AT5G10280	ATMYB64	1%	1,20E-06
AT1G16490	ATMYB58	1%	1,40E-07
AT1G79180	ATMYB63	1%	4,24E-04
AT5G18270	ANAC087	1%	6,17E-03
AT3G26790	FUS3	1%	3,30E-04

**Tabla 5.** Detalle de los resultados del análisis de búsqueda de factores de transcripción utilizando TF2 para los genes reprimidos. Se resaltan en verde los genes menos expresados en la cubierta de las semillas de *tt3tt7*, en comparación con semillas wild type que cumplen el criterio de selección: PD mayor que cero (PD= Porortein-DNA interaction).

Factores de transcripción (TF)	Descripción	Diana
ANAC087 (Regulado por MY3 y HB5)	Proteína 87 conteniente del dominio Arabidopsis NAC	4CL1 C4H HCT
MYB3	Proteína 3 del dominio myb	4CL1 C4H CCoAOMT1 CYP75B1 HCT
MYB58 (Regulado por MY3 y ATHB5)	Proteína 58 del dominio myb	4CL1 C4H CCoAOMT1 CYP98A3 HCT
MYB63	Proteína 63 del dominio myb	4CL1 C4H CCoAOMT1 HCT
MYB64	Proteína 92 del dominio myb	4CL1 CYP98A3 HCT
FUS3	Proteína de la familia de los factores de transcripción tipo AP2/B3	CYP75B1 3G02630

**Tabla 6. Genes diana de los TF de los genes reprimidos, para los que se ha demostrado interacción directa proteína /DNA.** En la columna de la izquierda se muestran todos los factores de transcripción obtenidos en el análisis del TF2Network; en la columna de la derecha, marcada como "Diana" se muestran los genes diana con los que interactúa de forma directa.

Diana	Descripción	Factores de transcripción (TF)
4CL1	4-cumarato:CoA ligasa 1	ANAC087 MYB3 MYB58 MYB63 MYB64
C4H	Cinamato 4 hidroxilasa	ANAC087 MYB3 MYB58 MYB63
CCoAOMT1	Proteína de la superfamilia de las metiltransferasas dependientes de S-adenosil-L-	MYB3 MYB58 MYB63
CYP75B1	Citocromo P450, familia 75, subfamilia B polipéptido 1 (Transparent Testa 7)	MYB3 FUS3
CYP98A3	Citocromo P450, familia 98, subfamilia A polipéptido 3 (cumarato 3-hidroxilasa, 33H)	MYB58 MYB64
HCT	Hidroxicinamoil-CoA shikimato/kinato hydroxicinamoil transferasa	ANAC087 MYB3 MYB58 MYB63 MYB64

**Tabla 7. Dianas comunes a los distintos factores de transcripción que regulan los genes reprimidos en la testa de tt3 tt7cr.** En la columna de la izquierda se muestran la dianas y en la columna de la derecha se muestran todos los factores de transcripción que interaccionan (DNA-proteína) con cada una de ellas

Tal y como se describe en detalle en el **Anexo VI**, estas dianas son enzimas que participan en la biosíntesis de fenilpropanoides, lignina, suberina y flavonoides, todos ellos componentes estructurales de pared celular y testa de la semilla.

#### 4.2.2. Análisis transcriptómico mediante RNAseq de embriones mutantes *tt3tt7cr*

Del mismo modo que se hizo con la testa, del tejido del embrión también se extrajo el RNA de ambas líneas. Una vez realizada la secuenciación y el análisis bioinformático, se identificaron los genes más y menos expresados en el mutante con respecto al control. El procedimiento fue idéntico al realizado con los datos de la testa: en primer lugar, seleccionamos todos los genes que presentaban un p-valor ajustado (*padj*) inferior a 0'05 y, a continuación, nos fijamos en el valor del *Log2FolChange* para diferenciar entre genes más y menos expresados. Por un lado, seleccionamos aquellos genes que presentaron un valor de *Log2FoldChange* superior a 1'5 o, lo que es lo mismo, que se encontraban 3 veces más expresados en el mutante. De este modo, obtuvimos un total de 1230 genes. Los 100 genes con mayor expresión se muestran en el **Anexo VII**.

De forma idéntica se seleccionaron los genes que menos se expresan. A partir de la selección inicial de los genes que mostraron un p-valor ajustado (*padj*) inferior a 0'05, seleccionamos aquellos genes que mostraron una abundancia menor a 3 veces sus valores normales o, lo que es lo mismo, un valor del *Log2FoldChange* inferior al -1'5.

La selección de los genes con menor expresión para el mutante resultó en la obtención de un total de 3423 genes. Los 100 primeros se muestran en el **Anexo VIII**.

Estos resultados muestran que en el embrión del mutante *tt3tt7cr* se produce una reprogramación transcripcional, incluso mayor que en el caso de la testa, tejido que, en principio, mostraba los mayores fenotipos.

##### 4.2.2.2. Análisis de categorías funcionales de los genes obtenidos en el embrión

Con la intención de obtener las categorías funcionales de los genes de nuestro RNAseq de embrión, decidimos realizar un análisis mediante la herramienta Panther®, de forma idéntica que hicimos con los datos de la testa.

En el caso de los genes más expresados en el mutante, observamos que los procesos biológicos en los que se veían involucrados estaban relacionados, principalmente, con la respuesta o defensa tanto frente a estreses bióticos (hongos y bacterias) como abióticos (calor, salinidad, humedad o peróxido de hidrógeno). También aparecía una respuesta a señalización hormonal, incluyendo hormonas como ácido abscísico, salicílico y jasmónico. Finalmente, es interesante destacar la presencia de la categoría de maduración de la semilla, mostrando un enriquecimiento de genes involucrados en este proceso en el embrión de *tt3tt7cr* (**Figura 22a**).

Por otro lado, resulta relevante indicar que las funciones moleculares “quercetin-7-0-glucosil transferasa” y “quercetin-3-0-glucosil transferasa” se encontraban enriquecidas en nuestros genes inducidos. Estas enzimas, están implicados en la transferencia de azúcares a los flavonoles para formar derivados glicosilados y determinan la composición final de estos compuestos. (**Figura 22b**). En cuanto a los componentes celulares, aparecía el cloroplasto (**Figura 22c**).

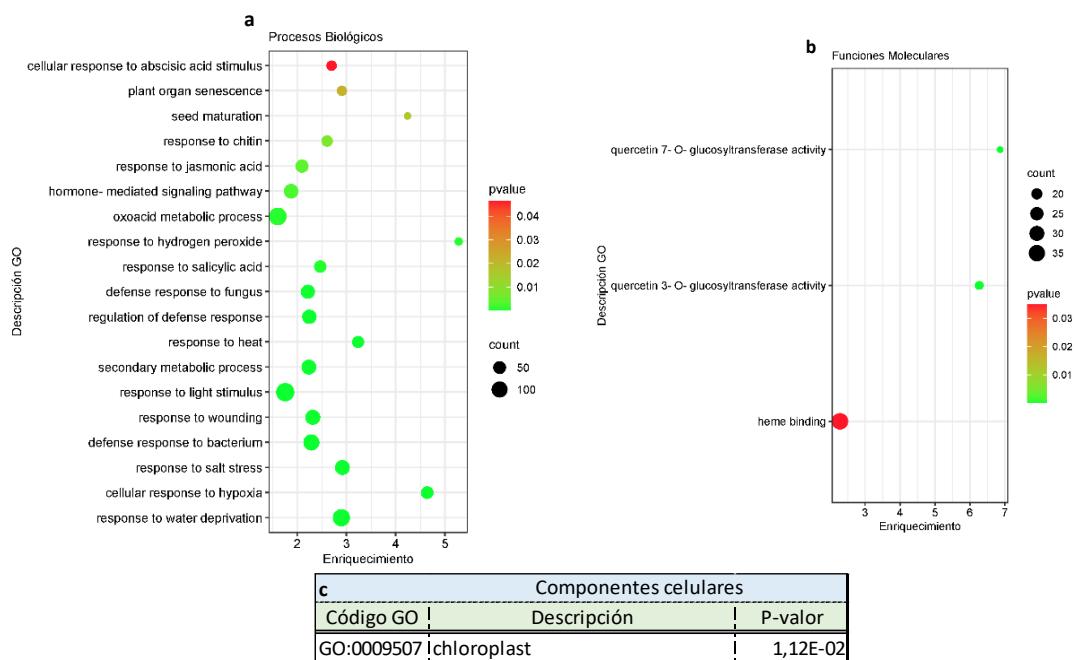


Figura 22. Categorías funcionales más específicas obtenidas a partir de los genes inducidos en el embrión del mutante *tt3tt7cr* mediante Panther.

Por su lado, los resultados del análisis de los genes menos expresados determinaron que las principales funciones biológicas que se veían afectadas fueron, sobre todo, aquellas relacionadas con la actividad de los fotosistemas y, por tanto, con la fotosíntesis. También se pudo observar que se veían afectados algunos procesos del metabolismo primario (como la biosíntesis de ácidos grasos y de polisacáridos) o secundario, como la formación de pigmentos o el catabolismo de la pectina. Además, aparece la categoría “organización del citoesqueleto de microtúbulos” y otras relacionadas como la citoquinesis y los procesos de mitosis y meiosis celular (Figura 23a). De forma similar, las principales funciones moleculares de los genes que se veían negativamente afectados fueron relacionadas con la clorofila, metabolismo de ácidos grasos y funciones asociadas a los microtúbulos (Figura 23b). Por lo tanto, no es extraño que los componentes celulares de los cuales forman parte estos genes fueran, principalmente, de los cloroplastos y, más concretamente, de los distintos fotosistemas, pero aparezcan también otros componentes celulares como el citosol, los microtúbulos o los plasmodesmos (Figura 23c).

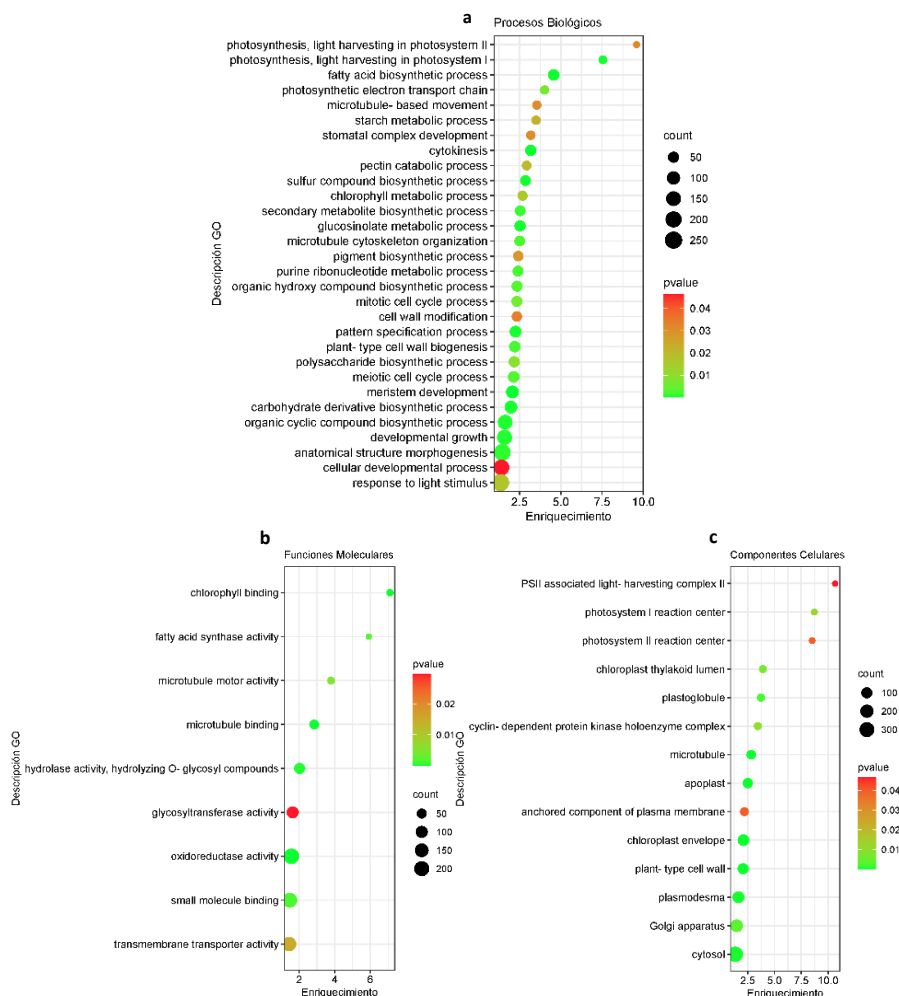


Figura 23. Principales categorías funcionales a partir de los genes reprimidos en el embrión de las semillas del mutante *tt7* obtenidos mediante Panther.

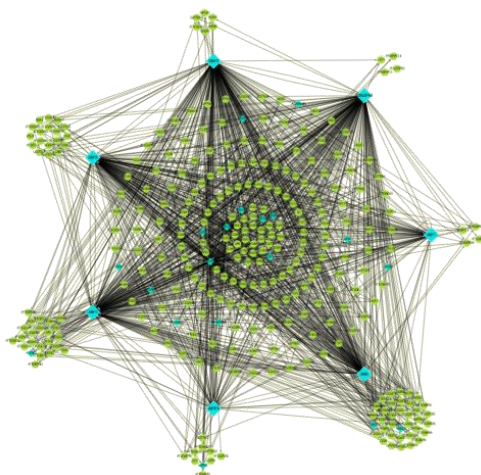
#### 4.2.2.3. Análisis para la identificación de factores de transcripción (TF) mediante TF2Network

También tratamos de identificar los factores de transcripción (TF) que regulaban estos genes. Como se vio anteriormente, este análisis se llevó a cabo con el software TF2Network, donde se analizaron inicialmente los genes más expresados. Este análisis resultó en la obtención de 7 factores de transcripción los cuales, según la descripción que queda detallada en el Anexo IX, intervenían, directa o indirectamente, en procesos relacionados con la fotosíntesis (Tabla 8).

Regulador	Symbol	PD	q-value
AT2G46270	GBF3	56%	1,52E-02
AT4G01120	ATBZIP54	46%	2,62E-02
AT4G34000	ABF3	41%	1,36E-03
AT3G19290	ABF4	31%	1,01E-02
AT2G36270	ABI5	24%	1,44E-02
AT1G49720	ABF1	12%	4,65E-06
AT2G43010	AtPIF4	11%	2,21E-03

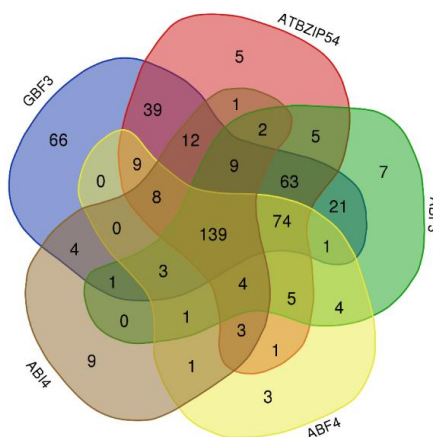
Tabla 8. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente inducidos. Se resalta en verde los factores de transcripción que cumplen el criterio de selección: PD mayor que cero (PD= Proteín-DNA interaction).

A diferencia de lo ocurrido en el análisis de los genes inducidos en la testa, en este caso no pudimos identificar individualmente las funciones de los genes diana de estos factores de transcripción debido a la densa red de interacción que se obtuvo (**Figura 24**). En esta red cada uno de los factores de transcripción se une a un gran número de genes, lo que hace inviable realizar un listado para cada uno de ellos.



**Figura 24.** Red de interacciones de los factores de transcripción inducidos en el embrión y los genes presentes en el análisis. Se puede observar cómo cada uno de los factores de transcripción posee interacciones múltiples con otros genes, incluso con los factores de transcripción obtenidos en el análisis.

Por ello decidimos realizar un diagrama de Venn, para determinar cuántos de los genes diana de estos FT eran específicos y cuántos eran compartidos entre ellos (**Figura 25**). Para simplificar el análisis, se emplearon sólo los 5 factores de transcripción con mayor valor de PD.



**Figura 25.** Nivel de interacción y especificidad de los genes frente a cada uno de los factores de transcripción inducidos en el embrión. En el gráfico se puede ver cuántos de los genes poseen una interacción compartida con los otros factores de transcripción, y cuántos son específicos de cada uno de ellos.

En este diagrama se puede observar que 66 genes eran dianas específicas de GBF3, 9 pertenecían a ABI4, 7 correspondían a ABF3, 5 interaccionaban únicamente con BZIP54 y 3 eran exclusivos de ABF4. Todos ellos, en general, compartían un total de 139 genes, quedan

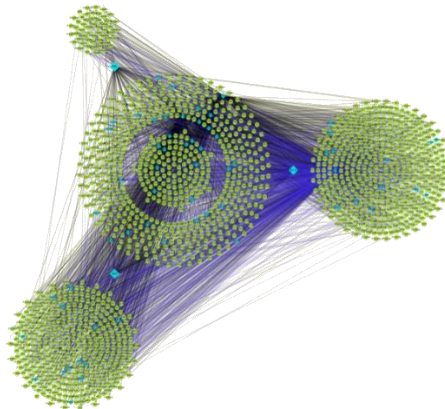
descritos en el **Anexo X**. Un gran número de estas dianas comunes forman parte del grupo de factores de transcripción con dominio NAC que, como vimos en el análisis de la testa, regula la C4H, 4CL y HCT y que son enzimas que actúan aguas arriba de la ruta de formación de flavonoides, suberina y lignina. Además, también aparece el gen *TT8*, factor de transcripción que regula la biosíntesis de flavonoides. Por último, muchos de ellos están implicados en la homeostasis o ruta de señalización y respuesta al ácido abscísico, como por ejemplo: ABF1, ABF3, HAI2, HAI3, etc.

Para el caso del análisis de los genes menos expresados, obtuvimos únicamente 3 factores de transcripción. Dos de ellos interaccionan con fitocromos y están involucrados en los procesos de fotosíntesis (PIF5 y PAP3), y uno interviene en la respuesta a hormonas y desarrollo floral (AGL20) (**Tabla 9**). En el **Anexo XI** se muestra en detalle las funciones de estos FT.

Regulator	Symbol	PD	q-value
AT2G45660	AGL20	4%	1,64E-02
AT3G59060	PIF5	4%	2,63E-08
AT1G09530	PAP3	2%	8,43E-05

**Tabla 9. Resultados del análisis del TF2Network para los genes diferencialmente reprimidos.** Se resalta en verde los factores de transcripción que cumplen el criterio de selección: PD mayor que cero (PD= Proteín-DNA interaction).

Del mismo modo que ocurría con los factores de transcripción resultantes del análisis de los genes inducidos, las interacciones que se obtuvieron en el TF2Network dibujaron un mapa muy denso, imposibilitando la identificación individual de sus genes diana (**Figura 26**).



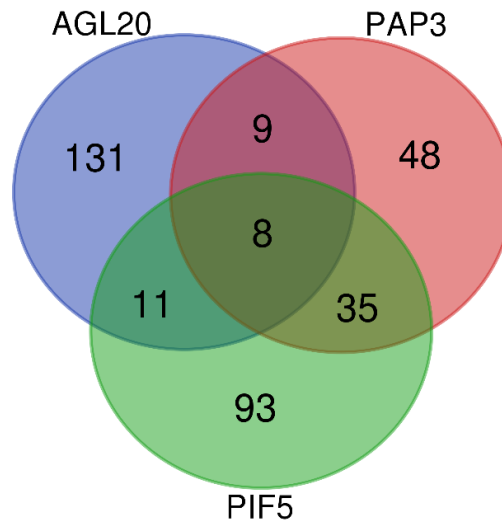
**Figura 26. Red de interacción entre los factores de transcripción reprimidos en el embrión y los genes presentes en el análisis.** Se puede observar el alto nivel de interacción y la densa red que forman los factores de transcripción reprimidos con los genes presentes en el análisis.

Así pues, se decidió proceder de igual modo que con los factores de transcripción obtenidos en el análisis de los genes más expresados, realizándose un diagrama de Venn. (**Figura 27**).

Como se puede observar, del total de genes diana, 131 fueron específicos de AGL20, 93 correspondieron a PIF5 y solo 48 pertenecían a PAP3. Respecto al total de genes compartidos entre los tres factores de transcripción, solo resultaron coincidir un total de 8.

Entre estos ocho genes encontramos una proteína de la familia de las remorinas (REM, AT1G67590), una proteína dedo de zinc tipo C2H2 (BLJ, AT1G14580), una proteína de

potenciación de brasinoesteroides (BEE3, AT1G73830), dos proteínas de transporte de auxinas (PIN3, AT1G70940; y AUX1, AT2G38120), una proteína de tolerancia al frío (CBF1, AT4G25490), una proteína rica en repeticiones de leucina de la familia de las proteínas kinasas (LRR-RLK, AT2G42290) y una factor de transcripción de la familia C2H2 BIRD (IDD4, AT2G02080). Todos ellos quedan descritos en el **Anexo XI**.



**Figura 27. Diagrama de Venn para la relación entre los factores de transcripción y los genes.** El diagrama muestra la especificidad de interacción de los genes con cada uno de los factores de transcripción y el número de genes que poseen una interacción compartida.



# DISCUSIÓN

Tal como se ha comentado a lo largo del presente trabajo, la longevidad y la dormancia de las semillas de las plantas no solo dependen de su componente genético, sino también del ambiental. Englobado en los componentes ambientales, los factores externos que pueden influir en la longevidad y dormancia de la semilla son: la temperatura (**MacGregor et al., 2015**), el estrés hídrico (**Ellis & Yadav, 2016**), la intensidad y calidad de la luz (**Li et al., 2017**) y la disponibilidad de nutrientes (**Nagel et al., 2015**), o el lugar en el que las plantas son crecidas (**Mondoni et al., 2011**). Pese lo que acabamos de comentar, la información disponible sobre la influencia del ambiente en el que se desarrolla la planta madre sobre la calidad de las semillas es aún escasa. En lo referente al genotipo, el comportamiento de las semillas va a depender, por un lado, del efecto del material materno que formará sus tejidos más externos (testa) (**Probert et al., 2009**) y, por otro, de la regulación hormonal y las rutas de señalización que se den en el resto de sus tejidos (**Lepiniec et al., 2018**). Por ejemplo, el mutante *tt7*, caracterizado previamente en el laboratorio, posee una longevidad muy reducida porque su testa no puede desarrollarse normalmente. Aunque ha sido posible determinar que ese desarrollo anormal se debe a la acumulación excesiva del flavonol K3R, los mecanismos moleculares que lo causan todavía no están bien definidos. Por ello se planteó en este trabajo, para avanzar en el conocimiento del efecto del componente ambiental y genético sobre la longevidad de las semillas.

#### Componente ambiental

En nuestros resultados hemos podido comprobar que, en líneas generales un incremento de la temperatura y la intensidad lumínica se traduce en un aumento en la longevidad de las semillas. En el caso de las accesiones **Col-O** y **Ler**, ya se había determinado el efecto de la luz y temperatura a la que crece la planta madre sobre la longevidad de sus semillas, y coincide con nuestros datos, aunque las condiciones de luz y temperaturas fueron ligeramente distintas a las empleadas anteriormente, incrementando de 22 a 75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para LL y de 200 a 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para HL; y de un intervalo de temperatura de 15-25°C a 22-27°C (**He et al., 2014**).

Sin embargo, este trabajo ha mostrado que, a pesar de esta tendencia común, cada accesión tiene un comportamiento propio en cuanto a la longevidad de sus semillas cuando estas han sido crecidas en diferentes condiciones ambientales. Este comportamiento diferencial es consecuencia de la variabilidad genética existente entre accesiones. De hecho, en **Niñoles et al., 2022** se muestra que los mRNAs almacenados en las semillas de las accesiones longevas y poco longevas son muy variables. También se ha observado que no hay un componente único capaz de explicar la mayor o menor longevidad de todas ellas, sino que la longevidad de una accesión en concreto se debe a la suma de múltiples factores que contribuyen a ella en ese genotipo en concreto.

Es importante resaltar que el aumento de la temperatura de 22°C a 27°C no provoca, en principio, un estrés por calor, sino que posiblemente se estén activando respuestas termomorfogénicas. Hasta la fecha, este tipo de respuestas se han estudiado principalmente en tres escenarios de la vida de las plantas. La primera está referida a la vernalización y estratificación; la segunda, en la germinación de las semillas y el crecimiento vegetativo; y la tercera durante desarrollo de la planta (**Casal & Balasubramanian, 2019**). Una de las respuestas más características es la aceleración del desarrollo de los estadios de la planta, dentro del cual cabe destacar el incremento de germinación que se produce al aumentar la temperatura de 7 a

13 y 28°C (Heschel et al., 2007). Para que esto ocurra se ha de señalar una respuesta hormonal que da comienzo en el fitocromo B, que actúa como termosensor e interacciona directamente con PIF4 que es quien orquestará esta respuesta. Además, la señalización del termosensor también favorece la presencia de las proteínas de choque térmico HSP90.

Siguiendo esta línea, estudios previos del grupo identificaron que una mayor presencia de HSPs, sobre todo HSPs de pequeño tamaño, se traducían en un incremento de la longevidad (Niñoles et al., 2022). Otros estudios también han observado que una mayor concentración de HSPs de pequeño tamaño, como la HSP17'5 (Zhou et al., 2012) y HSP18 (Kaur et al., 2015) mejoraban el vigor de la germinación. Además, se ha demostrado que la sobreexpresión del factor de transcripción HSFA1, que regula la expresión de HSPs, hace que las semillas sean más longevas (Prieto-Dapena et al., 2006), aunque parece que la presencia de HSF9A puede reducir la longevidad de las semillas (Tejedor-Cano et al., 2010). Con todo esto, una posibilidad es que la mayor longevidad de las semillas a 27°C esté mediada por una mayor concentración de HSPs, aunque no se puede descartar que otros efectos relacionados con la termomorfogénesis también estén jugando un papel.

En cuanto a la intensidad lumínica, las plantas tienen sistemas fisiológicos y moleculares para evitar el efecto de una intensidad lumínica elevada. A pesar de ello, un exceso de luz puede llegar a ser nocivo, siendo el primer afectado el fotosistema I del cloroplasto (PSI). El exceso de luz produce un desajuste en el intercambio electrónico del fotosistema afectando su funcionamiento normal y generando un cambio en el pH del lumen de los tilacoides, cuyo efecto directo es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En función del producto ROS que se produzca, las respuestas moleculares serán distintas. En el caso de que se produzca peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a partir del singlete  $O_2^-$ , el criptocromo 1 (CRY1) se verá afectado y, con él, las proteínas ELIP, ZAT10 y ZAT12, siendo estas dos últimas las favorecerán la mayor expresión de las enzimas antioxidantes APX1 y 2. Por otro lado, la oxidación del fotosistema 2 (PSII) favorece la producción del singlete  $O_2^-$ , cuyo efecto directo es la formación de GPXH, mientras que el efecto indirecto, mediante la acción de las EX1 y 2, es favorecer la presencia de los factores WRKY (Li et al., 2009). A su vez, cuando se oxida el plastoquinol ( $PQH_2$ ), aparte de interrumpir el intercambio electrónico entre el fotosistema I y II, actúa como interruptor para la formación de las HSP70, familia de las proteínas de choque térmico mencionadas anteriormente (Li et al., 2009). Cualquiera de estos factores puede ser responsable del aumento de longevidad observado en las semillas crecidas en condiciones de alta luminosidad.

Es conocida la relación entre longevidad y dormancia (Nguyen et al., 2012), en este trabajo confirmamos que, como tendencia general, existe una correlación negativa entre ellas y analizamos el efecto de las condiciones de crecimiento y el efecto de la accesión. Al analizar el comportamiento de las distintas accesiones en cada una de las condiciones de cultivo, encontramos que la condición de 22°C y alta intensidad lumínica (HL) es la que mostró una correlación negativa más clara. Cuando incidimos un poco más y analizamos cada accesión por separado para cada una de las condiciones, vimos que esta correlación negativa estaba muy marcada en las accesiones *Mt-0* y *Chat-1*, clasificadas como muy longevas, y en menor medida en las accesiones *Col-0* (control) y *Par-4* (poco longeva), mientras que en el resto no pudimos determinar una correlación clara. Por lo tanto aunque, en líneas generales, se ha visto un efecto

de la luz y la temperatura, este trabajo muestra que cada accesión responde de forma variable a las condiciones ambientales.

Otro de los parámetros que define la longevidad de las semillas es la permeabilidad de su testa, cuyo análisis realizamos mediante la tinción de tetrazolio. La lógica dice que si la permeabilidad de la cubierta es mayor, menor será la longevidad de las semillas tal como se habría sugerido en estudios previos (Renard et al., 2020). No obstante, se ha comprobado que no solo la testa va a determinar la longevidad, sino que el componente genético del embrión también va a desempeñar un papel importante (Niñoles et al., 2022). En nuestro trabajo, al realizar la tinción con tetrazolio pudimos observar que un aumento de la temperatura (22 → 27°C) favorecía que las testas fueran más permeables pero, contradictoriamente, los resultados del ensayo de CDT demostraron que ese aumento en la temperatura tenía un efecto positivo en la longevidad de las semillas. Por tanto, reforzamos la teoría de que no solo la testa va a ser determinante para la longevidad de las semillas, sino que el embrión también jugará un papel importante para otorgar una larga vida a la semilla.

#### Componente genético

En el presente trabajo se han dirigido gran parte de los esfuerzos a separar los embriones de las testas de las semillas de *Arabidopsis thaliana*. El interés por llevar a cabo este proceso se debe a que estudios previos realizados en el laboratorio caracterizando el mutante *tt7*, han mostrado que el embrión del mutante acumula kaempferol-3-glucosido-7-rhamnosido, kaempferol-3-glucósido y kaempferol-3-ramnosido-7-rhamnosido, mientras que su testa presenta, principalmente, una mayor cantidad de kaempferol-3-ramnosido (K-3-R). Este trabajo anterior ha encontrado relación entre la reducida longevidad de *tt7* y fallos en el desarrollo de la testa, asociados a la acumulación de K-3-R. Para determinar los componentes moleculares implicados, se realizó un RNAseq pero, al haberlo realizado semillas enteras, no es posible discernir qué parte de la respuesta observada se debe a la testa y cual al embrión. Del mismo modo, no queda claro si parte del fenotipo observado en *tt7*, pueda deberse también a defectos en el embrión, tal como se ha sugerido en algunos estudios.

Por tanto, el estudio que aquí se presenta proporciona información sobre las respuestas moleculares a compuestos flavonoides específicos o, lo que es lo mismo, los genes que están regulados por esos **flavonoides y, además, en un tejido concreto**. Esto es muy relevante ya que todos los estudios transcriptómicos realizados hasta hace muy poco se han llevado a cabo en condiciones de mayor o menor cantidad de flavonoides totales y no distinguiendo entre ellos. (Wang et al., 2020; Schulz et al., 2021).

En relación a los resultados del RNAseq de testa realizado en este trabajo, se obtuvieron 201 genes con mayor expresión en el mutante *tt3tt7cr* y 464 genes con menor expresión en el mutante. Tras el análisis con TF2N de los genes con mayor expresión en la testa del mutante, el único FT con PD mayor a cero obtenido fue WRKY33, que se encuentra casi 42 veces más expresado en la testa del mutante que en la del control. No obstante, también hemos podido comprobar la presencia de otros WRKY en la lista de genes con una mayor expresión en la testa del mutante, como es el caso de WRKY48 (17 veces más), WRKY28 (72 veces más) y WRKY8 (34 veces más). El factor de transcripción WRKY 33 se ha planteado como un agente importante en la longevidad de las semillas, al aparecer altamente expresados y formar parte de un módulo de

co-expresión común en *Arabidopsis* y *Medicago* (Righetti et al., 2015). Pero también se ha descrito que algunos WRKY (WRKY12, WRKY23) actúan reprimiendo la síntesis de lignina en *Arabidopsis thaliana* inhibiendo los enzimas PAL (Phenylalanine ammonia lyase) y C4H (Cinnamate 4-Hydroxylase) (Zhang et al., 2021). Como se muestra en la **Figura 29**, estas enzimas se requieren para la biosíntesis de p-Coumaroil-CoA, precursor de las rutas de biosíntesis de flavonoides, lignina y suberina. Por otra parte, se ha determinado la función de WRKY23 como regulador positivo de *TT7* (Zhang et al., 2021), favoreciendo la acumulación de dihidroquercetina. Por lo tanto, es posible que WRKY33 u otros de los identificados en este trabajo como más expresados en *tt3tt7cr*, tengan funciones similares a las descritas para WRKY23 (WRKY12), que se induzcan al percibir la ausencia de quercetina del mutante *tt3tt7cr* y, como consecuencia, intente favorecer la formación de este compuesto activando *tt7* a expensas de la represión de la biosíntesis de suberina, así como a la lignina. Las categorías sobrerrepresentadas en la lista de genes más expresados en el mutante *tt3tt7cr* tienen que ver con la respuesta a estrés, principalmente biótico. Probablemente esto se debe a la implicación de muchos WRKY en procesos de defensa (Righetti et al., 2015), además de la función comentada anteriormente.

Para el caso de los FT que regulan los genes con menor expresión en la testa de *tt3tt7cr*, la gran mayoría han sido FT con dominio MYB, entre ellos MYB3, MYB58 y MYB63. Algunos estudios previos han demostrado que estos factores de transcripción son imprescindibles en la regulación de la ruta de biosíntesis de flavonoides (Borevitz et al., 2000; Deluc et al., 2006), sobre todo aquellos que pertenecen al subgrupo 4 de los factores de transcripción R2R3-MYB que conservan el motivo de represión EAR (Zhou et al., 2017), de entre los cuales MYB3, MYB58 y MYB63 han demostrado estar implicados en la biosíntesis de antocianinas y lignina (Zhou et al., 2009; Kim et al., 2022). Tal como se muestra en la **Tabla 6**, todos ellos actúan aguas arriba de la ruta de formación de los compuestos fenólicos regulando de forma común la 4CL y la C4H, enzimas necesarias para la formación de p-Coumaroil-CoA, precursor de las rutas de biosíntesis de flavonoides, pero también actúan en los pasos finales de la ruta regulando la HCT que es crucial para la formación de lignina y suberina (**Figura 29**). En este sentido, trabajos previos muestran como la sobreexpresión de factores de transcripción de tipo MYB pueden aumentar la expresión de genes de biosíntesis de fenilpropanoides (como es el caso de MYB75 y 90) favoreciendo la formación de lignina y flavonoides al mismo tiempo (MYB88) afectando de forma indirecta a la biosíntesis de lignina (Borevitz et al., 2000; Deluc et al., 2006; Zhang et al., 2021). Nuestro análisis en TF2N ha identificado también la enzima CCoAOMT como diana común de los factores de transcripción MYB3, 58 y 63. Esta enzima interviene en la formación de lignina G y S, ya que su ausencia impide la formación de este compuesto (Zhou et al., 2009; Zhang et al., 2021; Kim et al., 2022) (**Figura 29**). Posiblemente, el exceso en la acumulación de kaempferoles propio del mutante *tt3tt7cr*, es percibido como tóxico para la célula, que responde inhibiendo los factores de tipo MYB, bloqueando la síntesis de p-Coumaroil-CoA y por tanto la síntesis de nuevos flavonoides, pero también de lignina y suberina, es decir, se produciría una represión de la ruta en sus pasos iniciales por retroalimentación a causa de los kaempferoles acumulados.

Por lo tanto, actuando de forma contrapuesta en la testa de la semilla del mutante *tt3tt7cr*, los factores de transcripción tipo WRKY (más expresados) y MYB (menor expresión) son,

posiblemente, los que provocan la disminución en la capa de suberina observada en el mutante *tt3tt7cr*.

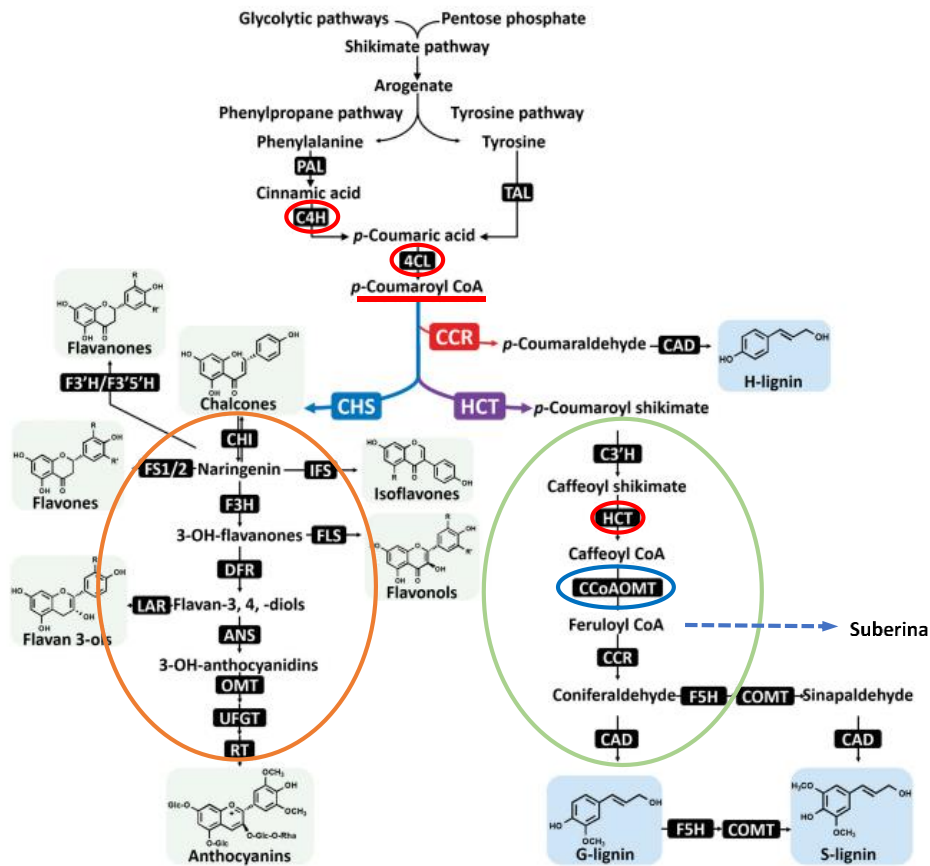


Figura 29. Esquema de la síntesis de fenilpropanoides. La p-Coumaril CoA se encuentra subrayada en rojo; los círculos rojos marcan la posición de las enzimas C4H y 4CL, que se sitúan aguas arriba de la ruta, y HCT que se encuentra los pasos previos a la síntesis de suberina y lignina; el círculo naranja señala la ruta de síntesis de flavonoides y el círculo verde la ruta de síntesis de suberina y lignina. (Modificado a partir de Zhang et al., 2021).

Al realizar el análisis de la expresión genética en el embrión, comprobamos que la mayoría defactores de transcripción implicados en la regulación de los genes con mayor expresión en el mutante, estaban implicados en la respuesta a ácido abscísico (ABF1,3,4, ABI5). Se sabe que el ácido abscísico es fundamental durante la maduración de la semilla y está implicado en la adquisición de la tolerancia a la desecación. De hecho, el mutante *abi3* de *Arabidopsis* presenta menor tolerancia a la desecación y pierde rápidamente su viabilidad (Sano et al., 2016; Clercx et al., 2004a). Asimismo, ABI5 ha sido identificado como un componente esencial para la regulación de la maduración tardía de semillas de leguminosas, determinando su longevidad, pérdida de clorofila y acumulación de oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Zinsmeister et al., 2016). Por lo tanto, la inducción de estos factores de transcripción podría ser una forma de respuesta del embrión del mutante para tratar de compensar los drásticos efectos de su testa (que reducen la longevidad de la semilla). Tal vez, expresando estos factores de transcripción trataría de adelantar su maduración y/o reforzarse para maximizar su viabilidad. Por otro lado, cuando estudiamos las 139 dianas comunes a los factores de transcripción identificados con el TF2N, observamos que la mayoría codificaban para proteínas con dominio NAC y uno para *TT8*.

En los resultados de factores más expresados en testa, apareció la proteína ANAC087 la cual interactuaba con C4H, 4CL y HCT que, como hemos visto, son importantes en la ruta de síntesis de flavonoides.

Entre las funciones moleculares que se veían afectadas en los genes con menor expresión en el embrión del mutante *tt3tt7cr*, se incluían la actividad de los fotosistemas en los cloroplastos y la de dos factores de transcripción involucrados en procesos fotosintéticos (PIF5 y PAP3). Al analizar las dianas comunes a los factores de transcripción identificados, comprobamos que actuaban en conjunto sobre ocho genes, dos de los cuales (*PIN3* y *AUX1*) codificaban para proteínas de transporte de auxinas. Este hecho correlaciona con los resultados de otros trabajos donde se ha visto que el embrión de *tt7* acumula K-3-R-7-R (Niñoles et al., 2022), un flavonoide que actúa como inhibidor del transporte polar de auxinas (Yin et al., 2014). De hecho, en el laboratorio tenemos resultados preliminares que muestran un defecto en el transporte de auxinas en el embrión del mutante *tt7* (Niñoles et al, no publicado).

Por tanto, en base a estos resultados, podemos hipotetizar que en el embrión se activan procesos biológicos de respuesta a estreses bióticos y abióticos, posiblemente como consecuencia de lo que está sucediendo en la testa en cuanto a la deficiencia de la formación de la capa de suberina, lo cual parece lógico si la barrera externa de la semilla se ve mermada. Además, se activan las funciones moleculares de transferencia de O-glucósidos de la quercetina, posiblemente para evitar la acumulación de kaempferol aglycona, cuya toxicidad haría inviable el desarrollo de los embriones (Yin et al., 2012; Yin et al., 2014). Esto posiblemente explica por qué los embriones *tt7* son viables y no parecen tener ningún defecto que impida su desarrollo, al menos macroscópicamente (Niñoles et al., 2023).

Así pues, este estudio analizando la expresión génica de la testa y el embrión del mutante *tt3tt7cr* ha sido de gran utilidad para comprender los procesos que se dan, por en cada uno de los tejidos. Asimismo, es un punto de partida para la futura comprobación experimental de todas las hipótesis planteadas.

# **CONCLUSIONES**



### Con relación al objetivo parcial 1 (componente ambiental)

Como tendencia general, cuando las plantas están expuestas a una temperatura de 27°C y una radiación de 300  $\mu\text{moles fotonos}/\text{sm}^2$ , sus semillas muestran un incremento en la longevidad respecto a aquellas cuyas plantas han sido crecidas a 22°C y menor radiación. Pese a ello, las diferentes accesiones muestran comportamientos específicos para las distintas condiciones de cultivo.

Como tendencia general, cuando las plantas están expuestas a una temperatura de 27°C producen semillas con menor dormancia que si las plantas han sido crecidas a 22°C y, de modo similar a la longevidad, aparecen respuestas dependientes de cada accesión. El efecto de la intensidad lumínica sobre la dormancia es muy dependiente de la accesión y no se observa una tendencia clara.

El análisis de la correlación entre los datos de dormancia y longevidad en plantas crecidas en diferentes condiciones ambientales indica que existe una tendencia hacia una correlación negativa (más dormancia, menos longevidad, tal como se había descrito en **Nguyen et al., 2012**). Sin embargo, esta anticorrelación ha resultado ser dependiente de las condiciones ambientales, observándose una mayor anticorrelación en plantas crecidas a 22°C y bajo alta intensidad lumínica. Esta anticorrelación también es muy dependiente de genotipo, no ocurriendo por igual en todas las accesiones.

De modo cualitativo, las semillas provenientes de plantas crecidas de 27°C presentan mayor permeabilidad que las crecidas a 22°C. Esta tendencia se aprecia en todas las accesiones. La alta intensidad lumínica no parece afectar a la permeabilidad de las semillas.

A pesar de presentar una mayor permeabilidad, las semillas de plantas crecidas a 27°C presentan mayor longevidad. Esto sugiere que existen mecanismos, posiblemente en el embrión, que confieren a estas semillas tan permeables una longevidad extendida.

### Con relación al objetivo parcial 2 (componente genético)

En cuanto al análisis transcriptómico separado de testa y embrión en un mutante *tt3tt7cr*, el cual acumula distintos compuestos de kaempferol en cada compartimento, indica que cada compuesto específico está alterando la expresión de diferentes grupos de genes.

El análisis de genes de testa cuya expresión varía en un mutante *tt3tt7cr*, caracterizado por presentar una longevidad de semilla reducida causado por un defecto en la cubierta, sugiere que el compuesto que este mutante acumula en testa (K-3-R) es responsable de la inhibición de las rutas de fenilpropanoides en los primeros pasos de la misma, posiblemente a través de la inducción de factores de transcripción de tipo WRKY y la represión de factores de transcripción tipo MYB. Esta represión afecta a las tres rutas metabólicas que provienen de estos precursores: flavonoides, lignina y suberina.

El análisis de genes de embrión cuya expresión se ve reducida en un mutante *tt3tt7cr* sugiere que los compuestos acumulados en el embrión de este mutante, como el K-3-R-7R, podría afectar al transporte de auxinas, tal como había sido descrito anteriormente.

# **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Allorent, G.; Osorio, S.; Vu, J. L.; Falconet, D.; Jouhet, J.; Kuntz, M.; Fernie, A. R.; Lerbs-Mache, S.; Macherel, D.; Courtois, F. & Finazzi, G. (2015)** Adjustments of embryonic photosynthetic activity modulate seed fitness in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*, 205(2), 707–719. <https://doi.org/10.1111/nph.13044>
2. **Bailly, C. (2004)** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14(2), 93–107. <https://doi.org/10.1079/ssr2004159>
3. **Bailly, C.; El-Maarouf-Bouteau, H. & Corbineau, F. (2008)** From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
4. **Baud, S.; Dubreucq, B.; Miquel, M.; Rochat, C. & Lepiniec, L. (2008)** Storage Reserve Accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and Developmental Control of Seed Filling. *The Arabidopsis Book*, 6, e0113. <https://doi.org/10.1199/tab.0113>
5. **Bekker, R.M.; Bakker, J.P.; Ozinga, W.A. & Thompson, K. (2003)** Seed traits: essential for understanding seed longevity. *Asp Appl Biol* 69: 1–9.
6. **Bentsink, L.; Jowett, J.; Hanhart, C.J. & Koornneef, M. (2006)** Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17042–17047
7. **Berger, F.; Grini, P. E. & Schnittger, A. (2006)** Endosperm: an integrator of seed growth and development. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.015>
8. **Biedermann, S.; Mooney, S. & Hellmann, H. (2011)** Recognition and repair pathways of damaged DNA in higher plants. *Sel Top DNA Repair* 201–236.
9. **Borevitz, J. O.; Xia, Y.; Blount, J.; Dixon, R. A. & Lamb, C. (2000)** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant cell*, 12(12), 2383–2394. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.12.2383>
10. **Bray, C.M. & West, C.E. (2005)** DNA repair mechanisms in plants: Crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol* 168: 511–528.
11. **Bueso, E.; Muñoz-Bertomeu, J.; Campos, F.; Brunaud, V.; Martínez, L.; Sayas, E.; ... Serrano, R. (2014)** ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiology*, 164(2), 999–1010. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232223>
12. **Bueso, E.; Muñoz-Bertomeu, J.; Campos, F.; Martínez, C.; Tello, C.; Martínez-Almonacid, I.; ... Serrano, R. (2016)** *Arabidopsis* COGWHEEL1 links light perception and gibberellins with seed tolerance to deterioration. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 87(6), 583–596. <https://doi.org/10.1111/tpj.13220>
13. **Buitink, J.; Hemminga, M.A. & Hoekstra, F.A. (2000)** Is There a Role for Oligosaccharides in Seed Longevity? An Assessment of Intracellular Glass Stability. *Plant Physiol* 122: 1217–1224.
14. **Buitink, J. & Leprince, O. (2008)** Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus - Biol* 331: 788–795.
15. **Canuto, R. A. (Ed.). (2012)**. Dehydrogenases. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/2903>
16. **Casal, J. J. & Balasubramanian, S. (2019)** Thermomorphogenesis. *Annual review of plant biology*, 70, 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095919>

17. **Chen, H.; Ahmad, M.; Rim, Y.; Lucas, W. J. & Kim, J. Y. (2013)** Evolutionary and molecular analysis of Dof transcription factors identified a conserved motif for intercellular protein trafficking. *New Phytologist*, 198(4), 1250–1260. <https://doi.org/10.1111/nph.12223>
18. **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*.
19. **Chen, X.; Wang, D.; Liu, C.; Wang, M.; Wang, T.; Zhao, Q. & Yu, J. (2012)** Maize transcription factor Zmdof1 involves in the regulation of Zm401 gene. *Plant Growth Regul*.
20. **Clerkx, E.J.M.; Blankestijn-De Vries, H.; Ruys, G.J.; Groot, S.P.C. & Koornneef, M. (2004a)** Genetic differences in seed longevity of various Arabidopsis mutants. *Physiol Plant* 121: 448–461
21. **Clerkx, E.J.; Vries, H.B.; Ruys, G.J.; Groot, S.P. & Koornneef, M. (2003)** Characterization of green seed, an enhancer of *abi3-1* in Arabidopsis that affects seed longevity. *Plant Physiol* 132: 1077–1084
22. **Contreras, S.; Bennett, M. A.; Metzger, J. D. & Tay, D. (2008)** Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. *HortScience* 43, 845-852. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.3.845>
23. **Czechowski, T.; Stitt, M.; Altmann, T.; Udvardi, M. K. & Scheible, W. R. (2005)** Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant physiology*, 139(1), 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
24. **Davies, M. J. (2005)**. The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1703(2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.08.007>
25. **Debeaujon, I. (2003)** Proanthocyanidin-Accumulating Cells in Arabidopsis Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *PLANT CELL ONLINE*.
26. **Debeaujon, I.; Léon-Kloosterziel, K. M. & Koornneef, M. (2000)** Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122(2), 403–413. <https://doi.org/10.1104/pp.122.2.403>
27. **Deluc, L.; Barrieu, F.; Marchive, C.; Lauvergeat, V.; Decendit, A.; Richard, T.; Carde, J. P.; Mérillon, J. M. & Hamdi, S. (2006)** Characterization of a grapevine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenylpropanoid pathway. *Plant physiology*, 140(2), 499–511. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067231>
28. **Ellis, R. & Yadav, G. (2016)** Effect of simulated rainfall during wheat seed development and maturation on subsequent seed longevity is reversible. *Seed Science Research*, 26(1), 67-76. doi:10.1017/S0960258515000392
29. **Goldberg, R. B.; Paiva, G. De & Yadegari, R. (2012)** Plant Embryogenesis: Zygote to Seed.
30. **Groot, S. P. C.; Surki, A. A.; De Vos, R. C. H. & Kodde, J. (2012)** Seed storage at elevated partial pressure of oxygen, a fast method for analysing seed ageing under dry conditions. *Annals of Botany*, 110(6), 1149–1159. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs198>
31. **Guyon, V. N.; Astwood, J. D.; Garner, E. C.; Dunker, A. K. & Taylor, L. P. (2000)** Isolation and characterization of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant physiology*, 123(2), 699–710. <https://doi.org/10.1104/pp.123.2.699>

32. Haughn, G. & Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, 10(10), 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.005>
33. He, H.; de Souza Vidigal, D.; Snoek, L. B.; Schnabel, S.; Nijveen, H.; Hilhorst, H. & Bentsink, L. (2014) Interaction between parental environment and genotype affects plant and seed performance in Arabidopsis. *Journal of experimental botany*, 65(22), 6603–6615. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru378>
34. He, H.; Willems, L. A.; Batushansky, A.; Fait, A.; Hanson, J.; Nijveen, H.; Hilhorst, H. W.M. & Bentsink, L. (2016) Effects of parental temperature and nitrate on seed performance are reflected by partly overlapping genetic and metabolic pathways. *Plant Cell Physiol.* 57, 473-487. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv207>
35. Heschel, M. S.; Selby, J.; Butler, C.; Whitelam, G. C.; Sharrock, R. A. & Donohue, K. (2007) A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *The New phytologist*, 174(4), 735–741. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02044.x>
36. Holdsworth, M. J.; Bentsink, L. & Soppe, W. J. J. (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179(1), 33–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x>
37. 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.*
38. Hundertmark, M.; Buitink, J.; Leprince, O. & Hinch, D. K. (2011) The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in Arabidopsis thaliana. *Seed Science Research*, 21(3), 165–173. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000079>
39. Hunt, L.; Holdsworth, M. J. & Gray, J. E. (2007) Nicotinamidase activity is important for germination. *Plant Journal*, 51(3), 341–351. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03151.x>
40. ISTA (2018) International Rules for Seed Testing. In International Rules for Seed Testing. Bassersdorf.
41. Job, C.; Loïc, R.; Yoann, L.; Maya, B. & Dominique, J. (2005) Patterns of P rotein Oxidation in A rabidopsis Seeds and During Germination. *Plant Physiology*, 138(2), 790–802. <https://doi.org/10.1104/pp.105.062778>
42. Kaur, H.; Petla, B.; Kamble, N.; Singh, A.; Rao, V.; Salvi, P.; Ghosh, S. & Majee, M. (2015) Differentially expressed seed aging responsive heat shock protein OsHSP18.2 implicates in seed vigor, longevity and improves germination and seedling establishment under abiotic stress. *Front. Plant Sci.*, 14 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00713>
43. Kim, D.; Jeon, S. J.; Yanders, S.; Park, S. C.; Kim, H. S. & Kim, S. (2022) MYB3 plays an important role in lignin and anthocyanin biosynthesis under salt stress condition in Arabidopsis. *Plant cell reports*, 41(7), 1549–1560. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02878-7>
44. Kranner, I.; Birtić, S.; Anderson, K.M. & Pritchard, H.W. (2006) Glutathione half-cell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med.*
45. Lee, Y. P.; Baek, K. H.; Lee, H. S.; Kwak, S. S.; Bang, J. W. & 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. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2499–2506. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq085>
46. Lepiniec, L.; Devic, M.; Roscoe, T. J.; Bouyer, D.; Zhou, D. X.; Boulard, C.; Baud, S. & Dubreucq, B. (2018) Molecular and epigenetic regulations and functions of the LAFL transcriptional regulators that control seed development. *Plant reproduction*, 31(3), 291–307. <https://doi.org/10.1007/s00497-018-0337-2>
  47. Leprince, O.; Pellizzaro, A.; Berriri, S. & Buitink, J. (2017) Late seed maturation: drying without dying. *Journal of experimental botany*, 68(4), 827–841. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw363>
  48. Li, F.; Mei, F.; Zhang, Y.; Li, S.; Kang, Z. & Mao, H. (2020) Genome-wide analysis of the AREB/ABF gene lineage in land plants and functional analysis of TaABF3 in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 20(1), 558. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02783-9>
  49. Li, Z.; Wakao, S.; Fischer, B. B. & Niyogi, K. K. (2009) Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*, 60, 239–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103844>
  50. Li, Q.; Wang, B.; Xu, Y. & Zhu, Y. (2007) Systematic Studies of 12S Seed Storage Protein Accumulation and Degradation Patterns during Arabidopsis Seed Maturation and Early Seedling Germination Stages, 40(3), 373–381.
  51. Li, Z.; Wu, S.; Chen, J.; Wang, X.; Gao, J.; Ren, G. & Kuai, B. (2017) NYEs/SGRs-mediated chlorophyll degradation is critical for detoxification during seed maturation in Arabidopsis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 92(4), 650–661. <https://doi.org/10.1111/tpj.13710>
  52. Loubéry, S.; De Giorgi, J.; Utz-Pugin, A.; Demonsais, L. & Lopez-Molina, L. (2018) A Maternally Deposited Endosperm Cuticle Contributes to the Physiological Defects of transparent testa Seeds. *Plant Physiology*. 177:1218-1233. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00416>
  53. MacGregor, D. R.; Kendall, S. L.; Florance, H.; Fedi, F.; Moore, K.; Paszkiewicz, K.; Smirnoff, N. & Penfield, S. (2015) Seed production temperature regulation of primary dormancy occurs through control of seed coat phenylpropanoid metabolism. *The New phytologist*, 205(2), 642–652. <https://doi.org/10.1111/nph.13090>
  54. Martínez-Lüscher, J.; Torres, N.; Hilbert, G.; Richard, T.; Sánchez-Díaz, M.; Delrot, S.; Aguirreolea, J.; Pascual, I. & Gomès, E. (2014) Ultraviolet-B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries. *Phytochemistry*, 102, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.014>
  55. Møller, I. M.; Jensen, P. E. & Hansson, A. (2007) Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
  56. Mondoni, A.; Probert, R. J.; Rossi, G.; Vegini, E. & Hay, F. R. (2011) Seeds of alpine plants are short lived: implications for long-term conservation. *Annals of botany*, 107(1), 171–179. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq222>
  57. Mudgett, M. B.; Lowenson, J. D. & Clarke, S. (1997) Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in plants: Phylogenetic distribution and the accumulation of substrate proteins in aged barley seeds. *Plant Physiology*, 115(4), 1481–1489. <https://doi.org/10.1104/pp.115.4.1481>

58. Nagel, M.; Kranner, I.; Neumann, K.; Rolletschek, H.; Seal, C. E.; Colville, L.; Fernández-Marín, B. & Börner, A. (2015) Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant, cell & environment*, 38(6), 1011–1022. <https://doi.org/10.1111/pce.12474>
59. Nagel, M.; Kodde, J.; Pistrick, S.; Mascher, M.; Börner, A. & 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.
60. Niñoles, R.; Arjona, P.; Hashim, A.; Bueso, E.; Serrano, R.; Molina, I. & Gadea, J. (2023) Kaempferol over-accumulation in the flavonoid 3' hydroxylase tt7 mutant disrupts seed coat outer integument differentiation and compromises seed longevity bioRxiv 2022.03.08.483417; <https://doi.org/10.1101/2022.03.08.483417>
61. Niñoles, R.; Planes, D.; Arjona, P.; Ruiz-Pastor, C.; Chazarra, R., Renard, J., Bueso, E.; Forment, J.; Serrano, R.; Kranner, I.; Roach, T. & Gadea, J. (2022) Comparative analysis of wild-type accessions reveals novel determinants of Arabidopsis seed longevity. *Plant, cell & environment*, 45(9), 2708–2728. <https://doi.org/10.1111/pce.14374>
62. Nguyen, T. P.; Bentsink, L. (2015) Seed Dormancy, Longevity and Their Adaptation. Book Editor(s): Roosa A. E. Laitinen <https://doi.org/10.1002/9781118860526.ch3>
63. Nguyen, T. P.; Cueff, G.; Hegedus, D. D.; Rajjou, L. & Bentsink, L. (2015) A role for seed storage proteins in Arabidopsis seed longevity. *Journal of Experimental Botany*, 66(20), 6399–6413. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv348>
64. Nguyen, T. P.; Keizer, P.; van Eeuwijk, F.; Smeekens, S. & Bentsink, L. (2012) Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in Arabidopsis. *Plant physiology*, 160(4), 2083–2092. <https://doi.org/10.1104/pp.112.206649>
65. 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.
66. Oñate-Sánchez, L. & Vicente-Carbajosa, J. (2008) DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. *BMC research notes*, 1, 93. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-1-93>
67. Ooms, J.J.J.; Léon-Kloosterziel, K.M.; Bartels, D.; Koornneef, M. & Karsen, C.M. (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of Arabidopsis thaliana: a comparative study using abscisic acid-insensitive abi3 mutants. *Plant Physiol* 102: 1185–1191
68. Penfield, S. & MacGregor, D. R. (2017) Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of experimental botany*, 68(4), 819–825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw436>
69. Peris, C. I. L.; Rademacher, E. H. & Weijers, D. (2010) *Green beginnings - pattern formation in the early plant embryo*. *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 91). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91001-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91001-6)
70. Pita Villamil, J.M. (2001) *Bancos de semillas*. S.l.: s.n. ISBN 84-491-0506-4.
71. Pollard, M.; Beisson, F.; Li, Y. & Ohlrogge, J.B. (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* .
72. Pourcel, L.; Routaboul, JM.; Kerhoas, L.; Caboche, M.; Lepiniec, L. & Debeaujon, I. (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative



- polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell*. 17(11):2966-2980. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035154>
73. Prieto-Dapena, P.; Castaño, R.; Almoguera, C. & Jordano, J. (2006) Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiology*, 142(3), 1102–1112. <https://doi.org/10.1104/pp.106.087817>
  74. Probert, R. J.; Daws, M. I. & Hay, F. R. (2009) Ecological correlates of ex situ seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of botany*, 104(1), 57–69. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp082>
  75. Rajjou, L. & Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 796–805. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.021>
  76. Rajjou, L.; Lovigny, Y.; Groot, S. P. C.; Belghazi, M.; Job, C. & Job, D. (2008) Proteome-wide characterization of seed aging in Arabidopsis: A comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, 148(1), 620–641. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123141>
  77. Ratajczak, E.; Małecka, A.; Bagniewska-Zadworna, A. & 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.
  78. Raviv, B.; Aghajanyan, L.; Granot, G.; Makover, V.; Frenkel, O.; Gutterman, Y. & Grafi, G. (2017) The dead seed coat functions as a long-term storage for active hydrolytic enzymes. *PLoS One* 12: 1–21.
  79. Rehmani, M. S.; Aziz, U.; Xian, B. & Shu, K. (2022) Seed Dormancy and Longevity: A Mutual Dependence or a Trade-Off? *Plant & cell physiology*, 63(8), 1029–1037. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac069>
  80. Renard, J.; Niñoles, R.; Martínez-Almonacid, I.; Gayubas, B.; Mateos-Fernández, R.; Bissoli, G.; Bueso, E.; Serrano, R. & Gadea, J. (2020). Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. *Plant, cell & environment*, 43(10), 2523–2539. <https://doi.org/10.1111/pce.13822>
  81. Righetti, K.; Vu, J. L.; Pelletier, S.; Vu, B. L.; Glaab, E.; Lalanne, D.; Pasha, A.; Patel, R. V.; Provart, N. J.; Verdier, J.; Leprince, O. & Buitink, J. (2015) Inference of Longevity-Related Genes from a Robust Coexpression Network of Seed Maturation Identifies Regulators Linking Seed Storability to Biotic Defense-Related Pathways. *The Plant cell*, 27(10), 2692–2708. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00632>
  82. Sano, N.; Rajjou, L.; North, H. M.; Debeaujon, I.; Marion-Poll, A. & Seo, M. (2016) Staying alive: Molecular aspects of seed longevity. *Plant and Cell Physiology*, 57(4), 660–674. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv186>
  83. Sattler, S.E.; Gilliland, L.U.; Magallanes-lundback, M.; Pollard, M. & Dellapenna, D. (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16(6), 1419–1432. <https://doi.org/10.1105/tpc.021360>
  84. Sattler, S.E.; Gilliland, L.U.; Magallanes-lundback, M.; Pollard, M. & Dellapenna, D. (2013) Vitamin E Is Essential for Seed Longevity and for Preventing Lipid Peroxidation during Germination Dean DellaPenna. *Plant Cell* 16: 1419–1432



85. Schulz, E.; Tohge, T.; Winkler, J. B.; Albert, A.; Sch Ffner, A. R.; Fernie, A. R.; Zuther, E. & Hinch, D. K. (2021) Natural Variation among Arabidopsis Accessions in the Regulation of Flavonoid Metabolism and Stress Gene Expression by Combined UV Radiation and Cold. *Plant & cell physiology*, 62(3), 502–514. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab013>
86. Smolikova, G.; Kreslavski, V.; Shirolazova, O.; Bilova, T.; Sharova, E.; Frolov A. & Medvedev, S. (2018) Photochemical activity changes accompanying the embryogenesis of pea (*Pisum sativum*) with yellow and green cotyledons. *Functional Plant Biology* 45, 228-235. <https://doi.org/10.1071/FP16379>
87. Stevenson, D. E. & Hurst, R. D. (2007). Polyphenolic phytochemicals - Just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(22), 2900–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1>
88. Sugliani, M.; Rajjou, L.; Clercx, E.J.M.; Koornneef, M. & Soppe, W.J.J. (2009) Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants abscisic acid insensitive3-5 (*abi3-5*) and leafy cotyledon1-3 (*lec1-3*). *New Phytol* 184: 898–908
89. Teixeira, F.; Menezes-Benavente, L.; Galvão, V. & Margis-Pinheiro, M. (2005) Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetics and Molecular Biology*, 28:529-538 <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000400007>.
90. Tejedor-Cano, J.; Prieto-Dapena, P.; Almoguera, C.; Carranco, R.; Hiratsu, K.; Ohme-Takagi, M. & Jordano, J. (2010) Loss of function of the HSF9 seed longevity program. *Plant, Cell and Environment*, 33(8), 1408–1417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02159.x>
91. Treutter, D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: A review. *Environ Chem Lett* .
92. 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.
93. Verma, P.; Kaur, H.; Petla, B.P.; Rao, V.; Saxena, S.C. & 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*.
94. Wang, X. C.; Wu, J.; Guan, M. L.; Zhao, C. H.; Geng, P. & Zhao, Q. (2020) Arabidopsis MYB4 plays dual roles in flavonoid biosynthesis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 101(3), 637–652. <https://doi.org/10.1111/tpj.14570>
95. Waterworth, W.M.; Masnavi, G.; Bhardwaj, R.M.; Jiang, Q.; Bray, C.M. & West, C.E. (2010) A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* 63: 848–860.
96. Weissbach, H.; Resnick, L. & Brot, N. (2005) Methionine sulfoxide reductases: History and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* .
97. Western, T.L.; Skinner, D.J. & Haughn, G.W. (2000) Differentiation of Mucilage Secretory Cells of the Arabidopsis Seed Coat. *Plant Physiol*.

98. Wilson, D.O.J. & McDonald, M.B.J. (1986) Lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci Technol*.
99. Windsor, J. B.; Symonds, V. V.; Mendenhall, J. & Lloyd, A. M. (2000) Arabidopsis seed coat development: Morphological differentiation of the outer integument. *Plant Journal*, 22(6), 483–493. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00756.x>
100. Xi, D.M.; Liu, W.S.; Yang, G.D.; Wu, C.A. & 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.
101. Yin, R.; Han, K.; Heller, W.; Albert, A.; Dobrev, P. I.; Zařimalová, E. & Schöffner, A. R. (2014) Kaempferol 3-O-rhamnoside-7-O-rhamnoside is an endogenous flavonol inhibitor of polar auxin transport in Arabidopsis shoots. *The New phytologist*, 201(2), 466–475. <https://doi.org/10.1111/nph.12558>
102. Yin, R.; Messner, B.; Faus-Kessler, T.; Hoffmann, T.; Schwab, W.; Hajirezaei, M. R.; von Saint Paul, V.; Heller, W. & Schöffner, A. R. (2012) Feedback inhibition of the general phenylpropanoid and flavonol biosynthetic pathways upon a compromised flavonol-3-O-glycosylation. *Journal of experimental botany*, 63(7), 2465–2478. <https://doi.org/10.1093/jxb/err416>
103. Zhang, S.; Yang, J.; Li, H.; Chiang, V.L. & Fu, Y. (2021) Cooperative Regulation of Flavonoid and Lignin Biosynthesis in Plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, DOI:10.1080/07352689.2021.1898083
104. Zhou, Y.; Chen, H.; Chu, P. et al. (2012) NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep* 31, 379–389 <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1173-0>
105. Zhou, J.; Lee, C.; Zhong, R. & Ye, Z. H. (2009) MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis. *The Plant cell*, 21(1), 248–266. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063321>
106. Zhou, M.; Zhang, K.; Sun, Z.; Yan, M.; Chen, C.; Zhang, X.; Tang, Y. & Wu, Y. (2017) LNK1 and LNK2 Corepressors Interact with the MYB3 Transcription Factor in Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant physiology*, 174(3), 1348–1358. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00160>
107. Zhu, C.; Gore, M.; Buckler, E.S. & Yu, J. (2008) Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *Plant Genome J*.
108. Zinsmeister, J.; Lalanne, D.; Terrasson, E.; Chatelain, E.; Vandecasteele, C.; Ly Vu, B.; Dubois-Laurent, C.; et al. (2016) ABI5 Is a Regulator of Seed Maturation and Longevity in Legumes, *The Plant Cell*, Volume 28, Issue 11, Pages 2735–2754, <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00470>
109. Zinsmeister, J.; Leprince, O.; Buitink, J. (2020) Molecular and environmental factors regulating seed longevity. *Biochemical Journal*, Vol. 447, issue 2, p. 305–323. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190165>

**ANEXOS**

## Anexo I. Extracción de semillas de las silicuas de *Arabidopsis thaliana*

Este trabajo se realiza con la ayuda de la lupa (departamento de microscopía del IBMCP), gracias a la cual podremos ser capaces de recolectar las semillas de todas las silicuas y, posteriormente, poder separar los embriones de las testas. Para este objetivo se utilizará un mutante de *Arabidopsis thaliana*, llamado tt3tt7, y una accesión tipo silvestre llamada *Arabidopsis wassilewskija* (WS). Como material de partida se cogieron un total de 75 sílicuas de 14 DAP (días después de la polinización), tanto de WS como de mutantes tt3tt7 de sílicuas de 8 dpp, realizando un total de 3 réplicas biológicas. Durante todo el proceso es necesario el uso de guantes debido a que el objetivo último es realizar una extracción de RNA, siguiendo el protocolo del Anexo II.

### a) Materiales:

- Una caja grande (30x15cm) y una caja pequeña (10x15cm) de poliestireno para trabajar con el hielo.
- Una lechera pequeña y N<sub>2</sub> líquido para conservar las muestras recogidas.
- Cuatro tubos Eppendorff de 1'5µl para, dos para cada accesión, para guardar la testa y los embriones por separado.
- Buffer de extracción de RNA para evitar la degradación de las muestras.
- Pipeta de 100-200 µl.
- Puntas amarillas de 200 µl.
- Portaobjetos para colocar las silicuas, extraer las semillas y poder separar testa y embrión.
- Cinta adhesiva (celo) para evitar que las silicuas se muevan en el portaobjetos.
- Cuchilla de bisturí para poder abrir las silicuas.
- Cubreobjetos para poder presionar las semillas y separar el embrión de la testa.
- Pinzas de polinizar de punta recta para coger las semillas de la silicua y, posteriormente, poder separar embriones y testa.

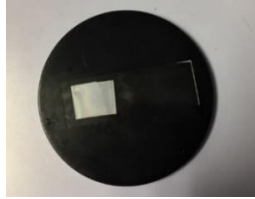


Figura 1. Materiales, herramientas y utensilios de partida para la separación y la correcta conservación de las testas y los embriones

### b) Procedimiento:

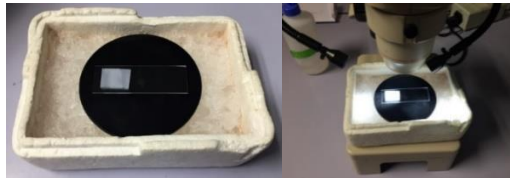
1. En primer lugar, nos hemos de asegurar que todo el material está limpio y desinfectado, preferiblemente esterilizado si esto es posible.
2. En segundo lugar, y con la ayuda de la lechera, se cogerá N<sub>2</sub> líquido para poder enfriar los tubos Eppendorff y mantenerlos a baja temperatura hasta introducir las muestras.

3. En tercer lugar, se llenarán las cajas de poliestireno con hielo. La caja grande nos servirá de reservorio y como auxiliar para poder trabajar con los tubos Eppendorff, sin que estos pierdan su temperatura en exceso. Sobre la caja pequeña trabajaremos en todo momento, tanto para abrir las silicuas y coger las semillas, como durante la separación del embrión y la testa.
4. Una vez en la lupa, se coge la platina por el lado oscuro para que sirva de soporte para el portaobjetos, sobre el cual se pondrá la cinta adhesiva en uno de los extremos y, sobre ésta, se irán colocando las silicuas (normalmente un total de 10 marcadas con unos 12 días de anterioridad) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Detalle del portaobjetos, con la cinta adhesiva, colocado en el reverso de la platina de la lupa.

5. En el momento en que el portaobjetos se encuentre sobre la platina, y las silicuas estén sobre la cinta adhesiva, se colocará el conjunto sobre el hielo contenido en la caja de poliestireno pequeña. De este modo se trabajará en todo momento en frío. Es aconsejable antes de colocar el portaobjetos sobre la platina que esta se acomode en el hielo, para que coja forma y así favorecer que el buffer de extracción no se extienda por el cristal cuando se ponga en el portaobjetos. A partir de aquí se trabaja mientras miramos por los oculares de la lupa.



**Figura 3.** Detalle de la platina de la lupa sobre una lámina de hielo para mantener las superficies frías durante el proceso de separación testa/embrión.

6. A continuación, y con la ayuda de la hoja de bisturí, se cortan los extremos superiores e inferiores de las silicuas para facilitar el corte transversal y, posteriormente, se abren separando las dos valvas del replum. De este modo dejamos al descubierto las semillas.



**Figura 4.** Detalle de las silicuas pegadas en la cinta adhesiva. Se puede observar los cortes en los extremos superiores, inferiores y transversales para abrir la silicua y extraer las semillas.

7. Para evitar que las semillas se degraden utilizamos el buffer de extracción, del cual pondremos alrededor de 70  $\mu$ l en el extremo libre del portaobjetos.

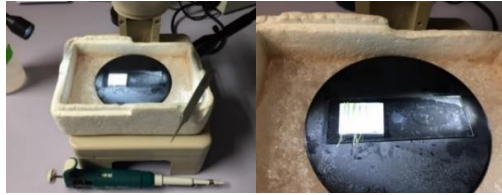


Figura 5. Detalle de la colocación del tampón de extracción para situar las semillas extraídas de las silicuas.

8. Ya con las silicuas abiertas, utilizamos las pinzas para coger las semillas y traspasarlas al buffer de extracción que hemos colocado previamente en el portaobjetos.

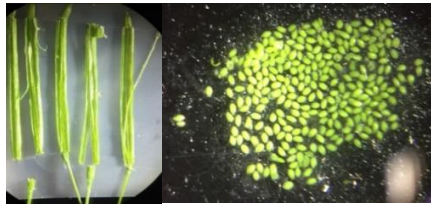


Figura 6. **Izquierda:** silicuas abiertas sin semillas. **Derecha:** semillas extraídas y agrupadas en el tampón de extracción.

9. Cuando se hayan recogido las semillas de todas las silicuas, y se hayan puesto en el buffer de extracción, colocaremos el cubreobjetos sobre las semillas recolectadas y presionaremos unas tres veces para facilitar que se separen testa y embrión.

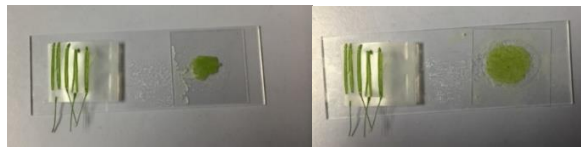


Figura 7. **Izquierda:** Se observan las silicuas abiertas y vacías junto a las semillas agrupadas en el tampón de extracción, las cuales quedan cubiertas por el cubreobjetos. **Derecha:** Se pueden apreciar las semillas después de haber presionado con el dedo el cubreobjetos.

10. Seguidamente se retira el cubreobjetos y, con la ayuda de las pinzas, se procede con la separación de los embriones y las testas. Esto se realizará tanto en el portaobjetos como en el cubreobjetos.

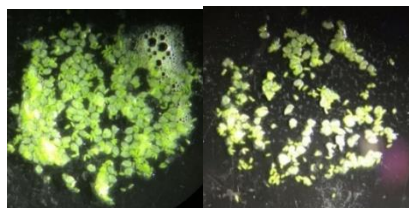
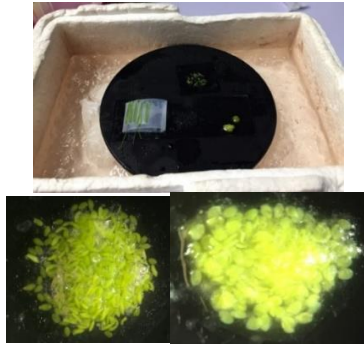


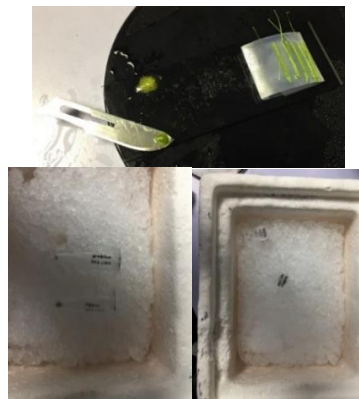
Figura 8. **Izquierda:** testas y embriones en el portaobjetos, separados después de haber sido presionados. **Derecha:** testas y embriones presentes en el cubreobjetos después de haber presionado.

11. Una vez separados los embriones y las testas se agrupan por separado. De este modo se juntan todos los embriones que se han obtenido en el cubreobjetos junto con los embriones del portaobjetos y, de igual manera, las testas.



**Figura 9.** Arriba: platina con el portaobjetos sobre la superficie de hielo. Se distinguen la cinta adhesiva con las silicuas vacías y las testas y los embriones separados por separado. Abajo izquierda: detalle de todos los embriones agrupados. Abajo derecha: detalle de todas las testas agrupadas.

12. Por último, se recogen los embriones y las testas por separado con la ayuda del bisturí, agrupándolos con las pinzas. Con el material vegetal ya en el bisturí, se coge el tubo Eppendorff correspondiente que se encuentra en el  $N_2$ , se llena un poco con este líquido y se introduce el bisturí en el tubo. Aquí se formará un aglomeramiento sólido del material vegetal que, con la ayuda de las pinzas, se separará del bisturí y caerá al fondo del tubo. Mientras no estemos manejando el tubo, a la hora de introducir el material vegetal, lo mantendremos en el hielo de la caja grande. Cuando se hayan recogido las muestras, éstas se conservarán en todo momento en  $N_2$  líquido hasta que sean almacenadas en los congeladores a  $-80^{\circ}C$ .



**Figura 10.** Arriba: se observa sobre la hoja de bisturí los embriones agrupados y recogidos para conservar en los tubos Eppendorf. Abajo izquierda: tubos Eppendorf conteniendo, por separado, testas y embriones. Abajo derecha: forma en la que se mantenían los tubos mientras se recogían las muestras biológicas.

## Anexo II. Análisis de la dormancia de las accesiones con germinación inferior al 50%

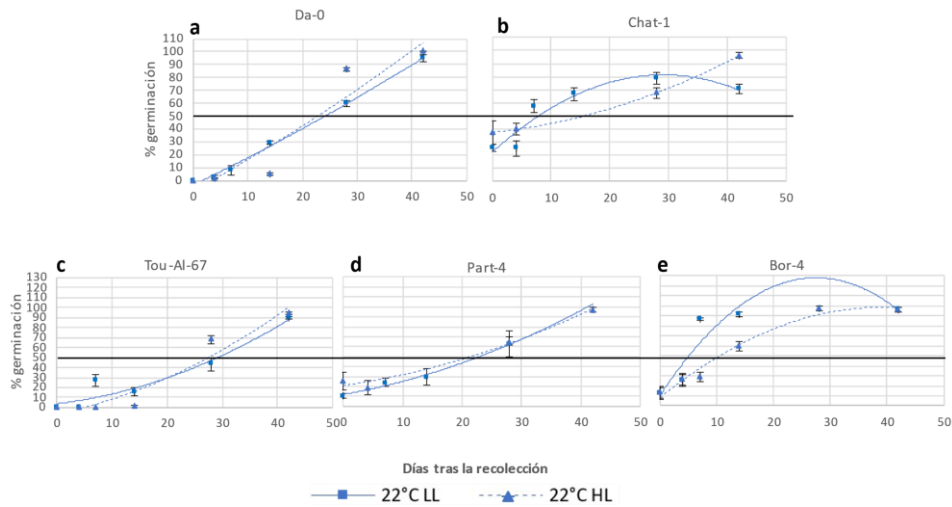


Figura 1. Gráficas de las accesiones cuya germinación a día 0 fue inferior al 50% a 22°C, con baja y alta intensidad lumínica. En la parte superior se muestran las accesiones clasificadas como muy longevas; en la parte inferior se muestran las accesiones menos longevas. Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas en base a una prueba t-student (pvalue menor 0'05).

## Anexo III. Extracto de los 100 primeros genes con mayor expresión en el análisis de la testa del mutante *tt7*

Locus	log2FoldChange	padj	Descripción
AT4G03930	23,98	7,589E-05	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily
AT1G52400	23,03	1,801E-04	beta glucosidase 18
AT5G39580	10,53	9,255E-06	Peroxidase superfamily protein
AT5G16960	10,31	7,310E-07	Zinc-binding dehydrogenase family protein
AT2G37430	9,59	1,898E-04	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
AT5G61270	9,56	1,898E-04	phytochrome-interacting factor7
AT1G63750	9,26	5,087E-04	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT2G34740	9,19	1,315E-03	Protein phosphatase 2C family protein
AT1G07160	9,17	3,345E-03	Protein phosphatase 2C family protein
AT3G21352	9,14	2,198E-03	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G21351,1); Has 26 Blast hits to 26 proteins in 5 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 26; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT1G26380	9,08	3,007E-02	FAD-binding Berberine family protein
AT1G72260	8,86	4,355E-02	thionin 2,1
AT5G47220	8,80	7,752E-04	ethylene responsive element binding factor 2



AT4G28460	8,69	5,535E-03	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: 10 plant structures; EXPRESSED DURING: LP,04 four leaves visible, 4 anthesis, petal differentiation and expansion stage; Has 8 Blast hits to 8 proteins in 3 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 8; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT4G22470	8,68	1,090E-02	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
AT3G11260	8,60	1,905E-03	WUSCHEL related homeobox 5
AT3G60935	8,50	8,859E-03	transposable element gene
AT3G26470	8,42	2,705E-03	Powdery mildew resistance protein, RPW8 domain
AT1G22380	8,39	6,754E-03	UDP-glucosyl transferase 85A3
AT5G07660	8,33	7,431E-03	structural maintenance of chromosomes 6A
AT1G14540	8,32	4,220E-03	Peroxidase superfamily protein
AT2G40220	8,29	4,632E-03	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G08770	8,28	2,535E-02	lipid transfer protein 6
AT5G01560	8,26	1,563E-02	lectin receptor kinase a4,3
AT5G57540	8,18	1,506E-02	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 13
AT2G16895	8,14	1,285E-02	pseudogene, similar to unnamed protein product, blastp match of 40% identity and 5,7e-21 P-value to GP
AT5G46040	8,10	9,398E-03	Major facilitator superfamily protein
AT3G09405	8,08	1,536E-02	Pectinacetylsterase family protein
AT3G13782	8,08	1,091E-02	nucleosome assembly protein1;4
AT5G67450	8,04	3,644E-02	zinc-finger protein 1
AT4G31875	8,02	2,689E-02	unknown protein; Has 30201 Blast hits to 17322 proteins in 780 species: Archae - 12; Bacteria - 1396; Metazoa - 17338; Fungi - 3422; Plants - 5037; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2996 (source: NCBI BLink),
AT1G14440	8,02	2,158E-02	homeobox protein 31
AT1G28685	7,97	1,726E-02	other RNA
AT1G30520	7,96	3,564E-02	acyl-activating enzyme 14
AT3G25210	7,96	1,675E-02	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
AT3G28740	7,96	2,928E-05	Cytochrome P450 superfamily protein
AT1G18200	7,95	1,488E-02	RAB GTPase homolog A6B
AT4G13280	7,94	4,529E-02	terpenoid synthase 12
AT4G17960	7,94	1,630E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT5G46620,1); Has 46 Blast hits to 45 proteins in 13 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 46; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G36800	7,94	2,315E-02	don-glucosyltransferase 1
AT1G51530	7,83	2,196E-02	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT1G06883	7,83	1,092E-02	no_annotation_available
AT1G08997	7,82	4,978E-02	no_annotation_available
AT1G17970	7,80	2,572E-02	RING/U-box superfamily protein
AT3G27730	7,78	3,007E-02	ATP binding;ATP-dependent helicases;DNA helicases
AT5G23820	7,77	2,775E-02	MD-2-related lipid recognition domain-containing protein
AT1G07823	7,71	4,116E-02	no_annotation_available

AT5G66390	7,71	4,273E-02	Peroxidase superfamily protein
AT5G20710	7,68	4,047E-02	beta-galactosidase 7
AT2G22140	7,68	3,592E-02	essential meiotic endonuclease 1B
AT1G09657	7,68	4,380E-02	no_annotation_available
AT5G36002	7,67	4,273E-02	other RNA
AT3G25610	7,64	8,478E-06	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
AT2G47950	7,63	4,070E-02	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: root, flower; EXPRESSED DURING: petal differentiation and expansion stage; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G62990,1); Has 22 Blast hits to 22 proteins in 5 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 22; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT1G73510	7,61	4,582E-02	unknown protein; Has 7 Blast hits to 7 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 7; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT4G10650	7,60	4,536E-02	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G37570	7,54	4,935E-02	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
AT1G22370	7,38	1,480E-02	UDP-glucosyl transferase 85A5
AT4G15380	7,34	1,065E-03	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 4
AT4G16260	7,24	1,933E-13	Glycosyl hydrolase superfamily protein
AT2G23370	7,04	1,293E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G34090,1); Has 73 Blast hits to 73 proteins in 21 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 65; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 8 (source: NCBI BLink),
AT5G44567	6,19	7,632E-03	no_annotation_available
AT4G18170	6,17	3,760E-03	WRKY DNA-binding protein 28
AT4G03100	5,98	2,222E-02	Rho GTPase activating protein with PAK-box/P21-Rho-binding domain
AT4G11650	5,56	1,018E-05	osmotin 34
AT3G14060	5,40	4,116E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G54120,1); Has 30 Blast hits to 30 proteins in 8 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 30; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G38470	5,39	8,930E-14	WRKY DNA-binding protein 33
AT5G35580	5,20	1,817E-03	Protein kinase superfamily protein
AT5G46350	5,08	4,004E-03	WRKY DNA-binding protein 8
AT2G43120	5,01	7,597E-04	RmlC-like cupins superfamily protein
AT1G65970	4,87	1,441E-02	thioredoxin-dependent peroxidase 2
AT4G02520	4,82	3,893E-07	glutathione S-transferase PHI 2
AT1G12210	4,79	4,374E-02	RPS5-like 1
AT4G14370	4,64	7,494E-07	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G65200	4,62	3,071E-02	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein
AT5G59340	4,58	2,553E-02	WUSCHEL related homeobox 2
AT5G66790	4,53	7,925E-03	Protein kinase superfamily protein
AT1G55450	4,47	2,641E-02	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT1G14870	4,39	6,274E-03	PLANT CADMIUM RESISTANCE 2
AT5G35735	4,39	2,010E-04	Auxin-responsive family protein

AT1G22570	4,30	2,151E-02	Major facilitator superfamily protein
AT2G17525	4,28	3,105E-02	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
AT5G17580	4,27	1,029E-03	Phototropic-responsive NPH3 family protein
AT3G48310	4,18	4,339E-03	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 22
AT5G49520	4,09	3,883E-05	WRKY DNA-binding protein 48
AT2G15490	4,04	3,062E-04	UDP-glycosyltransferase 73B4
AT1G09470	4,02	3,007E-02	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; EXPRESSED IN: cotyledon; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT5G26770,1); Has 55019 Blast hits to 30094 proteins in 2088 species: Archae - 730; Bacteria - 6553; Metazoa - 28961; Fungi - 4800; Plants - 2559; Viruses - 111; Other Eukaryotes - 11305 (source: NCBI BLink),
AT3G23250	3,90	4,508E-04	myb domain protein 15
AT2G32200	3,89	4,380E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT2G32210,1); Has 131 Blast hits to 131 proteins in 14 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 1; Plants - 130; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT4G32650	3,84	3,979E-03	potassium channel in Arabidopsis thaliana 3
AT4G22530	3,84	1,738E-03	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G24160	3,80	5,051E-03	squalene monooxygenase 6
AT2G26530	3,79	2,954E-02	Protein of unknown function (DUF1645)
AT1G33110	3,77	9,587E-04	MATE efflux family protein
AT1G61360	3,76	2,012E-02	S-locus lectin protein kinase family protein
AT1G30755	3,73	4,611E-03	Protein of unknown function (DUF668)
AT4G34135	3,66	1,161E-03	UDP-glucosyltransferase 73B2
AT2G02930	3,65	1,061E-02	glutathione S-transferase F3
AT3G02840	3,62	3,131E-03	ARM repeat superfamily protein
AT5G27890	3,61	2,795E-02	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: myosin heavy chain-related (TAIR:AT2G15420,1); Has 8 Blast hits to 7 proteins in 1 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 8; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),

#### Anexo IV. Extracto de los 100 primeros genes con menor expresión en el análisis de la testa del mutante *tt7*

Locus	log2FoldChange	padj	Descripción
AT3G04180	-13,58	1,795E-14	RmlC-like cupins superfamily protein
AT3G04150	-13,43	4,049E-14	RmlC-like cupins superfamily protein
AT5G67210	-11,91	1,844E-09	Protein of unknown function (DUF579)
AT5G66690	-11,88	2,467E-10	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT4G33450	-11,55	3,491E-09	myb domain protein 69
AT5G43690	-11,08	5,359E-07	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
AT5G13350	-10,58	3,042E-07	Auxin-responsive GH3 family protein
AT2G28315	-10,24	3,056E-05	Nucleotide/sugar transporter family protein
AT1G18870	-10,15	5,638E-16	isochorismate synthase 2
AT5G37990	-9,97	9,808E-05	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein

AT1G72920	-9,83	4,387E-05	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein
AT3G53600	-9,76	5,471E-05	C2H2-type zinc finger family protein
AT3G43190	-9,75	4,263E-05	sucrose synthase 4
AT3G47350	-9,60	2,783E-04	hydroxysteroid dehydrogenase 2
AT2G25510	-9,60	6,538E-05	unknown protein; Has 2 Blast hits to 2 proteins in 1 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 2; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT5G49850	-9,48	7,962E-04	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT1G35250	-9,48	1,796E-04	Thioesterase superfamily protein
AT5G14020	-9,47	2,340E-04	Endosomal targeting BRO1-like domain-containing protein
AT3G04170	-9,33	6,906E-03	RmlC-like cupins superfamily protein
AT5G66985	-9,16	5,296E-04	unknown protein; Has 30201 Blast hits to 17322 proteins in 780 species: Archae - 12; Bacteria - 1396; Metazoa - 17338; Fungi - 3422; Plants - 5037; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2996 (source: NCBI BLink),
AT1G03700	-9,15	1,065E-03	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT5G42325	-9,13	2,505E-03	Transcription factor IIS protein
AT5G38310	-8,96	1,509E-03	unknown protein; Has 1807 Blast hits to 1807 proteins in 277 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 736; Fungi - 347; Plants - 385; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 339 (source: NCBI BLink),
AT2G43880	-8,92	4,939E-03	Pectin lyase-like superfamily protein
AT4G12350	-8,91	6,739E-03	myb domain protein 42
AT2G30340	-8,90	2,505E-03	LOB domain-containing protein 13
AT5G65090	-8,90	2,505E-03	DNase I-like superfamily protein
AT5G23170	-8,89	5,657E-03	Protein kinase superfamily protein
AT3G04190	-8,83	4,879E-03	RmlC-like cupins superfamily protein
AT2G20070	-8,79	3,345E-03	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; LOCATED IN: endomembrane system; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: low-molecular-weight cysteine-rich 81 (TAIR:AT2G25295,1); Has 10 Blast hits to 10 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 10; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT4G16750	-8,74	3,623E-03	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT3G45690	-8,58	1,370E-02	Major facilitator superfamily protein
AT4G02250	-8,56	1,376E-02	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein
AT5G48140	-8,56	1,330E-02	Pectin lyase-like superfamily protein
AT4G14530	-8,56	1,258E-02	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: AGAMOUS-like 97 (TAIR:AT1G46408,1); Has 21 Blast hits to 21 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 21; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT3G50220	-8,56	1,048E-02	Protein of unknown function (DUF579)
AT1G31670	-8,54	3,262E-11	Copper amine oxidase family protein
AT4G36830	-8,54	1,126E-02	GNS1/SUR4 membrane protein family
AT1G08173	-8,52	1,608E-02	no_annotation_available
AT2G07560	-8,49	1,067E-02	H(+)-ATPase 6
AT1G32510	-8,48	1,114E-02	NAC domain containing protein 11
AT1G77730	-8,43	2,121E-02	Pleckstrin homology (PH) domain superfamily protein
AT2G45800	-8,40	3,466E-02	GATA type zinc finger transcription factor family protein
AT1G21270	-8,39	1,426E-02	wall-associated kinase 2
AT5G23000	-8,26	2,174E-02	myb domain protein 37
AT2G24660	-8,25	2,158E-02	transposable element gene

AT4G26460	-8,24	2,315E-02	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT5G26620	-8,18	2,670E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G05858,1); Has 48 Blast hits to 48 proteins in 8 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 48; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT5G28470	-8,17	3,497E-02	Major facilitator superfamily protein
AT2G16360	-8,14	3,007E-02	Ribosomal protein S25 family protein
AT3G51960	-8,12	3,469E-02	basic leucine zipper 24
AT2G17260	-8,11	4,469E-02	glutamate receptor 2
AT3G25855	-8,01	4,703E-02	Copper transport protein family
AT3G05800	-8,01	4,400E-02	AtBS1(activation-tagged BRI1 suppressor 1)-interacting factor 1
AT5G53510	-7,98	4,632E-02	oligopeptide transporter 9
AT1G62210	-7,88	2,993E-13	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; Has 20 Blast hits to 18 proteins in 7 species: Archae - 0; Bacteria - 4; Metazoa - 7; Fungi - 0; Plants - 8; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 1 (source: NCBI BLink),
AT3G04370	-7,68	4,116E-02	plasmodesmata-located protein 4
AT1G60095	-7,37	2,265E-17	Mannose-binding lectin superfamily protein
AT2G41390	-7,36	6,610E-15	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
AT4G12450	-7,31	3,152E-06	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G22560,1); Has 380 Blast hits to 380 proteins in 23 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 1; Fungi - 4; Plants - 374; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 1 (source: NCBI BLink),
AT4G34510	-7,24	3,956E-26	3-ketoacyl-CoA synthase 17
AT5G37690	-7,08	8,269E-28	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein
AT3G44540	-7,04	1,404E-26	fatty acid reductase 4
AT3G58550	-7,03	3,628E-18	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT4G19720	-6,98	7,932E-08	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
AT2G14365	-6,85	8,571E-03	low-molecular-weight cysteine-rich 84
AT1G47480	-6,44	5,365E-06	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT2G43390	-6,44	6,835E-05	unknown protein; Has 7 Blast hits to 7 proteins in 3 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 7; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT1G21540	-6,43	9,783E-07	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
AT2G47370	-6,41	1,443E-03	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT1G56550	-6,39	3,131E-03	RhamnoGalacturonan speci&#64257;c Xylosyltransferase 1
AT5G63560	-6,14	2,404E-21	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT2G43670	-6,10	6,257E-05	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
AT3G13660	-6,09	7,226E-04	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein
AT1G55940	-6,06	1,306E-10	cytochrome P450, family 708, subfamily A, polypeptide 1
AT2G18370	-6,04	2,857E-17	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT5G44550	-6,02	2,071E-24	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT5G63600	-6,01	2,380E-04	flavonol synthase 5
AT4G03540	-5,99	5,339E-05	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT2G14610	-5,97	9,987E-04	pathogenesis-related gene 1
AT5G58860	-5,95	6,771E-12	cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1
AT2G03200	-5,90	2,773E-18	Eukaryotic aspartyl protease family protein
AT1G68850	-5,86	7,518E-16	Peroxidase superfamily protein
AT5G07390	-5,81	3,796E-10	respiratory burst oxidase homolog A
AT5G63590	-5,77	3,222E-16	flavonol synthase 3
AT4G24140	-5,69	1,530E-14	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT3G06390	-5,66	8,554E-15	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT2G23540	-5,65	1,515E-20	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein

AT2G47200	-5,57	9,369E-09	unknown protein; Has 3 Blast hits to 3 proteins in 1 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 3; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT5G13900	-5,57	3,623E-03	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT3G52790	-5,51	1,398E-12	peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
AT1G66960	-5,51	8,469E-03	Terpenoid cyclases family protein
AT4G29700	-5,41	5,667E-03	Alkaline-phosphatase-like family protein
AT4G23680	-5,37	8,991E-03	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT2G46750	-5,27	7,723E-15	D-arabinono-1,4-lactone oxidase family protein
AT1G24430	-5,23	2,461E-07	HXXXD-type acyl-transferase family protein
AT5G23190	-5,21	1,963E-11	cytochrome P450, family 86, subfamily B, polypeptide 1
AT3G16280	-5,20	6,771E-12	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT1G62660	-5,16	9,369E-09	Glycosyl hydrolases family 32 protein
AT1G04360	-5,15	1,893E-10	RING/U-box superfamily protein

## Anexo V. Descripción de las dianas de WRKY33 identificadas en TF2Network para la testa del mutante *tt7*

Nombre Gen	Descripción TAIR	Funciones biológicas
ABCG36	<a href="#">AT1G59870.1</a>	<p>Proteína de la familia de los transportadores tipo ABC, ABC2 y PDR de plantas.</p> <p>Procesos biológicos experimentales: resistencia sistémica adquirida; respuesta al ácido absísico; respuesta celular al estímulo del ácido indolbutírico; respuesta defensiva frente a hongos mediante interacción incompatible; frente a bacterias y defensa mediante deposición de callosa en la pared celular; transporte de iones cadmio; actividad en el proceso catabólico del indol glucosinolato.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: transporte químico transmembrana.</p> <p>Función molecular biológica experimental: transporte de iones cadmio transmembrana.</p> <p>Función molecular computacional: Unión a ATP, actividad ATPasa junto con movimiento transmembrana de sustancias.</p> <p>Componentes celulares experimentales: Mitocondria, membrana vacuolar, membrana plasmática, envoltura del cloroplasto.</p> <p>Componente celular computacional: componente integral de membrana.</p>
ATL31	<a href="#">AT5G27420.1</a>	<p>Insensible carbono/nitrógeno1</p> <p>Procesos biológicos experimentales: respuesta al ácido absísico; respuesta a la quitina; respuesta defensiva frente a bacterias mediante interacción incompatible; respuesta celular a los niveles de nitrógeno.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Ubiquitinación de proteínas; proceso catabólico de ubiquitina dependiente de proteína y mediado por el proteosoma.</p> <p>Función molecular biológica experimental: actividad ubiquitina-proteína transferasa.</p> <p>Función molecular computacional: Unión al ión zinc, actividad proteína ubiquitin ligasa.</p> <p>Componentes celulares experimentales: Membrana.</p> <p>Componente celular computacional: Región extracelular, componente integral de membrana.</p>
ATLOX4	<a href="#">AT1G72520.1</a>	<p>Proteína de la familia lipogenasa con dominio PLAT/LH2</p> <p>Procesos biológicos experimentales: respuesta a herida; respuesta a bacterias; dehiscencia de la antera; respuesta a ozono; oxidación lipídica; desarrollo del filamento del estambre.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Proceso biosintético de la oxipilina.</p> <p>Función molecular biológica experimental: actividad linoleato 13S-lipoxigenasa.</p> <p>Función molecular computacional: Unión a iones metálicos.</p> <p>Componente celular computacional: Cloroplastos.</p>
ATMYB15	<a href="#">AT3G23250.1</a>	<p>Proteína 15 del dominio myb</p> <p>Procesos biológicos experimentales: respuesta a estrés salino, etileno, auxinas, ácido jasmónico, quitina e iones cadmio.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Regulación de la transcripción a partir del promotor RNA polimerasa II; diferenciación celular.</p> <p>Función molecular computacional: Actividad de factor de transcripción RNA polimerasa II (movilización), unión a secuencia específica del DNA y regulador de la transcripción.</p> <p>Componente celular computacional: Núcleo.</p>
ATPLT5	<a href="#">AT3G18830.1</a>	<p>Transportador 5 de poli/monosacáridos</p> <p>Procesos biológicos experimentales: Formación de raíz lateral.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Importador de glucosa.</p> <p>Función molecular biológica experimental: actividad simportadora de protones; actividad transportadora transmembrana de galactosa, glucosa, mioinositol, D-xilosa, glicerol, manitol, sorbitol y D-ribosa.</p> <p>Componentes celulares experimentales: Membrana plasmática.</p> <p>Componente celular computacional: Componente integral de membrana.</p>
AT1G61370	<a href="#">AT1G61370.1</a>	<p>Familia de la proteína quinasa del locus 5 de lectina</p> <p>Procesos biológicos experimentales: reconocimiento de polen.</p> <p>Función molecular computacional: Unión a ATP, actividad quinasa y unión a carbohidratos.</p> <p>Componente celular computacional: Membrana plasmática, componente integral de membrana.</p> <p>Componente celular computacional: Mitocondria.</p>
AT1G65500	<a href="#">AT1G65500.1</a>	
AT4G08850	<a href="#">AT4G08850.1</a>	<p>Familia de las proteína quinasa tipo receptor de repeticiones ricas en leucina</p> <p>Procesos biológicos experimentales: Guía del tubo polínico.</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Fosforilación de proteínas.</p> <p>Función molecular biológica experimental: Unión a proteínas.</p> <p>Función molecular computacional: Actividad serina/treonina proteína quinasa, unión a ATP.</p> <p>Componentes celulares experimentales: Membrana plasmática, plasmodesmos y tubo polínico.</p> <p>Componente celular computacional: Núcleo y componente integral de membrana.</p>
AT5G41100	<a href="#">AT5G41100.1</a>	<p>Familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina</p> <p>Componentes celulares experimentales: Membrana plasmática.</p> <p>Componente celular computacional: Citoplasma.</p>
AT5G66790	<a href="#">AT5G66790.1</a>	<p>Superfamilia de proteínas kinasas</p> <p>Procesos biológicos computacionales: Fosforilación de proteínas.</p> <p>Función molecular computacional: Actividad quinasa, unión a ATP.</p> <p>Componente celular computacional: Componente integral de membrana.</p>

## Anexo VI. Descripción de los factores de transcripción menos expresados, y sus dianas, identificadas en TF2Network para la testa del mutante *tt7*

Nombre Gen	Descripción TAIR	Funciones biológicas
ANAC087	<a href="#">AT5G18270.1</a>	Presente en estadios de expansión, así como el estadio globular del embrión, por lo que está presente en el embrión y el hipocotilo. Respuesta celular a sustancias orgánicas, respuesta de defensa a bacterias, desarrollo de órganos florales, proceso metabólico de compuestos glucosilicos, proceso del sistema inmunitario, homeostasis de iones inorgánicos, senescencia de hojas, regulación negativa del proceso biosintético, regulación negativa del proceso metabólico celular, regulación de la respuesta de defensa, respuesta al ácido abscísico, respuesta al compuesto organonitrogenado, respuesta al ácido salicílico, respuesta al estrés salino, respuesta a la privación de agua, transducción de señales
MYB3	<a href="#">AT1G22640.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión, en el estadio globular y cotiledonario. Factor de transcripción tipo MYB (MYB3) que reprime la expresión génica de la biosíntesis de fenilpropanoide proceso biosintético del ácido cinámico, regulación negativa del proceso metabólico, respuesta a heridas
MYB58	<a href="#">AT1G16490.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión y cotiledonario. Miembro de la familia de genes del factor R2R3. proceso biosintético de lignina, regulación positiva de la transcripción con plantilla de ADN, regulación de la biogénesis de la pared celular secundaria.
MYB63	<a href="#">AT1G79180.2</a>	Miembro de la familia de genes del factor R2R3. regulación positiva de la transcripción con plantilla de ADN, regulación de la biogénesis de la pared celular secundaria.
MYB64	<a href="#">AT5G10280.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión. Codifica un factor de transcripción putativo (MYB92). regulación positiva del proceso biosintético de ácidos grasos, proceso biosintético de suberina.
FUS3	<a href="#">AT3G26790.1</a>	se expresa en el estadio bilateral del embrión, cotiledonario y en la maduración de la semilla. Factor de transcripción con gran similitud con la región B3 de las proteínas tipo VP1/ABI3. La proteína FUS3 de longitud completa se une al motivo RY altamente conservado [motivo de ADN CATGCA(TG)], presente en muchos promotores específicos de semillas, y los dominios B3 de este factor de transcripción son necesarios para la interacción específica con el elemento RY. La actividad transcripcional de FUS3 requiere el dominio de unión al ADN B3 y un dominio de activación. FUS3 especifica la identidad del cotiledón. Regulador de la expresión génica durante la embriogénesis tardía. Participa en el control de la identidad de órganos foliares en Arabidopsis al regular la síntesis de dos hormonas, ácido abscísico y giberelina. FUS3 junto con LEC1 regulan positivamente la abundancia de la proteína ABI3 en la semilla. desarrollo del embrión que termina en latencia de la semilla, regulación negativa del proceso biosintético de giberelina, regulación positiva del proceso biosintético del ácido abscísico, respuesta a la auxina, embriogénesis somática
Nombre Gen	Descripción TAIR	Funciones biológicas
4CL1	<a href="#">AT1G51680</a>	En la semilla se expresa durante el estadio globular del embrión. codifica una isoforma de 4-cumarato:CoA ligasa (4CL), que participa en el último paso de la vía general de los fenilpropanoides. Además de 4-cumarato, también convierte ferulato. La eficiencia catalítica fue en el siguiente orden (descendente): ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido 5-OH-ferúlico. At4CL1 no pudo usar ácido sinápico como sustrato. Interviene en proceso metabólico del fenilpropanoide, respuesta a UV, respuesta a hongos, respuesta a herida
C4H	<a href="#">AT2G30490.1</a>	En semilla se expresa en etapa bilateral del embrión de la planta, etapa cotiledónea del embrión de la planta, etapa globular del embrión de la planta, etapa de desarrollo de la plántula, Codifica una cinamato-4-hidroxilasa. Las mutaciones en este gen afectan el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo de los fenilpropanoides. principalmente en el proceso metabólico de lignina, pero actúa aguas arriba de proceso de desarrollo, proceso biosintético de fenilpropanoide, proceso metabólico de fenilpropanoide, desarrollo de polen, respuesta al estímulo de luz, respuesta a heridas, proceso biosintético de ubiquinona
CcOAMT1	<a href="#">AT4G34050.3</a>	Metiltransferasa en la vía biosintética de la lignina. actúa aguas arriba del proceso biosintético de cumarina y la lignina. En semilla se expresa durante el estadio globular y cotiledonario del embrión.
CYP75B1 (TT7)	<a href="#">AT5G07990.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión, en el estadio globular y cotiledonario. Involucrado en el proceso biosintético de flavonoides, actuando aguas arriba de este proceso así como respuesta a UV y auxina. Necesario para la actividad de la 3' hidroxilasa de los flavonoides. La abundancia de enzimas en relación con CHS determina la proporción de metabolitos de quercetina/kaempferol. El ARNm es móvil de célula a célula.
CYP98A3	<a href="#">AT2G40890.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión y en los estadios globulares y cotiledonarios. Codifica el cumarato 3-hidroxilasa (C3H), una monooxigenasa dependiente de P450, actúa aguas arriba de los procesos biosintéticos de lignina y flavonoides. También afecta la biosíntesis de cumarinas como la escopoletina y la escopolina como una vía de ramificación desde el nivel de ácido fenilpropanoide. proceso biosintético de cumarina, proceso biosintético de flavonoides, proceso biosintético de lignina, proceso biosintético de fenilpropanoide
HCT	<a href="#">AT5G48930.1</a>	En semilla se expresa en el estadio bilateral del embrión y en los estadios globulares y cotiledonarios. Actúa aguas arriba de la homeostasis de auxina, en el proceso biosintético de lignina y en la regulación positiva del proceso biosintético de flavonoides. Sintetiza y cataboliza los ésteres de hidroxicinamoilo (coumaroil/caffeoil shikimato y quinato) implicados en la ruta de los fenilpropanoides. Influencia en la acumulación de flavonoides que a su vez inhiben el transporte de auxinas y reducen el crecimiento de las plantas.



## Anexo VII. Extracto de los 100 primeros genes con mayor expresión en el análisis del embrión del mutante *tt7*

Locus	log2FoldChange	padj	Description
AT3G28740	9,13	1,40E-06	Cytochrome P450 superfamily protein
AT5G35657	8,96	4,50E-08	transposable element gene
AT5G10520	8,80	1,10E-07	ROP binding protein kinases 1
AT5G59530	8,39	1,05E-06	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT2G08986	8,29	5,66E-06	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G40104,1); Has 30201 Blast hits to 17322 proteins in 780 species: Archae - 12; Bacteria - 1396; Metazoa - 17338; Fungi - 3422; Plants - 5037; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2996 (source: NCBI BLink),
AT1G19610	8,28	1,02E-20	Arabidopsis defensin-like protein
AT3G59220	8,15	4,82E-06	pirin
AT5G41761	8,12	6,14E-06	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G55570,1); Has 30201 Blast hits to 17322 proteins in 780 species: Archae - 12; Bacteria - 1396; Metazoa - 17338; Fungi - 3422; Plants - 5037; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2996 (source: NCBI BLink),
AT3G28160	7,87	1,73E-05	transposable element gene
AT1G22360	7,61	8,85E-27	UDP-glucosyl transferase 85A2
AT2G20950	7,60	6,99E-05	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family
AT4G15440	7,52	1,08E-04	hydroperoxide lyase 1
AT5G05300	7,50	2,28E-04	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: 10 plant structures; EXPRESSED DURING: 8 growth stages; Has 1807 Blast hits to 1807 proteins in 277 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 736; Fungi - 347; Plants - 385; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 339 (source: NCBI BLink),
AT4G08555	7,44	2,58E-04	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; EXPRESSED IN: cultured cell; Has 4 Blast hits to 4 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 4; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT3G28100	7,39	1,90E-04	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT2G29490	7,27	6,31E-20	glutathione S-transferase TAU 1
AT3G53160	7,19	6,69E-10	UDP-glucosyl transferase 73C7
AT5G23220	7,16	6,34E-04	nicotinamidase 3
AT5G44567	7,16	6,34E-04	no_annotation_available
AT3G21352	6,91	1,50E-03	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G21351,1); Has 26 Blast hits to 26 proteins in 5 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 26; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G30690	6,91	2,56E-03	Protein of unknown function, DUF593
AT1G09987	6,75	4,60E-03	no_annotation_available
AT4G25950	6,74	5,08E-03	vacuolar ATP synthase G3
AT5G44460	6,71	3,26E-03	calmodulin like 43
AT1G13590	6,71	4,89E-34	phytosulfokine 1 precursor
AT4G21920	6,67	4,82E-03	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: N-terminal protein myristoylation; LOCATED IN: cellular_component unknown; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G20340,1); Has 40 Blast hits to 40 proteins in 10 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 40; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),

AT1G05675	6,64	4,86E-03	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
AT1G43140	6,59	9,62E-03	Cullin family protein
AT3G27860	6,52	7,72E-03	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein
AT2G27650	6,47	7,77E-03	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein
AT3G48310	6,45	1,86E-07	cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 22
AT3G54150	6,45	1,18E-02	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT2G37430	6,42	1,12E-02	C2H2 and C2HC zinc fingers superfamily protein
AT1G64020	6,41	9,91E-03	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
AT5G46040	6,40	9,59E-03	Major facilitator superfamily protein
AT4G27670	6,39	9,62E-03	heat shock protein 21
AT3G25730	6,37	1,08E-02	ethylene response DNA binding factor 3
AT3G30695	6,36	1,50E-02	transposable element gene
AT3G01035	6,35	2,42E-02	no_annotation_available
AT5G66260	6,33	1,21E-02	SAUR-like auxin-responsive protein family
AT1G28230	6,33	1,31E-02	purine permease 1
AT2G04440	6,27	1,38E-02	MutT/nudix family protein
AT1G25422	6,27	1,58E-02	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: cellular_component unknown; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G68500,1); Has 16 Blast hits to 16 proteins in 6 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 16; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G45780	6,26	1,53E-02	other RNA
AT3G56410	6,24	1,91E-02	Protein of unknown function (DUF3133)
AT1G66570	6,24	8,30E-27	sucrose-proton symporter 7
AT2G33710	6,23	1,75E-02	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
AT1G48150	6,21	2,28E-02	MADS-box transcription factor family protein
AT1G04033	6,20	2,04E-02	no_annotation_available
AT3G51540	6,19	1,81E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G08670,1); Has 22744 Blast hits to 9965 proteins in 783 species: Archae - 64; Bacteria - 2760; Metazoa - 8515; Fungi - 3864; Plants - 499; Viruses - 702; Other Eukaryotes - 6340 (source: NCBI BLink),
AT1G61290	6,18	2,00E-02	syntaxin of plants 124
AT1G69930	6,16	2,41E-02	glutathione S-transferase TAU 11
AT1G01200	6,14	2,13E-02	RAB GTPase homolog A3
AT3G22492	6,14	1,79E-03	pseudogene of prefoldin-related KE2 family protein
AT4G05890	6,10	2,28E-02	no_annotation_available
AT2G12650	6,10	2,45E-02	transposable element gene
AT3G50250	6,08	2,77E-02	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G19270,1); Has 6 Blast hits to 5 proteins in 1 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 6; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT3G01495	6,07	3,13E-02	no_annotation_available
AT1G31000	6,06	3,68E-02	F-box and associated interaction domains-containing protein
AT4G27110	6,05	2,67E-02	COBRA-like protein 11 precursor
AT3G51960	6,04	2,90E-02	basic leucine zipper 24
AT2G05700	6,01	2,96E-02	transposable element gene

AT1G04467	6,01	3,01E-02	no_annotation_available
AT5G47077	6,00	2,99E-02	low-molecular-weight cysteine-rich 6
AT2G03020	5,99	3,53E-02	Heat shock protein HSP20/alpha crystallin family
AT5G26345	5,98	3,71E-02	transposable element gene
AT5G44563	5,94	4,38E-02	no_annotation_available
AT2G02930	5,92	1,51E-272	glutathione S-transferase F3
AT3G02305	5,90	4,25E-02	no_annotation_available
AT3G13220	5,90	4,25E-02	ABC-2 type transporter family protein
AT3G22770	5,90	3,80E-02	F-box associated ubiquitination effector family protein
AT1G05353	5,88	3,96E-02	no_annotation_available
AT2G46495	5,84	4,34E-02	RING/U-box superfamily protein
AT3G32240	5,83	4,41E-02	transposable element gene
AT1G05680	5,83	4,78E-16	Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2
AT3G04035	5,83	4,50E-02	no_annotation_available
AT5G03020	5,83	4,50E-02	Galactose oxidase/kelch repeat superfamily protein
AT2G21000	5,80	4,79E-02	transposable element gene
AT3G16120	5,79	2,08E-21	Dynein light chain type 1 family protein
AT5G59080	5,78	4,08E-03	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: response to oxidative stress; LOCATED IN: chloroplast; EXPRESSED IN: 18 plant structures; EXPRESSED DURING: 9 growth stages; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G46880,1); Has 1807 Blast hits to 1807 proteins in 277 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 736; Fungi - 347; Plants - 385; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 339 (source: NCBI BLink),
AT3G21370	5,76	7,74E-59	beta glucosidase 19
AT4G23270	5,73	5,54E-03	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 19
AT2G41505	5,64	1,36E-04	no_annotation_available
AT4G18170	5,62	5,79E-07	WRKY DNA-binding protein 28
AT1G64010	5,62	1,57E-04	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
AT3G01990	5,54	9,91E-03	ACT domain repeat 6
AT3G60150	5,53	2,21E-04	Protein of unknown function (DUF498/DUF598)
AT4G02520	5,53	1,97E-23	glutathione S-transferase PHI 2
AT2G41260	5,49	5,87E-33	glycine-rich protein / late embryogenesis abundant protein (M17)
AT2G42955	5,46	1,06E-03	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT2G30615,1); Has 60 Blast hits to 45 proteins in 3 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 60; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT5G55050	5,44	3,07E-37	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT5G46350	5,42	3,15E-18	WRKY DNA-binding protein 8
AT1G68250	5,26	8,90E-07	unknown protein; Has 5 Blast hits to 5 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 5; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT1G22570	5,26	1,21E-128	Major facilitator superfamily protein
AT4G38540	5,24	1,48E-161	FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein
AT1G15125	5,24	2,20E-02	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein
AT4G27970	5,23	3,03E-58	SLAC1 homologue 2
AT2G23348	5,23	1,91E-02	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; Has 3 Blast hits to 3 proteins in 2 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 3; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT4G02410	5,21	2,70E-02	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
AT5G16960	5,15	1,45E-36	Zinc-binding dehydrogenase family protein

## Anexo VIII. Extracto de los 100 primeros con menor expresión en el análisis del embrión del mutante *tt7*

Locus	log2FoldChange	padj	Description
AT5G09480	-10,94	9,72E-13	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
AT5G63560	-10,51	1,40E-11	HXXXD-type acyl-transferase family protein

AT4G04460	-10,48	1,38E-11	Sapoin-like aspartyl protease family protein
AT5G39130	-10,40	2,40E-11	RmlC-like cupins superfamily protein
AT2G23540	-10,08	4,45E-10	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
AT2G19590	-10,06	2,57E-10	ACC oxidase 1
AT2G25940	-10,03	2,65E-10	alpha-vacuolar processing enzyme
AT1G48800	-10,02	2,33E-10	Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein
AT5G58860	-10,02	2,20E-10	cytochrome P450, family 86, subfamily A, polypeptide 1
AT1G73220	-9,98	5,57E-10	organic cation/carnitine transporter1 unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: chloroplast; EXPRESSED IN: 9 plant structures; EXPRESSED DURING: 6 growth stages; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: Protein of unknown function, DUF547 (TAIR:AT1G16750,1); Has 192 Blast hits to 192 proteins in 18 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 1; Fungi - 0; Plants - 189; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 2 (source: NCBI BLink),
AT4G33130	-9,96	3,14E-10	BEST Arabidopsis thaliana protein match is: transcription regulators (TAIR:AT3G56220,1); Has 289 Blast hits to 289 proteins in 30 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 289; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G40435	-9,96	3,23E-10	histone H2A 11
AT3G54560	-9,95	3,33E-10	Endomembrane protein 70 protein family
AT1G08350	-9,94	3,57E-10	Peroxidase superfamily protein
AT1G68850	-9,94	3,48E-10	Uncharacterised protein family (UPF0497)
AT5G44550	-9,89	4,72E-10	RmlC-like cupins superfamily protein
AT3G04170	-9,88	5,86E-10	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT2G18370	-9,86	7,26E-10	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G37440,2); Has 77 Blast hits to 77 proteins in 14 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 73; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 4 (source: NCBI BLink),
AT3G59670	-9,86	6,89E-10	SNARE-like superfamily protein
AT3G09800	-9,85	6,00E-10	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; Has 8 Blast hits to 8 proteins in 4 species: Archae - 0; Bacteria - 2; Metazoa - 0; Fungi - 2; Plants - 4; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT1G62070	-9,83	6,82E-10	Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein
AT4G39970	-9,82	9,90E-10	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
AT5G12940	-9,70	1,55E-09	Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein
AT5G46280	-9,70	1,66E-09	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G62000,1); Has 131 Blast hits to 122 proteins in 40 species: Archae - 0; Bacteria - 73; Metazoa - 10; Fungi - 6; Plants - 37; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 5 (source: NCBI BLink),
AT1G62220	-9,65	1,92E-09	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT2G48140	-9,65	1,85E-09	cyclic nucleotide-gated channel 14
AT2G24610	-9,65	2,08E-09	Aquaporin-like superfamily protein
AT5G18290	-9,63	2,10E-09	calcineurin B-like protein 10
AT4G33000	-9,61	2,43E-09	fatty acid reductase 4
AT3G44540	-9,60	2,54E-09	Wound-responsive family protein
AT4G33560	-9,59	2,67E-09	MATE efflux family protein
AT1G15160	-9,52	4,53E-10	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
AT1G22330	-9,47	5,45E-09	fatty acid reductase 1
AT5G22500	-9,44	6,83E-09	isopropylmalate dehydrogenase 1
AT5G14200	-9,42	7,84E-09	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
AT3G06778	-9,40	1,24E-08	Glycosyl hydrolases family 32 protein
AT1G62660	-9,39	1,11E-08	Peptidase M28 family protein
AT5G19740	-9,37	1,15E-08	Actin-binding FH2 (formin homology 2) family protein
AT3G07540	-9,35	9,75E-10	transcription regulators
AT3G56220	-9,34	1,22E-08	Pectin lyase-like superfamily protein
AT3G06770	-9,31	1,49E-08	WUSCHEL related homeobox 11
AT3G03660	-9,28	3,52E-08	glucose-6-phosphate/phosphate translocator 2
AT1G61800	-9,28	1,71E-08	BNR/Asp-box repeat family protein
AT5G57700	-9,26	2,08E-08	acireductone dioxygenase 3
AT2G26400	-9,24	2,15E-08	

AT1G16410	-9,24	2,18E-08	cytochrome p450 79f1
AT2G14247	-9,24	2,20E-08	Expressed protein
AT3G47860	-9,23	2,33E-08	chloroplastic lipocalin
AT1G53270	-9,23	3,15E-08	ABC-2 type transporter family protein
AT5G37690	-9,22	2,44E-08	SGNH hydrolase-type esterase superfamily protein
AT3G02380	-9,21	3,25E-08	CONSTANS-like 2
AT3G01125	-9,21	3,20E-08	no_annotation_available
AT3G16180	-9,20	2,90E-08	Major facilitator superfamily protein
AT3G58550	-9,18	4,66E-08	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein
AT2G18360	-9,15	4,19E-08	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT1G09780	-9,12	4,43E-08	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent
AT3G14630	-9,10	4,89E-08	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 9
AT3G11430	-9,09	5,60E-08	glycerol-3-phosphate acyltransferase 5
AT3G59010	-9,07	1,15E-07	pectin methylesterase 61
AT3G23810	-9,07	6,21E-08	S-adenosyl-l-homocysteine (SAH) hydrolase 2
AT3G23805	-9,07	9,70E-08	ralf-like 24
AT2G34840	-9,05	9,43E-08	Coatmer epsilon subunit
AT1G30515	-9,04	9,27E-08	unknown protein; FUNCTIONS IN: molecular_function unknown; INVOLVED IN: biological_process unknown; LOCATED IN: endomembrane system; EXPRESSED IN: 16 plant structures; EXPRESSED DURING: 6 growth stages; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT4G21740,1); Has 20 Blast hits to 20 proteins in 4 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 0; Fungi - 0; Plants - 20; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 0 (source: NCBI BLink),
AT2G34060	-9,02	8,66E-08	Peroxidase superfamily protein
AT1G73290	-9,02	1,76E-07	serine carboxypeptidase-like 5
AT4G37520	-9,01	8,41E-08	Peroxidase superfamily protein
AT2G37380	-8,98	1,37E-07	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT2G39370,1); Has 1284 Blast hits to 422 proteins in 114 species: Archae - 0; Bacteria - 90; Metazoa - 125; Fungi - 151; Plants - 136; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 782 (source: NCBI BLink),
AT1G04610	-8,95	1,30E-07	YUCCA 3
AT2G17850	-8,94	1,28E-07	Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein
AT1G74490	-8,92	1,80E-07	Protein kinase superfamily protein
AT1G47290	-8,91	2,27E-07	3beta-hydroxysteroid-dehydrogenase/decarboxylase isoform 1
AT5G66620	-8,90	1,64E-07	DA1-related protein 6
AT1G64150	-8,89	2,03E-07	Uncharacterized protein family (UPF0016)
AT2G41400	-8,88	4,28E-07	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein
AT5G05180	-8,87	2,20E-07	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G10880,1); Has 1807 Blast hits to 1807 proteins in 277 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 736; Fungi - 347; Plants - 385; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 339 (source: NCBI BLink),
AT1G61050	-8,86	2,70E-07	alpha 1,4-glycosyltransferase family protein
AT1G07370	-8,85	3,01E-07	proliferating cellular nuclear antigen 1
AT4G02290	-8,83	2,99E-07	glycosyl hydrolase 9B13
AT4G00770	-8,83	4,33E-07	unknown protein; Has 127 Blast hits to 120 proteins in 33 species: Archae - 0; Bacteria - 2; Metazoa - 6; Fungi - 8; Plants - 62; Viruses - 3; Other Eukaryotes - 46 (source: NCBI BLink),
AT5G15150	-8,81	3,15E-07	homeobox 3
AT5G60150	-8,80	4,18E-07	unknown protein; Has 1807 Blast hits to 1807 proteins in 277 species: Archae - 0; Bacteria - 0; Metazoa - 736; Fungi - 347; Plants - 385; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 339 (source: NCBI BLink),
AT4G16640	-8,80	2,98E-07	Matrixin family protein
AT5G08495	-8,79	3,03E-07	no_annotation_available
AT3G61380	-8,79	3,53E-07	Phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P-related
AT5G63590	-8,79	3,16E-07	flavonol synthase 3
AT4G25300	-8,78	1,39E-06	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein
AT1G65860	-8,78	4,74E-07	flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 1
AT3G20950	-8,77	3,79E-07	cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 32
AT5G02970	-8,76	3,64E-07	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
AT5G45470	-8,76	6,84E-07	Protein of unknown function (DUF594)
AT2G37450	-8,74	4,31E-07	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
AT5G66520	-8,74	4,06E-07	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein

AT1G60600	-8,73	5,32E-07	UbiA prenyltransferase family protein
AT1G26570	-8,71	1,92E-06	UDP-glucose dehydrogenase 1
AT5G19340	-8,70	9,24E-07	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT3G05980.1); Has 1000 Blast hits to 906 proteins in 61 species: Archae - 0; Bacteria - 4; Metazoa - 62; Fungi - 36; Plants - 128; Viruses - 4; Other Eukaryotes - 766 (source: NCBI BLink),
AT4G21600	-8,70	6,86E-07	endonuclease 5
AT5G39190	-8,69	5,76E-07	germin-like protein 2
AT2G40085	-8,69	6,61E-07	unknown protein; Has 35333 Blast hits to 34131 proteins in 2444 species: Archae - 798; Bacteria - 22429; Metazoa - 974; Fungi - 991; Plants - 531; Viruses - 0; Other Eukaryotes - 9610 (source: NCBI BLink),
AT5G50330	-8,68	6,06E-07	Protein kinase superfamily protein
AT5G50750	-8,68	6,47E-07	reversibly glycosylated polypeptide 4

## Anexo IX. Descripción de los factores de transcripción con mayor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante *tt7*

Nombre Gen	Descripción TAIR	Funciones biológicas
ABF1	<a href="#">AT1G49720.2</a>	<p><b>ABRE-binding factor 1</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Respuesta a Ácido Abscísico, ruta de señalización de la activación de Ácido Abscísico, regulación positiva de la transcripción de plantillas de DNA.</p> <p><b>Función molecular experimental:</b> Unión a proteínas, regulación de la transcripción de la región de unión al DNA, actividad de factor de transcripción para la unión de secuencia específica de DNA.</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Unión a secuencia específica de DNA.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>
ABF3	<a href="#">AT4G34000.1</a>	<p><b>Abscisic acid responsive elements (ABRE)-binding factor 3</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> respuesta a privación de agua, estrés salino, ruta de señalización activada por ácido abscísico, regulación positiva de la transcripción de tDNA.</p> <p><b>Función molecular biológica experimental:</b> regulación de la transcripción (actividad TF) de la secuencia específica de unión al DNA, unión a proteínas.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>
ABF4	<a href="#">AT3G19290.3</a>	<p><b>ABRE-binding factor 4</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> respuesta a privación de agua, estrés salino, ruta de señalización activada por ácido abscísico, proceso metabólico del glucosinolato, regulación positiva de la transcripción de tDNA, senescencia de hojas y proceso catabólico de la clorofila.</p> <p><b>Función molecular biológica experimental:</b> regulación de la transcripción (actividad TF) de la secuencia específica de unión al DNA, unión a proteínas.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>
ABI5	<a href="#">AT2G36270.3</a>	<p><b>Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Respuesta a privación de agua, estrés salino, ácido abscísico, giberelinas y quitinas; involucrado en el desarrollo de la semillas; regulación negativa de la germinación de la semilla; regulación positiva de la transcripción de tDNA; ruta de señalización mediada por azúcar.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> ruta de señalización activada por ácido abscísico.</p> <p><b>Función molecular biológica experimental:</b> Unión a DNA y proteínas, actividad de factor de transcripción de unión específica a secuencia de DNA.</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Unión a secuencia de DNA específica.</p> <p><b>Componentes celulares experimentales:</b> Núcleo.</p>
BZIP54	<a href="#">AT4G01120.1</a>	<p><b>G-box binding factor 2</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Respuesta a la luz azul, proceso metabólico del glucosinolato.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> Regulación de la transcripción de tDNA.</p> <p><b>Función molecular biológica experimental:</b> Unión a secuencias específicas de DNA y proteínas.</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Actividad de factor de transcripción de unión específica a secuencia de DNA.</p> <p><b>Componentes celulares experimentales:</b> Núcleo y citoplasma.</p>
PIF4	<a href="#">AT2G43010.5</a>	<p><b>Phytochrome interacting factor 4</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Detiolación, regulador de procesos biosintéticos de auxinas, ruta de señalización mediada por auxinas, ruta de señalización de luz roja, respuesta a la baja afluencia de estímulos de luz azul por el sistema de baja fluencia de luz azul.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> Fototransducción de la luz roja/rojo lejano, regulación de la transcripción de plantillas de DNA.</p> <p><b>Función molecular experimental:</b> Unión a DNA y proteínas</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Actividad como factor de transcripción de unión a secuencia específica de DNA, actividad para dimerizar proteínas.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>

## Anexo X. Descripción de los 139 genes diana comunes para los factores de transcripción con mayor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante *tt7*

Locus Identifier	Gene Description	Primary Gene Symbol	All Gene Symbols
AT1G24600	hypothetical protein		
AT5G66490	hypothetical protein		
AT3G14060	hypothetical protein		
AT1G64065	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein family		
AT1G21680	DPP6 N-terminal domain-like protein		
AT1G10530	PADRE protein		
AT1G11175	other_RNA		
AT5G03370	acylphosphatase family		
AT5G02580	argininosuccinate lyase		
AT1G23710	hypothetical protein (DUF1645)		
AT2G31130	hypothetical protein		
AT5G49560	Putative methyltransferase family protein		
AT3G15280	hypothetical protein		
AT3G20340	Expression of the gene is downregulated in the presence of paraquat, an inducer of photooxidative stress.		
AT3G25400	dCTP pyrophosphatase-like protein		
AT2G43120	Encodes a member of the functionally diverse cupin protein superfamily that is involved in susceptibility to the bacterial plant pathogen <i>Ralstonia solanacearum</i> . It stabilizes the papain-like cysteine protease XCP2. The mRNA is cell-to-cell mobile.		
AT2G26355	Natural antisense transcript overlaps with AT2G26360. The RNA is cell-to-cell mobile.		
AT2G43010	Isolated as a semidominant mutation defective in red -light responses. Encodes a nuclear localized bHLH protein that interacts with active PhyB protein. Negatively regulates phyB mediated red light responses. Involved in shade avoidance response. Protein abundance is negatively regulated by PhyB. Involved in the regulation of response to nutrient levels. Controls the resistance to <i>B. cinerea</i> in a COI1- and EIN2-dependent manner.		
AT4G01870	tolB protein-like protein		
AT1G70420	DNA ligase-like protein, putative (DUF1645)		
AT4G13180	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein		
AT5G04000	hypothetical protein		
AT3G49790	Carbohydrate-binding protein		
AT5G63790	Encodes a member of the NAC family of transcription factors. ANAC102 appears to have a role in mediating response to low oxygen stress (hypoxia) in germinating seedlings. Its expression can be induced by beta-		

	cyclocitral, an oxidized by-product of beta-carotene generated in the chloroplasts, mediates a protective retrograde response that lowers the levels of toxic peroxides and carbonyls, limiting damage to intracellular components.		
AT1G56660	MAEBL domain protein		
AT3G47160	RING/U-box superfamily protein		
AT1G21010	PADRE protein up-regulated after infection by <i>S. sclerotiorum</i> .		
AT4G36600	Late embryogenesis abundant (LEA) protein		
AT5G59080	hypothetical protein		
AT5G66790	Protein kinase superfamily protein		
AT5G54300	cotton fiber-like protein (DUF761)		
AT1G78070	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein		
AT5G18130	transmembrane protein		
AT5G11970	ABC family ABC transporter, putative (DUF3511)		
AT5G56100	glycine-rich protein / oleosin		
AT5G18450	encodes a member of the DREB subfamily A-2 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain. There are eight members in this subfamily including DREB2A AND DREB2B that are involved in response to drought.		
AT4G15260	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein		
AT4G27530	hypothetical protein		
AT4G32480	Phosphorus (P) stress-inducible DUF506 gene family member		
AT5G67360	Encodes a subtilisin-like serine protease essential for mucilage release from seed coats.	(ARA12)	SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE 1.7 (SBT1.7) (ARA12)
AT1G01720	Belongs to a large family of putative transcriptional activators with NAC domain. Transcript level increases in response to wounding and abscisic acid. ATAF1 attenuates ABA signaling and synthesis. Mutants are hypersensitive to ABA. The mRNA is cell-to-cell mobile.	(ATAF1)	(ATAF1) (ANAC2) ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2 (ANAC002)
AT5G08790	induced by wounding, belongs to a large family of putative transcriptional activators with NAC domain.	(ATAF2)	ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 81 (anac081) (ATAF2)
AT4G37390	Encodes an IAA-amido synthase that conjugates Asp and other amino acids to auxin in vitro. Lines carrying insertions in this gene are hypersensitive to auxin. May function as a negative component in auxin signaling by regulating auxin activity.	(BRU6)	(GH3.2) (BRU6) YADOKARI 1 (YDK1) AUXIN UPREGULATED 3 (AUR3) (GH3-2)
AT1G69890			



	Encodes a member of a conserved DUF domain family that is induced by NO. Based on mutant phenotype may be involved in NO stress response.	(DUF569)	(DUF569)
AT1G54050	HSP20-like chaperones superfamily protein	(HSP17.4B)	(HSP17.4B)
AT2G29500	HSP20-like chaperones superfamily protein.	(HSP17.6B)	(HSP17.6B)
AT2G18340	Late embryogenesis abundant (LEA) protein involved in drought tolerance and participate in stomatal density.	(LEA13)	(LEA13)
AT5G26340	Encodes a protein with high affinity, hexose-specific/H <sup>+</sup> symporter activity. The activity of the transporter appears to be negatively regulated by phosphorylation. Importantly, microarray analysis, as well as the study of the expression of this gene in mutants involved in programmed cell death (PCD) demonstrated a tight correlation between this gene's expression and PCD.	(MSS1)	(MSS1) SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13 (ATSTP13) SUGAR TRANSPORT PROTEIN 13 (STP13)
AT1G32640	Encodes a MYC-related transcriptional activator with a typical DNA binding domain of a basic helix-loop-helix leucine zipper motif. Binds to an extended G-Box promoter motif and interacts with Jasmonate ZIM-domain proteins. MYC2 interacts with EIN3 and EIL1 to repress hook curvature and resistance to Botrytis cinera. Its transcription is induced by dehydration stress, ABA treatment and blue light via CRY1. Negative regulator of blue light-mediated photomorphogenic growth and blue and far-red-light-regulated gene expression. Positive regulator of lateral root formation. Regulates diverse JA-dependent functions. Negatively regulates Trp metabolism and biosynthesis of Trp-derived secondary metabolites. Positively regulates flavonoid biosynthesis, resistance to insects, and response to oxidative stress. Regulates other transcription factors, and negatively regulates its own expression. For example it binds to and regulates the expression of NST1. Its stability is modulated by PUB10 through polyubiquitination.	(MYC2)	(ATMYC2) (RD22BP1) JASMONATE INSENSITIVE 1 (JAI1) JASMONATE INSENSITIVE 1 (JIN1) (MYC2) (ZBF1)
AT1G21000	PLATZ transcription factor family protein	(PLATZ1)	(PLATZ1) ABA-INDUCED EXPRESSION 1 (AIN1)
AT1G62420	Phosphorus (P) stress-inducible DUF506 gene family member; overexpression represses root hair growth; interacts with calmodulins; influences on root hair [Ca <sup>2+</sup> ]cyt oscillation .	(RXR3)	(RXR3)
AT1G14200	E3 ligase involved in the regulation of the homeostasis of sensor NLR immune receptors.	(SNIPER1)	(SNIPER1) (USR1)
AT4G23050	Raf-like kinase involved in TMB induced seed dormancy.	(TES1)	(TES1)
AT1G62300	Encodes a transcription factor WRKY6. Regulates Phosphate1 (Pho1) expression in response to low phosphate (Pi) stress.	(WRKY6)	(WRKY6) (ATWRKY6)
AT1G49720	Identified as a protein that binds to abscisic acid response elements. May mediate transcriptional regulation of ABA responses.	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR 1 (ABF1)	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR 1 (ABF1) (ATABF1)
AT4G34000	Encodes an ABA-responsive element-binding protein with similarity to transcription factors that is expressed in response to stress and abscisic acid.	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3 (ABF3)	ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING FACTOR 3 (ABF3) DC3 PROMOTER-BINDING FACTOR 5 (DPBF5) (ATABF3)
AT5G27610	protein ALWAYS EARLY 1	ALWAYS EARLY 1 (ALY1)	ALWAYS EARLY 1 (ALY1) ARABIDOPSIS THALIANA ALWAYS EARLY 1 (ATALY1)

AT4G15236	ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein	ATP-BINDING CASSETTE G43 (ABCG43)	ATP-BINDING CASSETTE G43 (ABCG43)
AT3G22910	ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	AUTO-INHIBITED CA2+ ATPASE 13 (ACA13)	
AT3G07390	isolated from differential screening of a cDNA library from auxin-treated root culture. sequence does not show homology to any known proteins and is predicted to be extracellular. The mRNA is cell-to-cell mobile.	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 12 (AIR12)	AUXIN-INDUCED IN ROOT CULTURES 12 (AIR12)
AT1G42990	bZIP60 consists of a bZIP DNA binding domain followed by a putative transmembrane domain. bZIP60 mRNA is upregulated by the addition of ER stress inducers, tunicamycin (inhibitor of N-linked glycosylation), DTT (inhibitor of disulfide bond formation) and azetin-2-carboxylate (proline analog perturbing protein structure). Upon ER stress, bZIP60 mRNA is spliced by IRE1A and IRE1B to produce bZIP60-S, an active transcription factor without the transmembrane domain. bZIP60-U, a product of unspliced form of bZIP60 mRNA, is localized at the ER membrane and bZIP60-S is localized in the nucleus.	BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60 (BZIP60)	BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60 (ATBZIP60) BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60 (BZIP60) BASIC REGION/LEUCINE ZIPPER MOTIF 60 (BZIP60)
AT1G59640	A basic helix-loop-helix encoding gene (BIGPETAL, BPE) involved in the control of petal size. BPE is expressed via two mRNAs derived from an alternative splicing event. The BPEub (AT1G59640.1) transcript is expressed ubiquitously, whereas the BPEp (AT1G59640.2) transcript is preferentially expressed in petals. Plants that lack the petal-expressed variant BPEp have larger petals as a result of increased cell size. BPEp is positively regulated downstream of APETALA3, PISTILLATA, APETALA1 and PISTILLATA3 and is negatively regulated downstream of AGAMOUS.	BIG PETAL P (BPEP)	(ZCW32) BIG PETAL P (BPEP) BIG PETAL (BPE)
AT1G19350	Encodes brassinosteroid (BR) signalling protein that accumulates in the nucleus as dephosphorylated form in response to BRs. Is phosphorylated by the BIN2 GSK3 kinase. It synergistically interacts with BIM1 to bind to E box sequences (CANNTG). The protein contains a nuclear localization signal (NLS), followed by a highly conserved amino-terminal domain (N) shared by all family members, a BIN2 phosphorylation domain (P), a PEST motif, involved in protein degradation in the absence of BR, and a carboxyl-terminal domain. BES1 can interact with the ELF6 and REF6 Jumonji N/C-domain containing proteins and may direct them to modify histone methylation upstream of some brassinosteroid responsive-genes. Works with BRAVO to regulate QC division in the root. AT1G19350.3(BES1-L) is the long isoform of BES1. It contains an additive N-terminal NLS compared with the canonical BES1-S. This recently evolved isoform is expressed specifically in the Arabidopsis lineage	BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1)	BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) BRASSINAZOLE-RESISTANT 2 (BZR2) (BES1-L)
AT1G19490	Putative bZIP transcription factor. Expression is induced by drought and mutants are sensitive to drought.	BZIP TF 62 (BZIP62)	BZIP TF 62 (BZIP62)
AT5G51990	encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF4). The protein contains one AP2 domain. There are six members in this subfamily, including CBF1, CBF2, and CBF3. This gene is involved in response to drought stress and abscisic acid treatment, but not to low temperature.	C-REPEAT-BINDING FACTOR 4 (CBF4)	DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING PROTEIN 1D (DREB1D) C-REPEAT-BINDING FACTOR 4 (CBF4)
AT4G25490	Transcriptional activator that binds to the DRE/CRT regulatory element and induces COR (cold-regulated) gene expression increasing plant freezing tolerance. It encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF1). The protein contains one AP2 domain. There are six members in this subfamily, including CBF1, CBF2, and CBF3. This gene is involved in response to low temperature and abscisic acid.	C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 1 (CBF1)	C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 1 (CBF1) DRE BINDING PROTEIN 1B (DREB1B) (ATCBF1)
AT4G25470	Encodes a member of the DREB subfamily A-1 of ERF/AP2 transcription factor family (CBF2). The protein contains one AP2 domain. There are six members in this subfamily, including CBF1, CBF2, and CBF3. This gene is	C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 2 (CBF2)	C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 2 (CBF2) DRE/CRT-

	involved in response to low temperature, abscisic acid, and circadian rhythm. Overexpressing this gene leads to increased freeze tolerance and induces the expression level of 85 cold-induced genes and reduces the expression level of 8 cold-repressed genes, which constitute the CBF2 regulon. Mutations in CBF2 increases the expression level of CBF1 and CBF3, suggesting that this gene may be involved in a negative regulatory or feedback circuit of the CBF pathway.		BINDING PROTEIN 1C (DREB1C) FREEZING TOLERANCE QTL 4 (FTQ4) (ATCBF2)
AT3G51920	encodes a divergent member of calmodulin, which is an EF-hand family of Ca <sup>2+</sup> -binding proteins. This gene is expressed in leaves, flowers and siliques. The gene functionally complements yeast calmodulin 1 (CAM1) but only when selected against the plasmid harboring wild-type yeast sequences. Also the protein does not form a complex with a basic amphiphilic helical peptide in the presence of Ca <sup>2+</sup> in vitro. Authors suggest that this gene may represent a Ca <sup>2+</sup> -binding sensor protein that interacts with a more limited set of target proteins than do more conventional CaM isoforms. Mutations in this gene alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid.	CALMODULIN 9 (CAM9)	CALMODULIN 9 (CAM9) CALMODULIN LIKE PROTEIN 9 (CML9) (ATCML9)
AT2G25625	Histone deacetylase-like protein. Induced by senescence and abiotic stresses.	CHLOROPLAST VESICULATION (CV)	CHLOROPLAST VESICULATION (CV)
AT4G11140	Encodes a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-5 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain. There are 7 members in this subfamily. CRF proteins relocate to the nucleus in response to cytokinin.	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 1 (CRF1)	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 1 (CRF1)
AT5G01880	RING/U-box superfamily protein	DAF-LIKE GENE 2 (DAFL2)	ARABIDOPSIS T??XICOS EN LEVADURA 74 (ATL74) DAF-LIKE GENE 2 (DAFL2)
AT5G04760	R-R-type MYB protein which plays negative roles in salt stress and is required for ABA signaling in Arabidopsis.	DIVARICATA2 (DIV2)	DIVARICATA2 (DIV2)
AT3G14990	Encodes a homolog of animal DJ-1 superfamily protein. In the A. thaliana genome, three genes encoding close homologs of human DJ-1 were identified AT3G14990 (DJ1A), AT1G53280 (DJ1B) and AT4G34020 (DJ1C). Among the three homologs, DJ1C is essential for chloroplast development and viability. It exhibits glyoxalase activity towards glyoxal and methylglyoxal. The mRNA is cell-to-cell mobile.	DJ-1 HOMOLOG A (DJ1A)	DJ-1 HOMOLOG A (DJ1A) DJ-1 HOMOLOG A (AtDJ1A) (DJ-1A)
AT5G05410	Encodes a transcription factor that specifically binds to DRE/CRT cis elements (responsive to drought and low-temperature stress). Belongs to the DREB subfamily A-2 of ERF/AP2 transcription factor family (DREB2A). There are eight members in this subfamily including DREB2B. The protein contains one AP2 domain. Overexpression of transcriptional activation domain of DREB2A resulted in significant drought stress tolerance but only slight freezing tolerance in transgenic Arabidopsis plants. Microarray and RNA gel blot analyses revealed that DREB2A regulates expression of many water stress?inducible genes. The mRNA is cell-to-cell mobile.	DRE-BINDING PROTEIN 2A (DREB2A)	DRE-BINDING PROTEIN 2A (DREB2A) DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 2 (DREB2)
AT1G64110	Target promoter of the male germline-specific transcription factor DUO1.	DUO1-ACTIVATED ATPASE 1 (DAA1)	DUO1-ACTIVATED ATPASE 1 (DAA1)
AT2G17840	Identified as drought-inducible gene by differential hybridization. Upregulated by high light, drought, cold and salt stress determined by microarray analysis.	EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7 (ERD7)	EARLY-RESPONSIVE TO DEHYDRATION 7 (ERD7)
AT4G32800	encodes a member of the DREB subfamily A-4 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain. There are 17 members in this subfamily including TINY.	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 43 (ERF043)	ETHYLENE RESPONSE FACTOR 43 (ERF043)
AT5G47220	Encodes a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor family (ATERF-2). The protein contains one AP2 domain. Functions as activator of GCC box?dependent transcription.	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2 (ERF2)	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING

	Positive regulator of JA-responsive defense genes and resistance to <i>F. oxysporum</i> and enhances JA inhibition of root elongation.		FACTOR 2 (ERF2) ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR 2 (ATERF2) ETHYLENE RESPONSE FACTOR- 2 (ATERF-2)
AT1G79270	evolutionarily conserved C-terminal region 8	EVOLUTIONARILY CONSERVED C- TERMINAL REGION 8 (ECT8)	EVOLUTIONARILY CONSERVED C- TERMINAL REGION 8 (ECT8)
AT3G45970	member of EXPANSIN-LIKE. Naming convention from the Expansin Working Group (Kende et al, 2004. Plant Mol Bio) The mRNA is cell-to-cell mobile.	EXPANSIN-LIKE A1 (EXLA1)	EXPANSIN-LIKE A1 (ATEXLA1) EXPANSIN L1 (EXPL1) (ATEXPL1) (ATHEXP BETA 2.1) EXPANSIN-LIKE A1 (EXLA1)
AT4G21510	F-box family protein; mutant is hypersensitive to salt stress.	F-BOX STRESS INDUCED 2 (FBS2)	F-BOX STRESS INDUCED 2 (FBS2) (ATFBS2)
AT1G23020	Encodes a ferric chelate reductase whose transcription is regulated by FIT1. Expressed in the root, shoot, flower and cotyledon.	FERRIC REDUCTION OXIDASE 3 (FRO3)	FERRIC REDUCTION OXIDASE 3 (FRO3)
AT4G36730	member of a gene family encoding basic leucine zipper proteins (GBFs) which bind the G-box	G-BOX BINDING FACTOR 1 (GBF1)	G-BOX BINDING FACTOR 1 (GBF1) (ATGBF1)
AT4G34590	Encodes a basic domain leucine zipper (bZip) transcription factor bZIP11. Translation is repressed by sucrose that results in ribosome stalling in the uORF2. Directly regulates gene expression of ASN1 and ProDH2, which are enzyme-coding genes involved in amino acid metabolism. Susceptibility factor during <i>Pseudomonas syringae</i> infection.	G-BOX BINDING FACTOR 6 (GBF6)	(ATB2) G-BOX BINDING FACTOR 6 (GBF6) (ATBZIP11) (BZIP11) ARABIDOPSIS THALIANA BASIC LEUCINE-ZIPPER 11 (AtbZIP11)
AT2G47180	GolS1 is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. GolS1 transcript levels rise in response to methyl viologen, an oxidative damage-inducing agent. Plants over-expressing GolS1 have increased tolerance to salt, chilling, and high-light stress.	GALACTINOL SYNTHASE 1 (GolS1)	GALACTINOL SYNTHASE 1 (GolS1) GALACTINOL SYNTHASE 1 (AtGolS1)
AT1G56600	GolS2 is a galactinol synthase that catalyzes the formation of galactinol from UDP-galactose and myo-inositol. GolS2 transcript levels rise in response to methyl viologen, an oxidative damage-inducing agent. Plants over-expressing GolS2 have increased tolerance to salt, chilling, and high-light stress.	GALACTINOL SYNTHASE 2 (GolS2)	GALACTINOL SYNTHASE 2 (AtGolS2) GALACTINOL SYNTHASE 2 (GolS2)
AT1G02400	Encodes a gibberellin 2-oxidase that acts on C19 gibberellins but not C20 gibberellins.	GIBBERELLIN 2- OXIDASE 6 (GA2OX6)	ARABIDOPSIS THALIANA GIBBERELLIN 2- OXIDASE 6 (ATGA2OX4) ARABIDOPSIS THALIANA GIBBERELLIN 2- OXIDASE 6 (ATGA2OX6) GIBBERELLIN 2- OXIDASE 6 (GA2OX6)
AT3G51910			DOWNSTREAM TARGET OF AGL15 1 (DTA1)

	member of Heat Stress Transcription Factor (Hsf) family The mRNA is cell-to-cell mobile.	HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A7A (HSFA7A)	ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A7A (AT-HSFA7A) HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A7A (HSFA7A)
AT2G36950	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN 20 (ATHMP20)	HEAVY METAL ASSOCIATED PROTEIN 20 (ATHMP20) HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 2 (HAI2) AKT1 INTERACTING
AT1G07430	Encodes a member of the group A protein phosphatase 2C (PP2C) family that is responsible for negatively regulating seed dormancy.	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 2 (HAI2)	PROTEIN PHOSPHATASE 1 (AIP1) (ATAIP1) HONSU (KOREAN FOR ABNORMAL DROWSINESS) (HON)
AT2G29380	highly ABA-induced PP2C protein 3	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 3 (HAI3)	HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 3 (HAI3)
AT2G18050	encodes a structurally divergent linker histone whose gene expression is induced by dehydration and ABA. The mRNA is cell-to-cell mobile.	HISTONE H1-3 (HIS1-3)	HISTONE H1-3 (HIS1-3) (HON3)
AT4G37580	involved in apical hook development. putative N-acetyltransferase	HOOKLESS 1 (HLS1)	HOOKLESS 1 (HLS1) CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 3 (COP3) UNUSUAL SUGAR RESPONSE 2 (UNS2)
AT5G05600	Encodes a protein with similarity to flavonol synthases that is involved in the detoxification polycyclic aromatic hydrocarbons. One of 4 paralogs encoding a 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent oxygenases that hydroxylates JA to 12-OH-JA.	JASMONIC ACID OXIDASE 2 (JOX2)	JASMONIC ACID OXIDASE 2 (JOX2) JASMONATE-INDUCED OXYGENASE2 (JAO2)
AT1G80440	Encodes a member of a family of F-box proteins, called the KISS ME DEADLY (KMD) family, that targets type-B ARR proteins for degradation and is involved in the negative regulation of the cytokinin response. Also named as KFB20, a member of a group of Kelch repeat F-box proteins that negatively regulate phenylpropanoid biosynthesis by targeting the phenylpropanoid biosynthesis enzyme phenylalanine ammonia-lyase. The mRNA is cell-to-cell mobile.	KISS ME DEADLY 1 (KMD1)	KELCH REPEAT F-BOX 20 (KFB20) KISS ME DEADLY 1 (KMD1)
AT2G35300	Encodes LEA4-2/LEA18, a member of the Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins which typically accumulate in response to low water availability conditions imposed during development or by the environment.	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 18 (LEA18)	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 18 (LEA18) LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-2 (LEA4-2) LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-2 (AtLEA4-2)
AT4G30980		LJRHL1-LIKE 2 (LRL2)	

	<p>Encodes a basic helix-loop-helix (bHLH) protein that regulates root hair and sperm cell development. One of the three Arabidopsis homologs of the Lotus japonicus Roothairless1 (LjRHL1) gene: At2g24260 (AtLRL1), At4g30980 (AtLRL2), and At5g58010 (AtLRL3).</p> <p>A member of a large family of seven-transmembrane domain proteins specific to plants, homologs of the barley mildew resistance locus o (MLO) protein. The Arabidopsis genome contains 15 genes encoding MLO proteins, with localization in plasma membrane. Phylogenetic analysis revealed four clades of closely-related AtMLO genes. ATMLO6 belongs to the clade IV, with AtMLO2, AtMLO3 and AtMLO12. The gene is expressed during early seedling growth, in root tips and cotyledon vascular system, in floral organs (anthers and stigma), and in fruit abscission zone, as shown by GUS activity patterns. The expression of several phylogenetically closely-related AtMLO genes showed similar or overlapping tissue specificity and analogous responsiveness to external stimuli, suggesting functional redundancy, co-function, or antagonistic function(s).</p>		<p>DEFECTIVE REGION OF POLLEN 2 (DROP2) LjRHL1-LIKE 2 (LRL2)</p>
AT2G39200		MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12 (MLO12)	<p>MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12 (MLO12)</p> <p>MILDEW RESISTANCE LOCUS O 12 (ATMLO12)</p>
AT1G19850	<p>Encodes a transcription factor (IAA24) mediating embryo axis formation and vascular development. Similar to AUXIN RESPONSIVE FACTOR 1 (ARF1) shown to bind to auxin responsive elements (AREs), and to the maize transcriptional activator VIVIPAROUS 1 (VP1). In situ hybridization shows expression in provascular tissue of embryos, the emerging shoot primordia, then is restricted to provascular tissue, and in the root central vascular cylinder.</p>	MONOPTEROS (MP)	<p>MONOPTEROS (MP)</p> <p>AUXIN RESPONSE FACTOR 5 (ARF5)</p> <p>INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 24 (IAA24) MOVEMENT PROTEIN (MP)</p>
AT2G46770	<p>NAC transcription factor NST1. NST1 and NST2 are redundant in regulating secondary wall thickening in anther walls and siliques. An NST1 promoter fusion was detected in various tissues in which lignified secondary walls develop. Both MYC2 and MYC4 bind to the NST1 promoter and appear to regulate its expression in response to blue light.</p>	NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST1)	<p>NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 (NST1)</p> <p>EMBRYO DEFECTIVE 2301 (EMB2301)</p> <p>ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 43 (ANAC043)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2 (ATNAC2)</p> <p>ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 56 (ANAC056)</p> <p>NAC-REGULATED SEED MORPHOLOGY 1 (NARS1)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2 (NAC2)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3 (ATNAC3)</p>
AT3G15510	<p>Note of caution: not to be confused with another protein (AtNAC6 locus AT5G39610) which on occasion has also been referred to as AtNAC2.</p>	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2 (NAC2)	<p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 56 (ANAC056)</p> <p>NAC-REGULATED SEED MORPHOLOGY 1 (NARS1)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 2 (NAC2)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3 (ATNAC3)</p>
AT3G15500	<p>Encodes an ATAF-like NAC-domain transcription factor that doesn't contain C-terminal sequences shared by CUC1, CUC2 and NAM. Note: this protein (AtNAC3) is not to be confused with the protein encoded by locus AT3G29035, which, on occasion, has also been referred to as AtNAC3. The mRNA is cell-to-cell mobile.</p>	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 3 (NAC3)	<p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 55 (ANAC055)</p> <p>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 55 (NAC055)</p>

AT3G04070	NAC domain containing protein 47	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 47 (NAC047)	PROTEIN 3 (NAC3) (ANAC55) NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 47 (anac047) NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 47 (NAC047) SPEEDY HYPONASTIC GROWTH (SHG) SPEEDY HYPONASTIC GROWTH (SHYG) NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 89 (anac089) NTM1-LIKE 14 (NTL14)
AT5G22290	Encodes ANAC089, a membrane-tethered transcription factor that negatively regulates floral initiation. Also controls ER-stress-induced programmed cell death.	NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 89 (NAC089)	FRUCTOSE-SENSING QUANTITATIVE TRAIT LOCUS 6 (FSQ6) NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 89 (NAC089) NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI (NAP) ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 29 (ANAC029) NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI (ATNAP)
AT1G69490	Encodes a member of the NAC transcription factor gene family. It is expressed in floral primordia and upregulated by AP3 and PI. Its expression is associated with leaf senescence. The mRNA is cell-to-cell mobile.	NAC-LIKE, ACTIVATED BY AP3/PI (NAP)	
AT3G11580	SOD7 encodes nuclear localized B3 DNA binding domain and a transcriptional repression motif. Belongs to the RAV gene family. Functions in regulation of seed size and binds to and represses KLU. Transcription repressor involved in regulation of inflorescence architecture. Required for axillary meristem formation and acts by repression of CUC2/CUC3. Based on expression patterns, it is not required for stem cell specification during embryo shoot apical meristem initiation.	NGATHA-LIKE PROTEIN2 (NGAL2)	NGATHA-LIKE PROTEIN2 (NGAL2) SUPPRESSOR OF DA1-1 (SOD7)
AT3G61970	AP2/B3-like transcriptional factor family protein	NGATHA2 (NGA2)	NGATHA2 (NGA2)
AT1G30100	Encodes 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in the biosynthesis of abscisic acid. The expression of this gene increases during the first 6h of imbibition.	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5 (NCED5)	NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5 (NCED5) NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 5 (ATNCED5)
AT4G22920	Similar to the tomato senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1. It is upregulated during maximal senescence in the Arabidopsis life cycle, especially in senescent leaves. Acts antagonistically with SGR2 to balance chlorophyll catabolism in chloroplasts with the dismantling and remobilizing of other cellular components in senescing leaf cells.	NON-YELLOWING 1 (NYE1)	NON-YELLOWING 1 (ATNYE1) NON-YELLOWING 1 (NYE1) STAY-GREEN (SGR) STAY-GREEN 1 (SGR1)
AT1G69870	Encodes a low affinity nitrate transporter NRT1.7. Expressed in phloem. Responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. The mRNA is cell-to-cell mobile.	NRT1/ PTR FAMILY 2.13 (NPF2.13)	NITRATE TRANSPORTER 1.7 (NRT1.7) (ATNPF2.13) NRT1/

AT1G14860	nudix hydrolase homolog 18	NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 18 (NUDT18)	PTR FAMILY 2.13 (NPF2.13) NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 18 (NUDT18) NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 18 (atnudt18)
AT2G01490	Encodes a phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (PAHX). The mRNA is cell-to-cell mobile.	PHYTANOYL-COA 2- HYDROXYLASE (PAHX)	PHYTANOYL-COA 2- HYDROXYLASE (PAHX)
AT3G59220	encodes a cupin-domain containing protein that is similar to pirins which interact with a CCAAT box binding transcription factor. The protein interacts with GPA1 (G protein alpha-subunit) in vitro. Mutants in the gene are affected in germination and early seedling development.	PIRIN (PRN)	PIRIN (PRN) (PRN1) (ATPIRIN1)
AT4G26050	Encodes PIRL8, a member of the Plant Intracellular Ras-group-related LRRs (Leucine rich repeat proteins). PIRLs are a distinct, plant-specific class of intracellular LRRs that likely mediate protein interactions, possibly in the context of signal transduction. The mRNA is cell-to-cell mobile.	PLANT INTRACELLULAR RAS GROUP-RELATED LRR 8 (PIRL8)	PLANT INTRACELLULAR RAS GROUP-RELATED LRR 8 (PIRL8) (CMF6)
AT4G34410	Encodes a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-3 of ERF/AP2 transcription factor family. The protein contains one AP2 domain. There are 18 members in this subfamily including ATERF-1, ATERF-2, AND ATERF-5. Regulates programmed cell death (PCD) inhibitor genes. Involved in retarding programmed cell death under salt stress due to the regulation of processes participating in ROS inhibition. ERF-regulated transcripts belong to the tryptophan biosynthesis, tryptophan metabolism, and downstream plant hormone signal transduction pathways, where ERF109 potentially acts as a 'master switch' mediator of a cascade of consecutive events across the three pathways, promoting plant growth and re-adjustment to homeostasis due the direct participation in auxin biosynthesis leading to the plants ability to tolerate salt stress.	REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 (RRTF1)	REDOX RESPONSIVE TRANSCRIPTION FACTOR 1 (RRTF1) ETHYLENE RESPONSE FACTOR 109 (ERF109)
AT5G59820	Encodes a zinc finger protein involved in high light and cold acclimation. Overexpression of this putative transcription factor increases the expression level of 9 cold-responsive genes and represses the expression level of 15 cold-responsive genes, including CBF genes. Also, lines overexpressing this gene exhibits a small but reproducible increase in freeze tolerance. Because of the repression of the CBF genes by the overexpression of this gene, the authors speculate that this gene may be involved in negative regulatory circuit of the CBF pathway. The mRNA is cell-to-cell mobile.	RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41 (RHL41)	RESPONSIVE TO HIGH LIGHT 41 (RHL41) (ATZAT12) (ZAT12)
AT5G17490	Encodes a DELLA subfamily member that acts as a negative regulator of GA signaling and as a coactivator of ABI3 to promote seed storage protein biosynthesis during the seed maturation stage.	RGA-LIKE PROTEIN 3 (RGL3)	RGA-LIKE PROTEIN 3 (RGL3) (AtRGL3)
AT4G11360	Encodes a putative RING-H2 finger protein RHA1b. The mRNA is cell-to-cell mobile.	RING-H2 FINGER A1B (RHA1B)	RING-H2 FINGER A1B (RHA1B)
AT1G13245	ROTUNDIFOLIA like 17	ROTUNDIFOLIA LIKE 17 (RTFL17)	ROTUNDIFOLIA LIKE 17 (RTFL17) DEVIL 4 (DVL4)
AT1G16510	Encodes a clade III SAUR gene with a distinctive expression pattern in root meristems. It is normally expressed in the quiescent center and cortex/endodermis initials and upon auxin stimulation, the expression is found in the endodermal layer. Overexpression studies suggest roles in cell expansion and auxin transport.	SMALL AUXIN UPREGULATED 41 (SAUR41)	SMALL AUXIN UPREGULATED 41 (SAUR41)
AT4G36930		SPATULA (SPT)	SPATULA (SPT)



AT5G60220	Encodes a transcription factor of the bHLH protein family. Mutants have abnormal, unfused carpels and reduced seed dormancy. Member of TETRASPANIN family	TETRASPANIN4 (TET4)	TETRASPANIN4 (TET4)
AT1G08320	bZIP transcription factor family protein	TGACG (TGA) MOTIF-BINDING PROTEIN 9 (TGA9)	(bZIP21) TGACG (TGA) MOTIF-BINDING PROTEIN 9 (TGA9)
AT4G09820	TT8 is a regulation factor that acts in a concerted action with TT1, PAP1 and TTG1 on the regulation of flavonoid pathways, namely proanthocyanidin and anthocyanin biosynthesis. Affects dihydroflavonol 4-reductase gene expression. It is thought that a ternary complex composed of TT2, TT8 and TTG1 is necessary for correct expression of BAN in seed endothelium. Also important for important for marginal trichome development. It binds the promoter of both AT3G26790 and AT1G28300. TT8 interacts with JAZ proteins to regulate anthocyanin accumulation. TT8 acts maternally to affect seed FA biosynthesis and inhibits seed FA accumulation by down-regulating a group of genes either critical to embryonic development or important in the FA biosynthesis pathway. TT8 represses the activities of LEAFY COTYLEDON1, LEAFY COTYLEDON2, and FUSCA3, the critical transcriptional factors important for seed development.	TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)	TRANSPARENT TESTA 8 (TT8) (BHLH42) (ATTT8)
AT3G56330	Involved in posttranscriptional modification of plastid tRNA.	TRNA METHYLTRANSFERASE 1C (TRM1C)	TRNA METHYLTRANSFERASE 1C (TRM1C) (ATTRM1C)
AT4G23920	Encodes a protein with UDP-D-glucose 4-epimerase activity. Involved in growth and cell wall carbohydrate biosynthesis.	UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 2 (UGE2)	UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 2 (UGE2)
AT4G10960	Encodes a protein with UDP-D-glucose 4-epimerase activity.	UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 5 (UGE5)	UDP-D-GLUCOSE/UDP-D-GALACTOSE 4-EPIMERASE 5 (UGE5)
AT1G07240	Encodes a UDP-glucosyltransferase that plays a role in abscisic acid (ABA) glucosylation from ABA to ABA-glucose ester and regulates ABA homeostasis, thereby influencing the ABA signal network.	UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 71C5 (UGT71C5)	UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 71C5 (UGT71C5)
AT3G58450	USP domain containing protein, member of the universal stress protein family, regulated by ABA and possibly regulated by the ABA-dependent transcription factor AREB/ABF. Involved in the regulation of seed germination.	UNIVERSAL STRESS PROTEIN (USP)	UNIVERSAL STRESS PROTEIN (USP) GERMINATION-RELATED UNIVERSAL STRESS PROTEIN (GRUSP)
AT1G16730	hypothetical protein	UNKNOWN PROTEIN 6 (UP6)	UNKNOWN PROTEIN 6 (UP6)
AT1G05680	Encodes a UDP-glucosyltransferase, UGT74E2, that acts on IBA (indole-3-butyric acid) and affects auxin homeostasis. The transcript and protein levels of this enzyme are strongly induced by H2O2 and may allow integration of ROS (reactive oxygen species) and auxin signaling. This enzyme can also transfer glycosyl groups to several compounds related to the explosive TNT when this synthetic compound is taken up from the environment.	URIDINE DIPHOSPHATE GLYCOSYLTRANSFERASE 74E2 (UGT74E2)	URIDINE DIPHOSPHATE GLYCOSYLTRANSFERASE 74E2 (UGT74E2)
AT3G28100	nodulin MtN21-like transporter family protein The mRNA is cell-to-cell mobile.	USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND	USUALLY MULTIPLE ACIDS MOVE IN AND

AT1G71930	Encodes a NAC-domain transcription factor with transcriptional activation activity that is involved in xylem formation. Induces transdifferentiation of various cells into protoxylem vessel elements. Located in the nucleus. Expression induced in the presence of auxin, cytokinin and brassinosteroids.	OUT TRANSPORTERS 45 (UMAMIT45)  VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 7 (VND7)	OUT TRANSPORTERS 45 (UMAMIT45) VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN 7 (VND7) ARABIDOPSIS NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 30 (ANAC030)
AT3G48260	Encodes a member of the WNK family (9 members in all) of protein kinases, the structural design of which is clearly distinct from those of other known protein kinases, such as receptor-like kinases and mitogen-activated protein kinases.	WITH NO LYSINE (K) KINASE 3 (WNK3)	WITH NO LYSINE (K) KINASE 3 (WNK3)
AT4G28240	Member of the wound-induced polypeptide (WIP) family. Positively regulates plant resistance against Pst DC3000 by enhancing PTI responses.	WOUND-INDUCED POLYPEPTIDE 1 (WIP1)	WOUND-INDUCED POLYPEPTIDE 1 (WIP1)
AT4G18170	Member of WRKY Transcription Factor; Group II-c. Involved in the activation of salicylic acid biosynthesis genes ICS1 and PBS3. In the ovule, it is expressed in hypodermal somatic cells and appears to play a role in suppression of megasporocyte cell fate. In the leaf it is upstream of FHY3 and regulates light-mediated leaf senescence.	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 28 (WRKY28)	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 28 (WRKY28) (AtWRKY28)
AT1G13960	Encodes WRKY DNA-binding protein 4 (WRKY4).	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 4 (WRKY4)	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 4 (WRKY4)
AT5G46350	member of WRKY Transcription Factor; Group II-c	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8 (WRKY8)	WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8 (WRKY8) ARABIDOPSIS THALIANA WRKY DNA-BINDING PROTEIN 8 (ATWRKY8)
AT2G32150	Encodes a xanthosine monophosphate (XMP)phosphatase. Dephosphorylates XMP to xanthosine as an initial step in purine nucleotide catabolism.	XMP-SPECIFIC PHOSPHATASE (XMPP)	XMP-SPECIFIC PHOSPHATASE (XMPP)

## Anexo X. Descripción de los factores de transcripción con menor expresión identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante *tt7*

Nombre Gen	Descripción TAIR	Funciones biológicas
AGL20	<a href="#">AT2G45660.1</a>	<p><b>AGAMOUS-like 20</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Importación de proteínas dentro del núcleo, respuesta a frío y giberelinas, regulación positiva del desarrollo floral y de la transcripción del tDNA y mantenimiento de la identidad de la inflorescencia del meristemo.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> Cascada MAPK, diferenciación celular, regulación positiva de la transcripción a partir del promotor de la RNA polimerasa II.</p> <p><b>Función molecular experimental:</b> Unión de factores de transcripción, actividad de factor de transcripción para la unión de secuencia específica de DNA.</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Regulador de la RNA polimerasa II para la unión de la región específica de secuencia del DNA.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo y citoplasma.</p>
PIF5	<a href="#">AT3G59060.2</a>	<p><b>Phytochrome interacting factor 3-like 6</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Fototransducción de luz roja/rojo lejano, respuesta a la baja afluencia de estímulos de luz azul por el sistema de baja fluencia de luz azul, regulador de procesos biosintéticos de auxinas, ruta de señalización mediada por auxinas y procesos biosintéticos de etileno.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> Regulación de la transcripción del tDNA.</p> <p><b>Función molecular experimental:</b> Unión a proteínas</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Actividad como factor de transcripción de unión a secuencia específica de DNA, unión a DNA y actividad para dimerizar proteínas.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>
PAP3	<a href="#">AT1G09530.1</a>	<p><b>Phytochrome interacting factor 3</b></p> <p><b>Procesos biológicos experimentales:</b> Detiolación, ruta de señalización mediada por Ácido Giberélico, ruta de señalización de luz roja/rojo lejano, regulación positiva de la ruta metabólica de la antocianina, regulación de la plantilla de DNA transcripcional.</p> <p><b>Procesos biológicos computacionales:</b> Fototransducción de la luz roja/rojo lejano.</p> <p><b>Función molecular experimental:</b> Unión a DNA y proteínas</p> <p><b>Función molecular computacional:</b> Actividad como factor de transcripción de unión a secuencia específica de DNA, actividad para dimerizar proteínas.</p> <p><b>Componente celular experimental:</b> Núcleo.</p>

**Anexo XI. Descripción de los genes diana comunes para los factores de transcripción menos expresados identificados en TF2Network para el análisis del embrión del mutante *tt7***

ID	Símbolo	Descripción	Funciones
AT1G67590	REM	Proteína de la familia de las remorinas	Actúa como respuesta a estímulos de luz. Se encuentra en el núcleo y el citoplasma
AT1G14580	BLU	Proteína dedo de zinc tipo C2H2	Participa en el desarrollo de la raíz y la división celular asimétrica
AT1G73830	BEE3	Proteína de potenciación de brasinoesteroides	Codifica el componente de señalización de brasinoesteroides BEE3. Modula positivamente el síndrome de evitación de la sombra en las plántulas de Arabidopsis. Regula la transcripción de la plantilla de DNA.
AT1G70940	PIN3	Proteína de transporte de auxinas	Regulador de la salida de auxina, está involucrado en el crecimiento diferencial expresándose en tejidos sensibles a la gravedad. Se acumula en la superficie celular lateral, localizándose en la membrana plasmática y en las vesículas. En las raíces, se expresa sin polaridad pronunciada en los niveles dos y tres de las células de la columela, en el lado basal de las células vasculares y en el lado lateral de las células del periciclo de la zona de elongación. Su sobreexpresión inhibe el crecimiento de las células de la raíz.
AT2G38120	AUX1	Proteína de transporte de auxinas	Codifica un transportador de entrada de auxina que reside en la membrana plasmática apical de las células del protoplasma en subpoblaciones altamente dinámicas del aparato de Golgi y endosomas en todos los tipos de células. Su acción en la cubierta de la raíz lateral y/o en las células epidérmicas influye en la iniciación y el posicionamiento de la raíz lateral. El amonio suministrado inhibe la emergencia de raíces laterales.
AT4G25490	CBF1	Proteína de tolerancia al frío	Activador transcripcional que se une al elemento regulador DRE/CRT e induce la expresión del gen COR (regulado por frío) aumentando la tolerancia a la congelación de las plantas. Codifica un miembro de la subfamilia DREB A-1 de la familia de factores de transcripción ERF/AP2 (CBF1). La proteína contiene un dominio AP2. Está implicado en la respuesta a la baja temperatura y al ácido abscísico.
AT2G42290	LRR-RLK	Proteína rica en repeticiones de leucina de la familia de las proteínas kinasas	Participa en procesos metabólicos de RNA, en la morfogénesis celular, citoquinesis y fosforilación
AT2G02080	IDD4	Factor de transcripción de la familia C2H2 BIRD	Regula positivamente la transcripción de la plantilla de DNA. Interviene en la división celular asimétrica y el desarrollo de la raíz