

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.



MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS.

**Identificación de componentes de la cubierta de
la semilla implicados en la longevidad.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
ALUMNO/A: AILÍN DIOS RÍOS**

**TUTORES: JOSE GADEA VACAS Y EDUARDO BUESO
RÓDENAS.**

Curso académico: 2015-2016

VALENCIA, ENERO 2016.

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Erosión genética.....	4
1.2. Conservación de la variabilidad genética	4
1.3. Longevidad de semilla	5
1.4. Factores que afectan a la longevidad	5
1.5. Origen y desarrollo de la cubierta.....	6
1.6. Estudios previos de longevidad en la cubierta.....	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Material biológico.....	13
3.1.1 Arabidopsis thaliana.....	13
3.1.2. Vectores de clonación y transformación	15
3.2 Cultivo y manejo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
3.2.1. Esterilización de semillas	16
3.2.2 Cultivo en medio sólido Murashige-Skoog (MS)	17
3.2.3. Ensayo de envejecimiento acelerado o CDT.....	17
3.3. Manipulación y cultivo de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	19
3.3.1. Medios de cultivo	19
3.3.1.1 Medio Luria-Bertani (LB)	19
3.3.2 Amplificación por PCR.....	19
3.3.3 Purificación productos PCR.....	21
3.3.4 Tratamiento del plásmido y ligación de los fragmentos	22
3.3.4.2 Tratamiento del plásmido	22
3.3.4.3 Ligación de los fragmentos obtenidos por PCR.....	22
3.3.5 Manipulación de <i>E. coli</i>	23
3.3.5.1 Transformación por choque térmico	23
3.3.6 Selección bacterias transformantes	23
3.3.7 Manipulación de <i>A. tumefaciens</i>	24
3.3.7.1 Obtención de competentes de <i>A. tumefaciens</i>	25
3.3.7.2 Inmersión de plantas de <i>A. thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i>	25

3.3.8 Selección líneas transformantes y obtención de homocigotos	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Implicación en la cubierta de diferentes compuestos.	27
4.2. Expresión de HB25 y COG1 en la semilla	42
4.2.1 Construcciones. Diseño de la clonación.....	42
4.2.2 Ensayos preliminares de expresión de GUS	43
4.2.3 Ensayos preliminares de expresión GFP	48
5. DISCUSIÓN.....	49
5.1. Importancia del mucilago en longevidad.....	49
5.2. Importancia del almidón en la longevidad.....	50
5.3. Importancia de la suberina en la longevidad.....	51
5.4. Implicación de las proantocianinas en la longevidad	52
6. BIBLIOGRAFÍA.....	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Erosión genética

A lo largo de la historia se han ido seleccionando las variedades mejor adaptadas a las condiciones climáticas y a las necesidades del ser humano mientras que multitud de especies vegetales dejaban de ser cultivadas reduciéndose así la variabilidad genética. Esta pérdida de biodiversidad se la conoce como erosión genética.

Este fenómeno deja abierta un problemática existente frente a la vulnerabilidad de las especies ante la aparición de nuevos patógenos que pudieran destruir la mayoría de los cultivos debido a la homogeneidad varietal.

Reconocida como un problema gran relevancia, en los últimos años se han puesto en marcha diferentes vías de conservación de la variabilidad genética y los recursos fitogenéticos (Iriando 2001).

1.2. Conservación de la variabilidad genética

La conservación de la variabilidad genética hace referencia al material hereditario con valor económico, científico o social presente en las especies (FAO, 1983) que, en el reino vegetal incluiría cualquier material de origen vegetal que mantenga su reproducibilidad y propagación.

Esta conservación se puede agrupar según sea a nivel génico, organismo, por individuos y el ecológico.

Los métodos que se utilizan se clasifican según el método de conservación, *in situ*, preservando las especies en su lugar de origen lo que permite la acción de los procesos evolutivos y el método de conservación *ex situ*, donde se conserva el material vegetal fuera del entorno natural con gran accesibilidad en contraposición a la limitación de variabilidad genética y la posibilidad de la pérdida del material por causas derivadas de la erosión genética.

La semilla es la unidad germinativa mediante la cual se propagan las plantas. Por lo que su conservación en bancos de germoplasma es el método más utilizado. Estas son las unidades diseminativas por excelencia debido a que la semilla es la portadora del material genético entre cuyas funciones importantes se encuentra el reconocimiento de

las condiciones favorables para la propagación, lo que implica diversos aspectos importantes.

Un aspecto importante es la viabilidad de la semilla como capacidad germinativa frente a condiciones favorables. Por otro lado, la dormancia o latencia, mecanismo que les permite la inhibición de la germinación antes condiciones poco favorables. Otro aspecto importante es el vigor, que determina la capacidad de germinación y el nivel de actividad de las semillas y por último la longevidad de la semilla, factor limitante en la agricultura que se define como la capacidad germinativa que poseen las semillas o tiempo que permanecen siendo viables frente a determinadas condiciones ambientales como son la humedad y la temperatura.

1.3. Longevidad de semilla

Tanto a nivel de bancos de germoplasma como en la agricultura dependen del potencial de germinación de las semillas.

La pérdida de la capacidad germinativa en la agricultura hace necesaria la compra anual de nuevas reservas generando costes adicionales que se ven reflejados en el beneficio final del agricultor. Por ello, para evitar estas pérdidas existen dos métodos de conservación que permiten mantener la capacidad germinativa en función de la temperatura y la humedad que dependerá a su vez del tipo de colección. A largo plazo la temperatura es de -18°C y una humedad comprendida entre 3% y el 7% mientras que las denominadas activas o corto plazo se conservan a una temperatura de entre 0 y 5°C con humedad de entre 7 y 8%.

1.4. Factores que afectan a la longevidad

Existen diversos factores que provocan la pérdida de viabilidad de las semillas siendo los que afectan a la longevidad aquellos que afectan al desarrollo de la semilla haciendo desaparecer su capacidad germinativa.

La pérdida de viabilidad vendrá determinada por tanto por el paso del tiempo y los diversos factores que actúen en ella por lo que numerosos estudios centran sus investigaciones en los distintos mecanismos que presenta la planta para prevenir este envejecimiento.

El principal factor que afecta a la semilla es el estrés oxidativo y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que esto conlleva. Capaces de modificar el estado celular lo que altera por tanto, al poder germinativo de la semilla esto hace necesario la presencia de mecanismos que controlen dicha producción.

Los compuestos antioxidantes como los flavonoides (Stevenson and Hurst, 2007) contra el estrés o la vitamina E implicada en la viabilidad de la semilla evitando la oxidación lipídica durante el almacenamiento, son algunos ejemplos de la importancia que poseen en la germinación de la semilla.

A parte de la acumulación de antioxidantes como barrera detoxificante, la planta posee otros mecanismos de protección de la semilla frente a la excesiva desecación como son las proteínas LEA (HSP) y azúcares (osmolitos) encargados del ajuste osmótico, que actúan como estabilizadores de membranas y proteínas del interior celular (Hoekstra *et al.*, 2001). Ambos trabajan en conjunción para evitar daños en el embrión y mantener su viabilidad frente a condiciones de estrés y por ácido abscísico (ABA) (Hand *et al.*, 2011).

Otro mecanismo de defensa encargado de la protección física de la semilla es la testa. La testa o cubierta deriva del tejido ovular, de origen materno y compuesto por un gran número de capas celulares (Figura 1.1).

En las plantas superiores es la encargada de la protección física del embrión frente a diferentes factores a los que se pudiera ver dañado o destruido. Esta protección está mediada principalmente por la imposición de dormancia lo que previene la germinación prematura y limitando todo tipo de agresiones externas que pudiera sufrir (Rajjou y Debeaujon, 2008).

1.5. Origen y desarrollo de la cubierta

El origen de la cubierta comienza a continuación de la fecundación dónde las células de los tegumentos del óvulo se diferencian dando lugar a las células del endotelio, empalizadas y la epidermis. De la capa más próxima al endotelio, las células son capaces de sintetizar proantocianidinas (PAs), conocidos como taninos, pertenecientes a la familia de los flavonoides, que se acumulan en las vacuolas como compuestos incoloros que, al oxidarse durante la desecación de la semilla, cambian su coloración al

marrón característico. Estos compuestos se han relacionado con numerosas funciones como la protección de la semilla limitando el efecto de las ROS.

La cubierta se desarrolla a partir de dos tegumentos que envuelven al óvulo maduro. El tegumento interno que se encuentra formado generalmente por una capa de tres células, y el tegumento externo formado por dos capas celulares, células epidérmicas y células de la empalizada (Gasser and Robinson-Beer, 1993; Schneitz *et al.*, 1995). Las células de la epidermis se produce la secreción de un polisacárido formado por pectinas, hidrofílico y soluble, el mucílago que se deposita en el apoplasto (Goto, 1985), mientras que, en las células de la empalizada, se produce la deposición de suberina (Haugh, G. y Chaudhury, A., 2005).

Por otro lado, se acumulan los gránulos de almidón muy cerca de las paredes externas e internas de las capas adyacentes de la cubierta. Aunque la acumulación sea en ambas capas celulares, solo la capa externa transformará este en mucílago para depositarlo entre la pared primaria celular y la membrana plasmática. Dicha acumulación provoca una reducción del protoplasma formando una especie de columna en el centro de la célula, estructura comúnmente denominada columela (Western *et al.*, 2000). Como consecuencia de la reducción producida, la vacuola de la célula tiende a fragmentarse o incluso, a desaparecer.

Una vez formada la columela comienza la degradación del almidón y se refuerza la columna protoplasmática mediante la formación de la pared secundaria. Este proceso continúa hasta que queda totalmente reforzado por la celulosa siendo el almidón indistinguible.

La continua producción de mucílago en las células externas provoca un aumento de la compresión de la capa secundaria de manera que el almidón va degradándose al mismo tiempo que se refuerza las paredes de las células internas. Una vez completado el proceso el mucílago se seca formando así una pared delgada que rodea la columna protoplasmática (Figura 1.2).

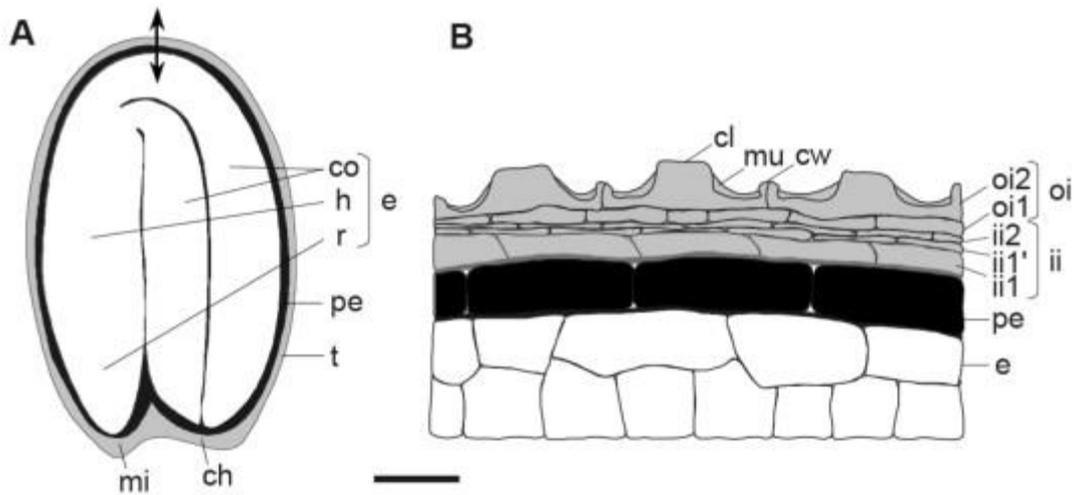


Figura 1.1: Organización de la semilla madura en *Arabidopsis*. A) Corte longitudinal de la semilla. B) Esquema de un corte transversal de la cubierta de la semilla. En ambos casos la barra equivale a 100 μm y la nomenclatura utilizada es: ch, chalaza; cl, columela; co, cotiledones; cw, pared celular; e, embrión; h, hipocotilo; ii, integumento interno; mi, micrópilo; mu, mucílago; oi, integumento externo; pe, endospermo periférico (aleurona); r, radícula; t, testa. Adaptado de Rajjou y Debeaujon, 2008.

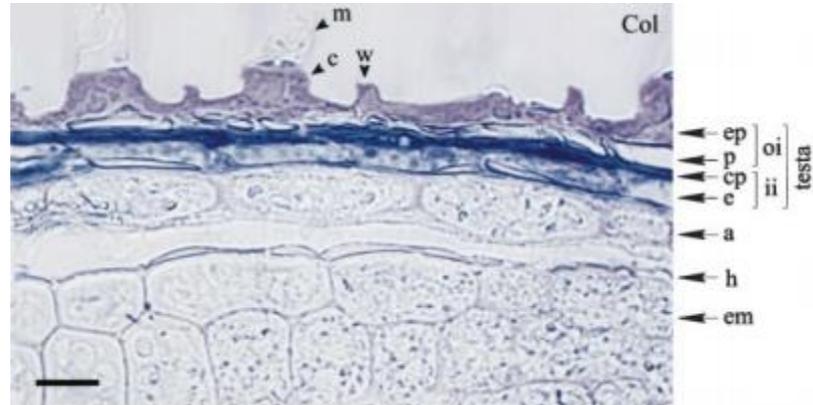


Figura 1.2: Organización de la semilla madura en *Arabidopsis*. Localización citoquímica de los componentes en la semilla de *Arabidopsis* bajo tinción de azul de toluidina. a, capa de aleurona; c, columela; cp, capas parenquimáticas; e, endotelio; em, embrión; ep, epidermis; h, capa hialina; ii, integumento interno; m, mucilago; oi, integumento externo; p, capa de empalizada; w, remanentes de la pared celular. La barra equivale a 30 μm . (Debeaujon *et al.*, 2000).

La suberina, acumulada por parte de las células de la empalizada, es uno de los principales poliésteres lipídicos en plantas que puede encontrarse en regiones específicas durante el crecimiento (Kolattukudy, 2001; Bernards, 2002; Kunst *et al.*, 2005; Stark and Tian, 2006) así como también en la cubierta de las semillas (Espelie *et al.*, 1980; Moire *et al.*, 1999). Esto se relaciona con características como permeabilidad de la semilla, tasa de germinación y crecimiento radicular.

1.6. Estudios previos de longevidad en la cubierta

De los trabajos previos la información disponible se ha obtenido a partir del estudio y rastreo de mutantes afectados en algún estadio de maduración de las diferentes estructuras.

Los estudios se han basado en la búsqueda de semillas más longevas por medio de mutantes con mayor longevidad mediante rastreos de mutantes en colecciones de 'activation tagging' en *Arabidopsis* (Bueso *et al.*, 2014). A partir estos rastreos, se seleccionaron mutantes dominantes con mayor longevidad de semilla en condiciones normales y de envejecimiento acelerado (Tesnier *et al.*, 2002).

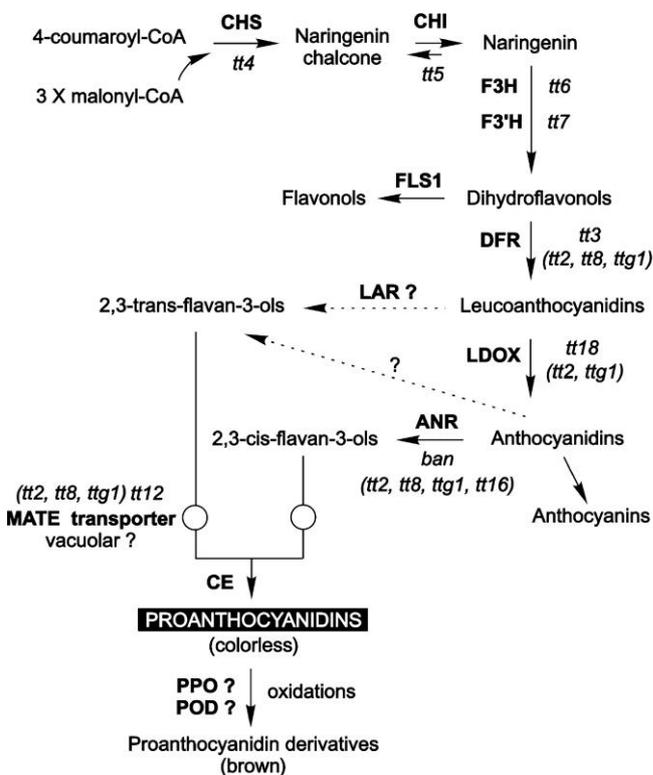
Se obtuvieron cuatro mutantes con dominancia para mayor longevidad de semilla de donde se caracterizó un factor de transcripción, HOMEBOX25 (ATHB25; At5g65410) relacionado con el aumento de la expresión de la GIBERELICO ACID3-OXIDASA2 que codifica una enzima de la biosíntesis de giberelinas (GA). Esta inducción de la expresión muestra que el mecanismo de longevidad es dependiente de GA y que se relaciona con el refuerzo de la cubierta de la semilla. Esto supone un hallazgo de relevancia sin estar relacionado con las defensas frente al estrés o los sistemas de reparación que poseen las semillas que se conocían hasta el momento.

Por otro lado, se sabe que los factores de transcripción tipo DOF están involucrados en numerosos procesos y funciones biológicas presentes solamente en plantas como la germinación, respuesta a la luz o el desarrollo de la semilla. Estudios pendientes de publicación, han desvelado que un mutante (*isl5-ID*) posee una sobreexpresión del gen COG1 que codifica para el factor de transcripción DOF1.5 provocando un refuerzo en la cubierta de la semilla lo que aumenta su tolerancia frente al envejecimiento. Previamente DOF1.5 había sido aislado mediante el mismo rastreo como un regulador negativo inhibiendo la respuesta de la planta a la luz (Park *et al.*, 2003).

Comprobando la resistencia a envejecimiento de ambas líneas con los genes COG1 y ATHB25, se llevaron a cabo cruces recíprocos con líneas de sobreexpresión lo que demostraba que la modificación de la cubierta era la causa más probable de la resistencia.

La biosíntesis de flavonoides es una de las vías de biosíntesis de metabolitos secundarios mejor estudiadas en plantas (Appelhagen I *et al.*, 2014). Se sabe que las proantocianidinas (PAs), principales productos de la ruta de biosíntesis de flavonoides, poseen una función biológica durante la germinación relacionada con la distribución de estas en la cubierta de la semilla (Jia L *et al.*, 2012). Actualmente se han publicado más de 20 mutantes que representan la mayor parte de los genes relevantes para la acumulación de PAs en *A. thaliana* que se pueden agrupar en 3 grandes grupos: reguladores, estructurales y de transporte (Figura 2). Aún así los datos concretos sobre los genes que están implicados en la deposición o la oxidación todavía siguen siendo escasos (Debeaujon *et al.*, 2001).

A)



B)



Figura 2: A) Esquema de la ruta de biosíntesis de los flavonoides. Las enzimas se representan en negrita. Los mutantes aparecen en minúsculas y cursiva. Las flechas con líneas punteadas representan los hipotéticos pasos. ANR, antocianin-reductasa; CE, Condensación enzimática; CHI, chalcona isomerasa; CHS, chalcona sintasa; DFR, dihidroflavonol-reductasa; F3H, flavonol-3-hidroxilasa; F3'H, flavonol 3'-hidrolasa; FLS, flavonol-sintasa; LAR, leucoantocianidin-reductasa; LDOX, leucocianidin-dioxigenasa; POD, peroxidasa; PPO, polifenol oxidasa. Adaptado de Debeaujoun *et al.*, 2003. B) Clasificación de los genes implicados en la biosíntesis de flavonoides.

Todos estos estudios ofrecen por tanto, la oportunidad de investigar el papel que desempeñan en la cubierta de la semilla los diferentes genes que se conocen hasta el momento y compararlos con lo que sucede en relación con la longevidad de la semilla.

2. OBJETIVOS

Los objetivos establecidos para el siguiente trabajo fueron:

- Evaluar la implicación de diferentes componentes de la cubierta en la longevidad de semillas.

Mediante el desarrollo de ensayos de longevidad en los mutantes conocidos de cada una de las diferentes capas de la cubierta de la semilla.

- Estimar la expresión espacio-temporal de los factores de transcripción HB25 y COG1 en la cubierta de la semilla.

Llevado a cabo por medio de generación de plantas transgénicas conteniendo un gen marcador bajo el control de los promotores de HB25 y COG1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material biológico

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

El organismo modelo en plantas escogido como continuación de las investigaciones previas fue *Arabidopsis thaliana*.

Para el desarrollo de los ensayos de longevidad, a través de las bases de datos conocidas, se procedió a la búsqueda de aquellos mutantes con algún paso de la síntesis de las diferentes capas de la cubierta afectado. De esta búsqueda se consiguieron un total de 49 genotipos (Tabla 1) de los cuales 26 mutantes fueron solicitados al NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre* – <http://arabidopsis.info/>).

Los mutantes obtenidos incluyen mutantes de la capa lipídica, mutantes relacionados con la suberina y la cutina (8 genotipos), mutantes relacionados con el almidón (9 genotipos), una colección de mutantes de mucílago con sus líneas sobreexpresoras (3 genotipos) y una colección de mutantes relacionados con la síntesis y acumulación de proantocianinas. Los ecotipos silvestres de todos los mutantes fueron *Columbia 0* (Col-0) para todos los genotipos excepto en los mutantes de mucilago en los que el ecotipo silvestre es *Columbia 2* (Col-2) y WS2 para 3 de los genotipos relacionados con el almidón.

NOMENCLATURA	Genes afectados	RUTAS	BIBLIOGRAFÍA
<i>far1xfar4</i>	FAR TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (TGD) proteins	Lípidos	Domergue <i>et al.</i> , 2010
<i>far1xfar5</i>	FAR TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (TGD) proteins		
<i>far4xfar5</i>	FAR TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (TGD) proteins		
<i>far1xfar4xfar5</i>	FAR TRIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL (TGD) proteins		
<i>abcg2-1xabcg20-1</i>	ABCG Transporters	Suberina	Yadav 2014
<i>abcg2-1xabcg20-1xabcg6-1</i>	ABCG Transporters		
<i>asft-1</i>	Feruloyl-Coenzyme A Transferase		Molina <i>et al.</i> , 2009
<i>fact 1-1</i>	Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase		Kosma <i>et al.</i> , 2012
<i>fact 1-2</i>	Caffeoyl-Coenzyme A Acyltransferase		Compagnon <i>et al.</i> , 2009
<i>cyp86b1</i>	CYP86B subfamily of cytochrome P450 monooxygenases		
<i>lptg-1.534</i>	LPTG1 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer	Cutina	DeBono <i>et al.</i> , 2009
<i>lptg-1.480</i>	LPTG1 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer		
<i>At1g27950-1</i>	LPTG1 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer		
<i>At1g27950-2</i>	LPTG1 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer		
<i>ss1xss2</i>	starch synthase	Almidón	Szydlowski <i>et al.</i> , 2011
<i>ss1xss3</i>	starch synthase		
<i>ss1xss2xss3</i>	starch synthase		
<i>isa 3-2</i>	Starch Hydrolases		Streb <i>et al.</i> , 2012
<i>sex 4-3</i>	Starch Hydrolases		Kötting <i>et al.</i> , 2009
<i>sex4-3xisa3-2</i>	Starch Hydrolases Double mutant		Streb <i>et al.</i> , 2012
<i>sex4-3xamy3</i>	Starch Hydrolases Double mutant		
<i>isa3-2xamy3</i>	Starch Hydrolases Double mutant		
<i>isa3-2-lda</i>	Starch Hydrolases Double mutant		
<i>mum 2-1</i>	cell wall b-galactosidase		Mucilago
35SMUM2.6	cell wall b-galactosidase		
35SMUM2.2	cell wall b-galactosidase		

NOMENCLATURA	Mutante	Genes afectados	RUTAS	BIBLIOGRAFÍA
N2105572	<i>tt4-15</i>	Chalcone synthase (CHS)	Proantocianidinas	Buer <i>et al.</i> , 2006
N2105573	<i>tt4-11</i>	Chalcone synthase (CHS)		Rosso <i>et al.</i> , 2003
N2105574	<i>tt5-2</i>	Chalcone isomerase (CHI)		Rosso <i>et al.</i> , 2003
N2105575	<i>tt6-2</i>	Flavonone 3-hydroxylasa (F3H)		
N2105576	<i>tt56-5</i>	Flavonone 3-hydroxylasa (F3H)		
N2105577	<i>tt7-6</i>	Flavonone 3-hydroxylasa (F3H)		
N2105578	<i>tt7-7</i>	Flavonone 3-hydroxylasa (F3H)		
N2105579	<i>tds4-2</i>	Leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX)		Abrahams <i>et al.</i> , 2003
N2105580	<i>tds4-4</i>	Leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX)		Bowerman <i>et al.</i> , 2012
N2105581	<i>ban-5</i>	Anthocyanidin reductase (ANR)		
N2105582	<i>tt15-3</i>	UGT80B1(TT15)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2014
N2105583	<i>tt15-4</i>	UGT80B1(TT15)		
N2105584	<i>tt15-5</i>	UGT80B1(TT15)		
N2105585	<i>aha10-6</i>	Autoinhibited H (+)-ATPase 10 (AHA10)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2014
N2105586	<i>tt12-2</i>	MATE family protein TT12		Kitamura <i>et al.</i> , 2010
N2105587	<i>tt19-8</i>	Glutathione S-transferase 26 (GST26)		
N2105588	<i>tt10-7</i>	Laccase-like 15 (LAC15)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2014
N2105589	<i>tt10-8</i>	Laccase-like 15 (LAC15)		
N2105590	<i>tt16-4</i>	Agamous-like 32 (AGL32)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2014
N2105591	<i>tt16-5</i>	Agamous-like 32 (AGL32)		
N2105592	<i>tt1-3</i>	WIP Domain protein (TT1)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2010
N2105593	<i>tt2-5</i>	MYB123 (TT2)		Gonzalez <i>et al.</i> , 2008
N2105594	<i>tt8-6</i>	BHLH042 (TT8)		Rosso <i>et al.</i> , 2003
N2105595	<i>ttg1-21</i>	Transparent testa glabra 1(TTG1)		Rosso <i>et al.</i> , 2003
N2105596	<i>ttg1-22</i>	Transparent testa glabra 1(TTG1)		
N2105597	<i>ttg2-5</i>	WRKY44 (TTG2)		Appelhagen <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1: Colección de mutantes utilizados en los ensayos de longevidad. Genes involucrados y ruta afectada para cada genotipo.

3. 1.2. Vectores de clonación y transformación

pCambia1303: plásmido derivado de los vectores pPZP. Este plásmido ofrece un elevado número de copias en *E.coli*, estabilidad en *Agrobacterium* por su pequeño tamaño, además de sitios de restricción para la introducción de DNA de interés. Incorpora la resistencia a kanamicina en bacterias e higromicina en las plantas transformadas impulsadas por una versión de doble potenciador del promotor CaMV35S (Figura3).

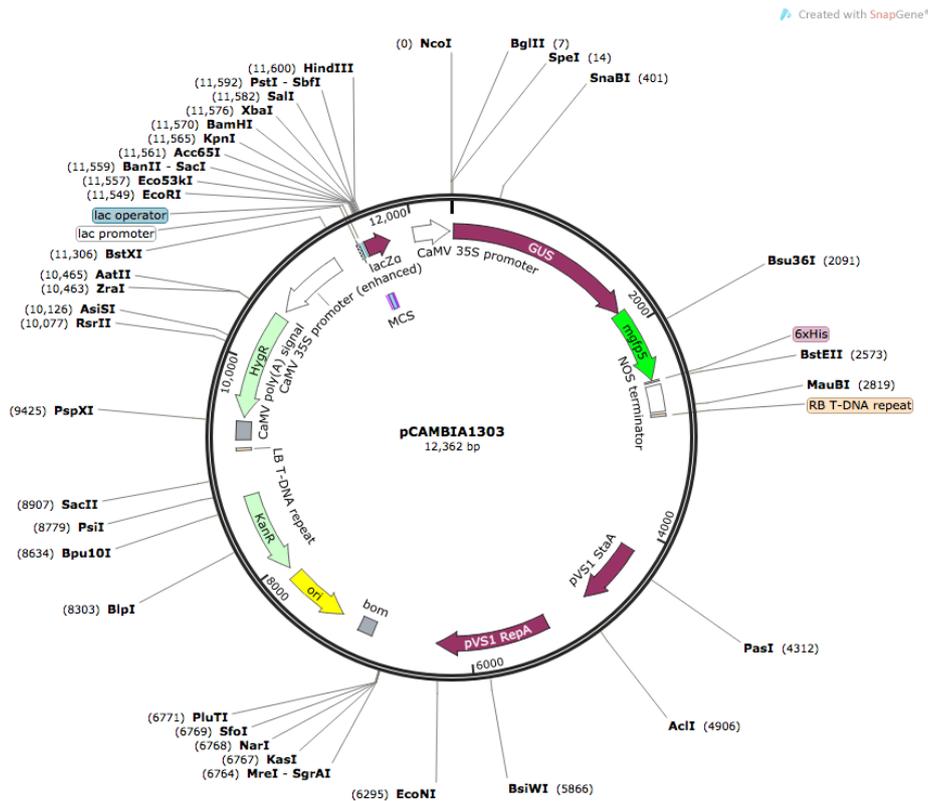


Figura 3: Esquema del vector pCambia 1303.

Mi/P1 BAC's (pAd10-SacBII): Mina 5, utilizado para la amplificación de HB25 utilizado en Bueso *et al.*, 2014. Presenta sitios únicos de restricción para una fácil subclonación. Además de la posibilidad de creación de extremos romos a partir del corte enzimático, permite su selección por medio de antibióticos como la kanamicina.

3.2 Cultivo y manejo de *Arabidopsis thaliana*

3.2.1. Esterilización de semillas

Previamente se prepara una solución con etanol al 70% a la que se le añade 0,5% de Tritón X-100. Posteriormente se introducen aproximadamente unas 100 semillas de *A. thaliana* en un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml y se agrega 1ml de solución de etanol con Tritón. El microtubo con etanol y semillas se deja en agitación durante 20 minutos.

Una vez transcurridos los 20 minutos se trabaja en campana de flujo laminar en condiciones asépticas en donde se elimina la solución de etanol con Tritón mediante una micropipeta y se realizan cuatro lavados con 1 ml de agua *milli Q* estéril.

Tras el cuarto lavado se dejan las semillas en agua durante un periodo máximo de cuatro días a 4°C para romper la latencia (estratificación) previo a la siembra.

3.2.2 Cultivo en medio sólido Murashige-Skoog (MS)

Para el crecimiento de las plantas en cultivo *in vitro* se utilizaron placas *Petri* de 9 cm de diámetro las cuales se les añadía, aproximadamente 25 ml de medio sólido estándar MS. Para la preparación del medio se utilizó una solución comercial de sales MS en polvo de Sigma-Aldrich (ref. M-5524) en una proporción de 4,9 g/l, junto a sacarosa al 1%, tampón MES al 0,1% y agar al 1%, ajustando el pH a 5,7 por medio de KOH 1M.

El medio se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 121°C y presión de una atmósfera. Cuando haya que añadir sustancias como los antibióticos se espera a que la temperatura del medio ya estéril haga descendido hasta unos 50°C evitando así su degradación. Una vez repartido el medio en placas estas son selladas con cinta porosa (Micropore) y se incuban en una cámara con condiciones controladas de temperatura (24°C) y fotoperiodo (día lago: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.3. Ensayo de envejecimiento acelerado o CDT

Para la evaluación del fenotipo de longevidad, por envejecimiento acelerado, se ha utilizado una modificación del método denominado CDT (*“Controlled Deterioration Test”*) desarrollado por Tesnier *et al.*, en 2002. Dicha modificación ha demostrado una correlación entre la longevidad de semillas tras el CDT (días) y tras envejecimiento natural (años) para nuestros diferentes genotipos de *Arabidopsis*.

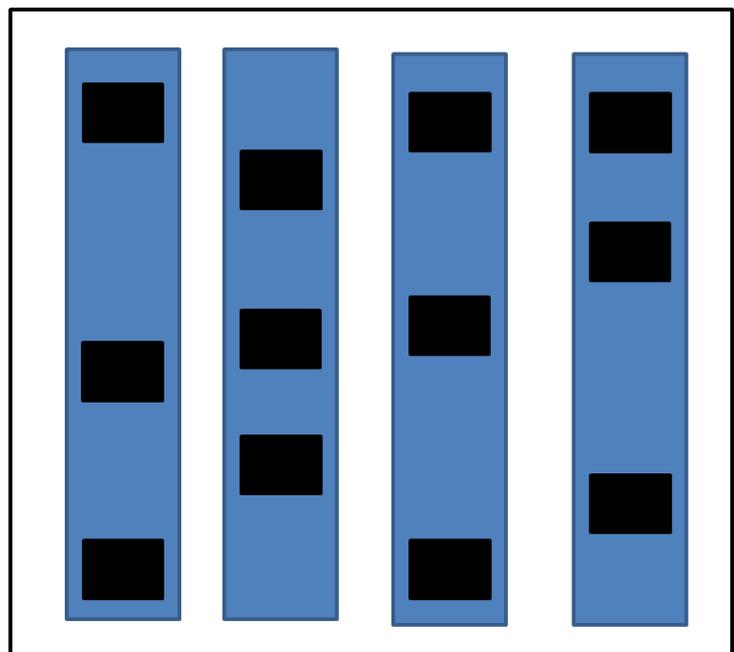
Para este ensayo las semillas deben proceder siempre del mismo lote (es decir, haber sido sembradas y recogidas al mismo tiempo). Por este motivo, una vez recibidos los distintos genotipos, previo al comienzo del ensayo, se llevaron a invernadero con el fin de obtener un mayor número de semillas y comprobar la viabilidad de todos los genotipos recibidos.

Posteriormente, una vez obtenidos todos los genotipos, se sembraron en invernadero en bandejas con tres réplicas por genotipo y en lugares distintos dentro del invernadero evitando de esta forma posibles variaciones de luz, temperatura o humedad causadas por la posición (Figura 4). Para gestionar una mayor uniformidad, además se decidió variar semanalmente la posición de las distintas bandejas de manera que todas estuviesen en todas las posiciones del invernadero.

Una vez recogidos los diferentes lotes con sus respectivas réplicas se llevó a cabo el ensayo de envejecimiento en microtubos de 1,5ml siguiendo el protocolo que incluye esterilizado de semillas y la imbibición y estratificación durante 4 días a 4°C. Estos microtubos se llevaron a un volumen final de 1ml (<85% humedad).

Transcurridos los días de estratificación se colocaron a 41°C durante 20 h habiendo estandarizado el ensayo en función de la respuesta de los WT. Tras las 20 h de incubación se sembraron y crecieron las semillas en MS bajo condiciones controladas que homogenicen la contabilización del porcentaje de germinación a los tres, cinco y siete días tras la siembra obteniéndose así de cada lote dos siembras (réplicas). Todos los genotipos acompañados con semillas sin tratar para poder estimar el porcentaje de germinación asegurando al menos, un 95% de germinación de los diferentes lotes en condiciones normales.

Figura 4: Disposición en invernadero de los diferentes genotipos con los respectivos WT. Se sembraron tres réplicas por mutante y un número variable de réplicas de los diferentes WT.



3.3. Manipulación y cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*

3.3.1. Medios de cultivo

3.3.1.1 Medio Luria-Bertani (LB)

El medio LB está compuesto por 1% (p/v) de extracto de levadura y 1% (p/v) de NaCl. Cuando fue necesario el crecimiento en placa se añadieron 15 g/l de agar para poder solidificarlo en placas *Petri* adicionando antibióticos, cuando fuese necesario su uso, una vez el medio esterilizado haya enfriado a las siguientes concentraciones: 100 mg/l kanamicina y 100 mg/l higromicina.

3.3.2 Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo a partir del DNA genómico, para COG1 y DNA genómico y de un BAC para HB25. Las condiciones de amplificación para los genes candidatos se resumen en las tablas 2 y 3:

REACTIVOS	VOLUMEN
BAC (MINA 5) 1/10	1 µl
dNTPs 2mM	5 µl
Primer-Forward 10 µM	1 µl
Primer-Reverse 10 µM	1 µl
Tampón de PCR 10x (MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂ 10 mM	5 µl
True Star Proof-Reading (0,5 U/µl)	1 µl
H ₂ O	Hasta 50 µl

Tabla 2: Componentes de la mezcla de reacción de amplificación para HB25 con BAC MINA 5. La pareja de primers utilizados para HB25 fueron At5g65410 Prom XbaIFor At5g65410 Prom NCOIRev.

REACTIVOS	VOLUMEN
DNA (250 ng/μl)	2 μl
dNTPs 2mM	5 μl
Primer-Forward 10 μM	1 μl
Primer-Reverse 10 μM	1 μl
Tampón de PCR 10x (MgCl ₂)	5 μl
MgCl ₂ 10 mM	5 μl
True Star Proof-Reading (0,5 U/μl)	1 μl
H ₂ O	Hasta 50 μl

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción de amplificación para COG1 con DNA genómico. La pareja de primers utilizados para COG1 fueron At1g29160 Prom XbaIFor y At1g29160 Prom NCOIRev.

Los perfiles térmicos utilizados en las reacciones de PCR se muestran en la tabla 4.

Nº de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C	2 min.
30	95°C	30 s.
	T _m =55°C	30 s.
		2 min.
	72 °C	30 s.
1	72 °C	10 min.
35	4°C	

Tabla 4: Perfiles térmicos empleados en la reacción de PCR para los genes COG1 y HB25.

Los productos de PCR resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (Agarosa, Roche) en tampón TBE 0,5X (Tris- HCl, ácido bórico y EDTA) más bromuro de etidio (0,5 μg/ ml).

El tamaño molecular de los fragmentos fue confirmado mediante la comparación con el marcador MassRuler™ DNA Ladder, MIX (Fermentas) cuyos valores fueron 2500 bp en HB25 y 2000 bp para COG1.

Para la amplificación de COG1 se clonó en vector TOPO® (PCR8) amplificándose durante 10 minutos a 72°C. Posteriormente siguiendo el protocolo del kit GeneClean® se realizó la ligación de los fragmentos.

El proceso descrito anteriormente presenta la enzima True Star (Thermo Scientific) que presenta prueba de lectura (proof-reading) debido a su actividad 3'-5' exonucleasa, además de producir fragmentos que pueden ser utilizados directamente para clonar en vectores cortados con extremos romos.

3.3.3 Purificación productos PCR

Para dicho proceso se añadieron 150 µl de H₂O y 5 µl de tRNA (1%). Posteriormente se añadieron 700 µl fr RtcAM (etanol-acetato amónico (6:1), 6 volúmenes de etanol absoluto y 1 volumen de acetato amónico 7,5M que se mezclaron con vortex. Una vez homogenizada la mezcla se colocó a -20°C durante 15 minutos y tras ese tiempo se centrifugaron los microtubos a 13.000 rpm durante 20 minutos. Para lavar el pellet se adicionaron 500 µl de etanol 70% y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos. Una vez obtenido el pellet se resuspendieron las muestras en 10 µl de H₂O.

Para la purificación de la banda obtenida se cortaron los fragmentos de DNA del gel con bisturí que se colocaron en microtubos donde se añadieron 30 µl de Gel Solution Buffer por cada 10 mg de gel para cada producto de PCR. Colocada la solución se incubaron las muestras a 50°C durante 15 minutos y se movieron cada 3 minutos para poder disolver por completo la agarosa.

Por otro lado, se realizó el montaje de los tubos con filtros correspondientes previsto en el kit y se añadió la muestra disuelta que se colocó en centrifuga a máxima velocidad durante 2 minutos. Una vez descartados los tubos, se pasaron a tubos nuevos los filtros donde se lavaron con 700 µl de WashBuffer y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugaron a máxima velocidad otros 2 minutos y se pasaron los filtros a tubos nuevos con el fin de añadir 40 µl de TE Buffer precalentado a 65°C para incubar las muestras a 65°C 2 minutos. Por último, se centrifugaron durante 2 minutos a máxima velocidad para poder retirar el sobrenadante y resuspender en 10 µl de H₂O.

3.3.4 Tratamiento del plásmido y ligación de los fragmentos

3.3.4.2 Tratamiento del plásmido

El plásmido utilizado, pCambia1303, fue digerido con las enzimas de restricción XbaI y NcoI para la creación de extremos romos. La reacción de digestión del plásmido se realizó en un volumen total de 20 µl, añadiendo 1,2 µl de cada enzima, 2 µl del Buffer Tango 10x, 10 µl del plásmido (580 ηg/ µl) y 5,6 µl de H₂O. Tras dos horas de incubación a 37°C, se realizó una electroforesis en gel de agarosa del 0,7% en tampón TBE 0,5X más bromuro de etidio para comprobar el tamaño y la concentración del plásmido.

Posteriormente se llevó a cabo un tratamiento con fosfatasa alcalina para eliminar los grupos 5'-fosfato de los extremos del DNA quedando impedida la opción de autoligamiento del plásmido.

Siguiendo el protocolo se añadieron 2 µl de CIPase (CaI_f Intestinal Phosphatasa) a la reacción de digestión y se incubó a 56°C durante 15 minutos. Posteriormente se añadieron 5 µl de tRNA (1%) y 200 µl de TE para proseguir con 200 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:25:1) mezclando bien en vortex durante 1 minuto.

Tras el tratamiento se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos para poder tomar la fase superior y pasarla a un nuevo microtubo con el fin de precipitar el plásmido plásmido con 700 µl de EtAcAm (6:1). Para secar el precipitado se colocó a -20°C 15 minutos y se volvió a centrifugar a 13.000 rpm 10 minutos eliminando así el sobrenadante.

Para lavar el precipitado se añadió 1 ml de etanol 70% que se mezcló con vortex, se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Por último se dejó secar al aire durante 20 minutos y se resuspendió en 10 µl de TE.

3.3.4.3 Ligación de los fragmentos obtenidos por PCR

Para la ligación de los fragmentos se utilizó la t4 DNA ligasa (1U/ µl) de Roche.

Previamente se determinaron las concentraciones y purezas de los fragmentos de DNA (COG1 y HB25) y del plásmido, utilizando un NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)

En todas las reacciones de ligación se utilizaron 100 ng de plásmido y 50 ng de inserto. Se dejaron incubar toda la noche a 13°C para HB25 y 16°C para COG1.

3.3.5 Manipulación de *E. coli*

En medio líquido se utilizaron tubos de 15 ml o matraces estériles colocados en un incubador orbital a 37°C con una agitación de entre 200 y 250 rpm. En el caso de cultivo en medio sólido las placas se incubaron invertidas en estufa a 37°C.

3.3.5.1 Transformación por choque térmico

La transformación bacteriana se cogieron las alícuotas congeladas a -80°C de las células competentes de *E. Coli* DH5 α (Preparadas según el protocolo de Inoue *et al.*, 1990) y se mantuvieron previamente en hielo.

Se añadieron, en condiciones de esterilidad, 50 μ l de las células competentes junto con 10 μ l de la ligación obtenida a partir del plásmido tratado y el fragmento a clonar. Esta mezcla se incubó en cada uno de los tubos durante 30 minutos en hielo y posteriormente se aplicó un choque térmico de 40 segundos.

A cada transformación se le añadieron 400 μ l de LB, en condiciones de esterilidad, y se incubaron a 37°C durante 50 minutos. Pasados los 50 minutos, se plaquearon las transformaciones en placas de LB utilizando bolas de vidrio de 5 mm estériles que se dejaron incubar a 37°C 12 horas.

3.3.6 Selección bacterias transformantes

El plásmido utilizado en la transformación confiere resistencia a kanamicina por lo que la selección de transformante consistió en sembrar las transformaciones en placas de LB suplementadas con kanamicina. Por tanto, se seleccionaron las colonias independientes de cada transformación y se sembraron en 3 ml de LB más kanamicina (100 μ l/100 ml), dejándose crecer a 37°C durante 24 horas para la obtención de un cultivo saturado de cada clon.

De los cultivos saturados se realizaron minipreparaciones para extraer el plásmido transformado en la bacteria.

Se recogieron 1,5 ml de cultivo saturado en tubos eppendorf que se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 minuto para eliminar completamente el sobrenadante y resuspenderlo en 100 µl de H₂O.

A partir de la resuspensión se añadieron 100 µl de disolución de lisis (NaOH 0.1M, EDTA 10 mM, SDS 2%) y se mezcló en vortex. Se incubaron las muestras 2 minutos a 95°C para posteriormente pasar los tubos a hielo y añadir 50 µl de MgCl₂ 1M en frío mezclando nuevamente en vortex.

Las mezclas obtenidas se centrifugaron a máxima velocidad 8 minutos y se añadieron 50 µl de solución de neutralización volviendo a mezclar en vortex. Para eliminar la solución de neutralización se volvió a centrifugar a velocidad máxima 12 minutos recogiendo el sobrenadante (± 300 µl) para pasarlo a nuevos eppendorf con 600 µl de etanol 100% donde se mezcló por inversión y se dejó 15 minutos a 4°C.

Pasados los 4 minutos, se centrifugó a máxima velocidad 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se lavó con 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a máxima velocidad 2 minutos eliminando así el etanol y dejando secar al aire unos minutos. Por último se resuspendió en 30 µl de agua destilada y se llevó al nanodrop para medir la concentración del plásmido.

Para comprobar que el plásmido obtenido contenía el inserto de interés, se realizó una PCR siguiendo las mismas pautas descritas en los apartados anteriores utilizando como DNA molde las minipreparaciones en dilución 1:1000 y como enzima la True Star.

Los productos obtenidos de la PCR se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa 0,7% en tampón TBE 0,5X (Tris-HCl, ácido bórico y EDTA) más bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El tamaño obtenido se confirmó comparándolo con el marcador MassRuler™ DNA Ladder, Mix (Fermentas).

Los clones positivos, se secuenciaron utilizando los mismos cebadores que los de las reacciones de PCR con el fin de comprobar que los fragmentos insertados correspondían a los genes seleccionados.

3.3.7 Manipulación de *A. tumefaciens*

El crecimiento de *A. tumefaciens* se llevó a cabo en medio líquido en matraces estériles colocados en un incubador orbital a una temperatura de 28°C y entre 200 y 250 rpm de

velocidad de agitación. Para medio sólido, las placas se incubaron invertidas en estufa a 28°C.

3.3.7.1 Obtención de competentes de *A. tumefaciens*

Las construcciones preparadas se introdujeron en *A. tumefaciens* inoculando 100 µl de LB con 1 ml de cultivo de *Agrobacterium* saturado que se dejó crecer overnight. Al día siguiente se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con agua destilada estéril para posteriormente resuspender en 4 ml de glicerol 10% estéril y preparar alícuotas que se guardaron a -80°C.

Las mismas se electroporaron con cubetas de 0,2 cm preenfriadas a -20°C (2kV, 1kO, 25 µF; 10-20 msegundos) y se añadieron, 0.4 ml de *Agrobacterium* a 0.1-0.5 µg del vector binario junto con 1 ml LB dejando 2-3 horas a 28°C para que se exprese la resistencia con el fin de seleccionar en placas con el antibiótico correspondiente (higromicina 100µl/100 ml).

3.3.7.2 Inmersión de plantas de *A. thaliana* con *A. tumefaciens*

Protocolo basado en el método de infiltración *in planta* (Bechtold *et al.*, 1993, Bechtold y Pelletier 1998). Consisten en la transformación de plantas enteras sin que requiera regeneración de tejidos *in vitro*.

De un cultivo saturado de *A. tumefaciens* 1-2 ml se utilizan para inocular 200 ml de medio LB + Kan que se incuban 24 horas a 28°C. De este se recogen las células del cultivo por centrifugación a 5.000 rpm durante 15-30 minutos y se resuspende el pellet en 400ml de solución de infiltración compuesta por sacarosa 5%, detergente Silwet L-77 al 0,02% (v/v) y agua Milli Q.

Los 400 ml de la suspensión se disponen en un recipiente de plástico colocando la maceta en posición invertida quedando la parte aérea sumergida durante 1 minuto y medio que, una vez sumergidas se envuelven en bolsas de plástico durante 24 horas para mantener una humedad elevada.

3.3.8 Selección líneas transformantes y obtención de homocigotos

Las semillas T1 procedentes de las plantas transformadas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con higromicina (antibiótico de presión de selección del plásmido). Tras 7-10 días las plántulas resistentes (T1) se rescataron y se trasplantaron

en macetas para la obtención de las semillas T2. El cultivo de las semillas T2 se llevó a cabo mediante el mismo proceso que las T1 de las que posteriormente se contabilizaron para comprobar la proporción 3:1, 75% (resistentes. Sensibles, que tendrán una inserción) frente a las que presentaban tasas de germinación del 100% (más de una inserción). De las primeras se pasaron 4 plántulas resistentes a tierra para obtener semillas T3, donde se podrán seleccionar las plantas homocigotas con el transgén (100% resistentes).

Al mismo tiempo, también se realizó una siembra y trasplante a tierra de genotipos con más de una inserción para poder realizar ensayos de GUS y GFP, más sensibles, con el fin de conocer en tiempo y espacio la expresión de ambos genes.

4. RESULTADOS

4.1. Implicación en la cubierta de diferentes compuestos.

Siguiendo el protocolo de envejecimiento acelerado descrito en el apartado de materiales y métodos, los resultados obtenidos a partir del diseño experimental se dividen según las rutas que se ven afectadas por cada mutante (Tabla 1).

A) Mucilago

En el proceso de diferenciación de la cubierta, las células de la epidermis producen la secreción del mucílago, a partir de la degradación del almidón, hacia el apoplasto formando una pared celular secundaria conocida como columnela (Beeckman *et al.*, 2000). El componente principal del mucílago en *Arabidopsis* es un derivado del ramnogalacturonano I (RG I; Western *et al.*, 2000, 2001, 2004; Penfield *et al.*, 2001; Usadel *et al.*, 2004; Macquet *et al.*, 2007a). Es el encargado de mantener las propiedades mecánicas de la pared.

Hasta el momento, se conoce la existencia de varios genes relacionados con la biología de la pectina, como por ejemplo los genes MUM1 y MUM2. Estudios previos también han relacionado el mucilago con el desarrollo de la semilla en mutantes de GAs (giberelinas) pudiendo estar relacionados con la activación de la diferenciación celular (Kim *et al.*, 2005; Bueso *et al.*, 2014).

En nuestra colección el mutante estudiado fue *mum 2-1* junto con la sobreexpresión del gen MUM2 bajo el control del promotor 35S. Este gen codifica una β -galactosidasa de la pared celular lo que se relaciona con la modificación de la estructura de la pectina. El mutante *mum2* por tanto, presenta una producción normal de mucilago, pero falla en el momento de germinación de la semilla madura por lo que se conoce que la función de acumulación se ve afectada (Figura 5).

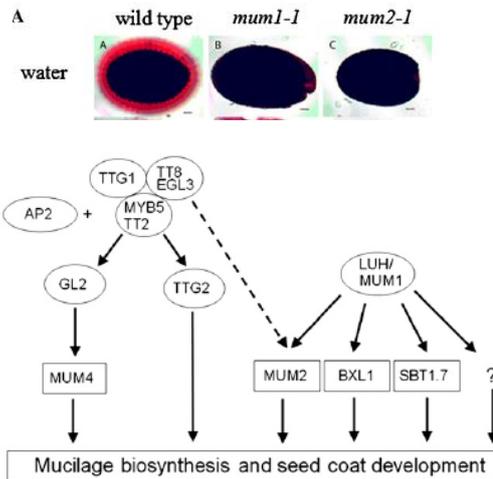


Figura 5: Esquema propuesto para la biosíntesis del mucílago. Genes que intervienen y formación de complejos (GL2-TTG2). Adaptado de Western *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2009).

Para el ensayo de longevidad (Figura 7) se realizaron pruebas con varias muestras randomizadas en invernadero, como se describe en el apartado de materiales y métodos y, además dentro del ensayo, se sembraron dos repeticiones por muestra y se contabilizaron a diferentes días tras la siembra (3,5 y 7). Como se puede ver en la gráfica (barras de la izquierda día 5 y las de la derecha de cada genotipo, día 7), vemos un descenso de la longevidad en el mutante *mum2-1*, para el día 7, de entre 15-20% frente a la germinación del WT mientras que, en el mismo ensayo para las líneas sobreexpresoras 35S exista un aumento de un 15% de la longevidad, pero únicamente en una de las líneas. Los datos obtenidos se acompañan de asteriscos para los mutantes con diferencias significativas. Se observan en la figura 6 donde aparece el mutante *mum2-1* (Dean *et al.*, 2007; Macquet *et al.*, 2007a).

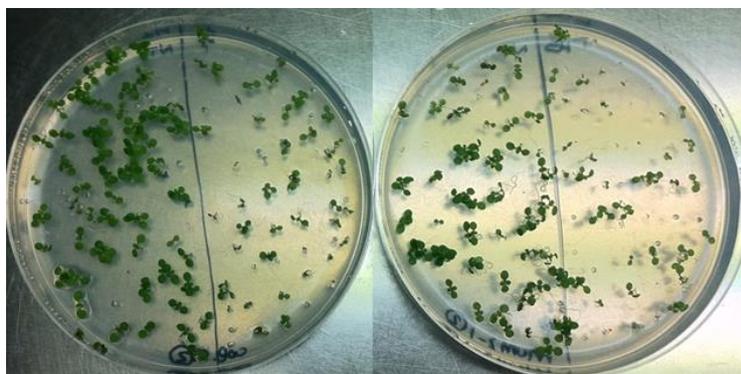


Figura 6: Mutante *mum 2-1* (Figura derecha) junto con su WT Col.2 (Figura izquierda) a día 7 tras la siembra. En la parte izquierda de cada placa se presentan las semillas sin tratamiento y a la derecha las semillas tratadas

Estas variaciones visibles dentro de la misma construcción se han repetido con nuevas réplicas y bajo las mismas condiciones, pero no se han conseguido mejorar. Tanto a día 3 como a día 5 las diferencias existentes permanecen constantes. Esto podría ser debido a condiciones externas como, posición de las diferentes muestras dentro del invernadero, debido a la manipulación del material así como al lugar de inserción de la construcción 35S dentro del genoma para el caso de las líneas sobreexpresoras.

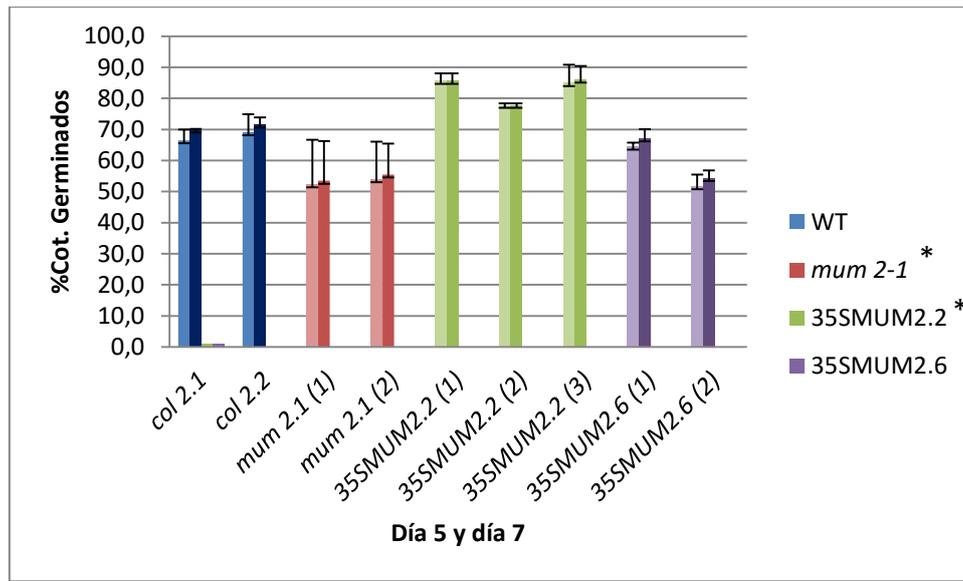


Figura 7: Ensayo de longevidad para el lote de mutantes de mucílago *mum2-1* y las líneas sobreexpresoras. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT. Conteo realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

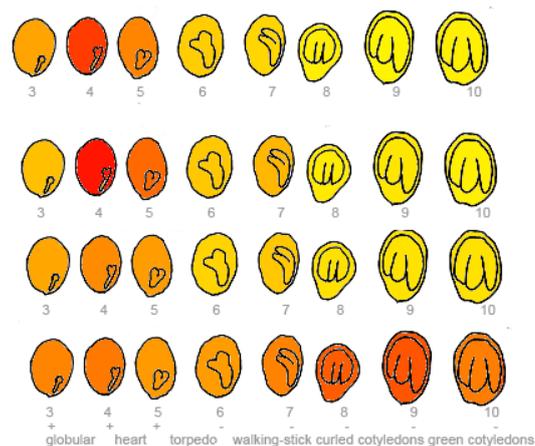
B) Almidón

El almidón es el principal carbohidrato de almacenamiento en plantas. Está formado por gránulos insolubles semicristalinos compuestos por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina (Streb *et al.*, 2012). Su degradación, relacionado con las giberelinas da lugar a la producción de mucilago como se ha señalado en el punto anterior por lo que podemos dividirlo en almidón transitorio, depositado en los cloroplastos y el almidón depositado en órganos no fotosintéticos como fuente de energía durante la germinación de la semilla.

Para los ensayos de longevidad los mutantes utilizados en este apartado fueron *isa 3-2*, involucrado en la degradación del almidón, cuyo fenotipo es similar al mutante *sex 4-3*, *amy 3* y *lda*, también bloqueadores del contenido del almidón (Figuras 9 y 10). Estudios

previos demostraron la superposición de funciones de estos tres genotipos por medio del estudio de sus dobles y triples mutantes (Delatte *et al.*, 2006). Por otro lado, también se estudió el comportamiento de líneas relacionadas con una almidón-sintasa involucrada en la síntesis de las cadenas que forman la amilopectina. La generación de cadenas más o menos largas determina por tanto una mayor o menor acumulación de almidón. El mutante *ss1* presenta cadenas cortas de glucano (Delvalle *et al.*, 2005) mientras que en el mutante *ss2* las cadenas son más largas (Zhang *et al.*, 2008), por lo que en los dobles mutantes, donde se encuentra formando parte *ss2*, el contenido de almidón es mucho más significativo que en el resto. Por último, del triple mutante de la colección *ss1ss2ss3*, se conoce que su fenotipo es similar al WT, pero que posee una menor acumulación de almidón en hojas (Szydlowski *et al.*, 2011). Para semilla, los datos que se conocen son todavía muy escasos (eFP Browser Figura 8) y solo se relacionan con fenotipo en hojas.

Figura 8: Patrón de expresión en semilla de SEX4, ISA3, AMY3 y LDA respectivamente.



Para la colección de bloqueadores de la acumulación de almidón vemos que el mutante que determina una reducción de la germinación a día 7 tras la siembra, es el mutante *sex 4-3* en relación a las variaciones existentes dentro de la colección de WT. Estas diferencias solo son visibles al final de las mediciones mientras que a día 3 y 5 no se aprecian diferencias significativas entre el WT y los diferentes mutantes. Esto apoya los conocimientos previos sobre la existencia de una superposición de genotipos capaces de producir, almacenar y degradar un contenido normal de almidón, como por ejemplo, la posibilidad de movilidad del almidón en los dobles mutantes *isa-lda* e *isa-amy* (Delatte *et al.*, 2006).

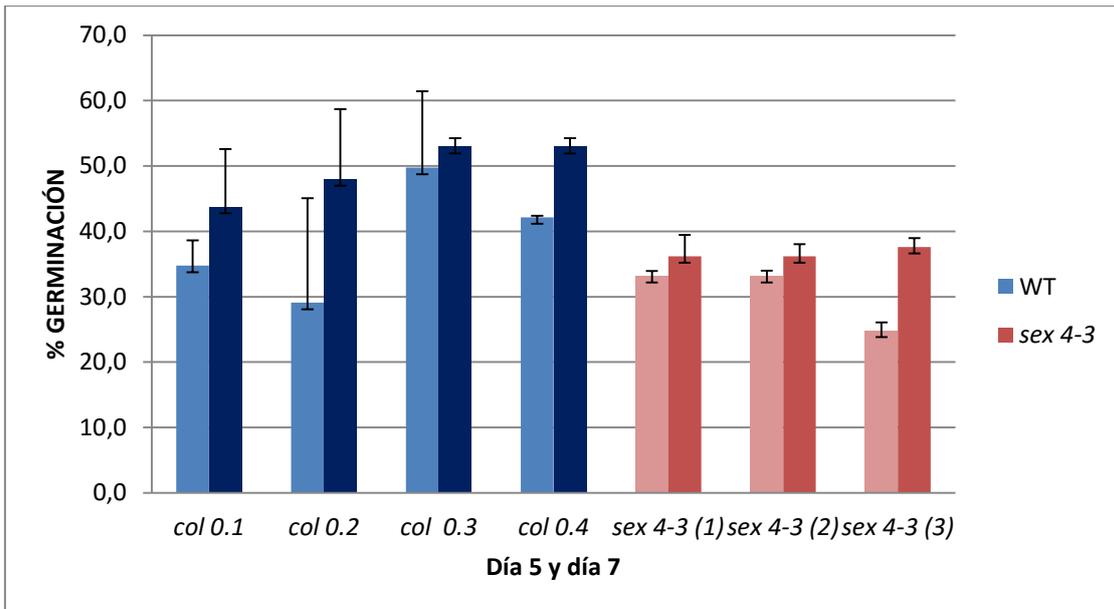


Figura 9: Ensayo de longevidad para el lote *sex 4-3* tratado. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col. 0). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

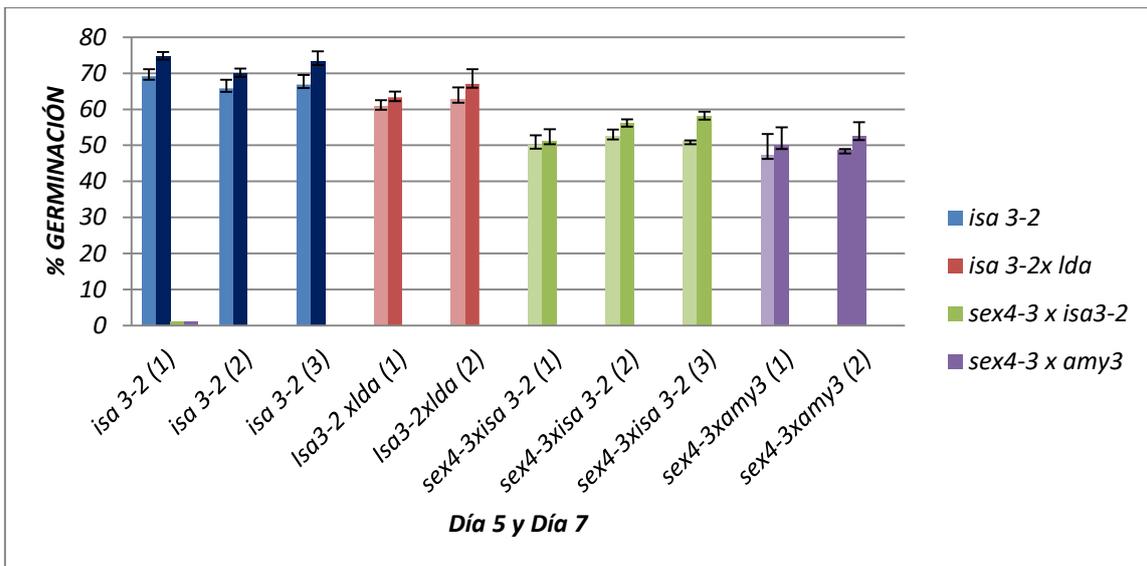


Figura 10: Ensayo de longevidad para los lotes *isa 3-2* y dobles mutantes de los diferentes bloqueadores de la acumulación de almidón, AMY3, LDA tratados. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y al séptimo (columna derecha) día tras la siembra junto con el respectivo WT (Col. 0 Gráfica 2). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

Para nuestro ensayo los resultados obtenidos para el grupo de la almidón sintasa se observa en la figura 11 donde su WT, WS2 presenta una variación entre el 10-12% pudiendo ser debido a factores ambientales junto con variaciones apreciables dentro de

las distintas muestras de todos los genotipos. De todos modos, puede apreciarse una tendencia a la reducción de la germinación en estos genotipos entre un 10 y un 20%.

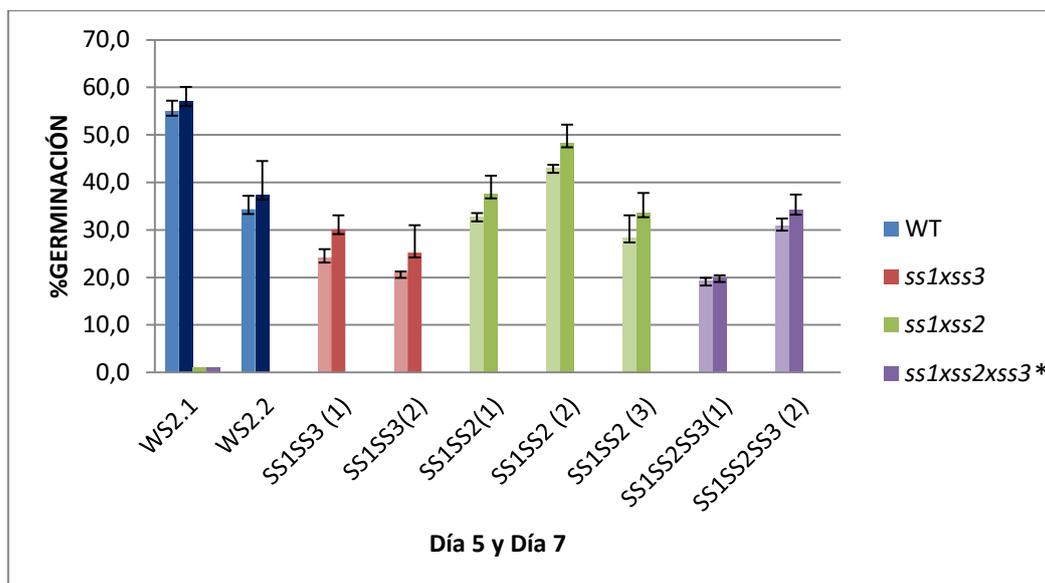


Figura 11: Ensayo de longevidad para el lote de doble y triples mutantes *ss1/ss2/ss3* relacionados con una almidón-sintasa tratados. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (WS2). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados por lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

C) Suberina

Se trata de un polímero insoluble derivado del poliéster que se deposita en la cara interior de las células epidérmicas (Kolattukudy *et al.*, 2001) que, junto con la cutina, depositada en la cara exterior de dichas células, contribuyen a la barrera permeable de la semilla madura (North *et al.*, 2010).

Los genes utilizados en el ensayo comprenden un amplio espectro de funciones. Los genes que intervienen en la síntesis del poliéster son CYP86b1 involucrado en la síntesis de monómeros de poliéster en el retículo endoplasmático (Pinot & Beisson, 2011) cuyos efectos no afectan a la permeabilidad de la capa de suberina, y TT15 defectuoso para una UDP- glucosiltransferasa (Compagnon *et al.*, 2009) por lo que ambos mutantes presentan defectos en las capas de cutina y suberina.

Otros genes seleccionados fueron, ASFT relacionado con la catálisis del ferulato a alcohol que coexpresa con el gen CYP86b1 (Molina *et al.*, 2009), cuyo ensayo tuvo que ser descartado por problemas de germinación, el gen ABCG, transportador necesario para la síntesis de barreras eficaces de suberina en raíces y cubierta de semillas, que

alteran la diferenciación de las células epidérmicas LPTG, transportadores lipídicos que se expresan en la epidermis durante la biosíntesis de la cutícula regulados durante la deposición de cera provocada por la sequía (Cameron *et al.*.,2006; Yadav *et al.*, 2014), los genes FACT, que codifican para una acil-transferasa, activo en la capa del tegumento exterior de la cubierta de semilla, que intervienen en la biosíntesis y producción de cera en relación directa con la acumulación de suberina en raíces y tallos (Kosmad *et al.*, 2012) y los genes FAR relacionados con la actividad Acyl-CoA-reductasa cuyo papel en semilla son totalmente desconocidos, además de que para nuestros ensayos sus problemas germinativos entre los diferentes lotes impidieron la obtención de resultados comparables.

Para el ensayo del mutante *cyp86b1* se observa una germinación de los lotes del WT de entre un 50 a un 60% de semillas germinadas en el día 7 frente a un porcentaje de germinación de entorno al 40% para el mutante señalado (Figuras 12 y 13). Cabe destacar los problemas de germinación que presenta el mutante entre el día 3 y el día 5 tras la siembra, donde se observa como el WT comienza a germinar con mucha mayor regularidad mientras que, a partir del día 5 la germinación de cotiledones verdes se asemeja a valores del WT. Por lo que las diferencias significativas entre WT y mutante se observan solamente a días 3 y 5 tras la siembra.

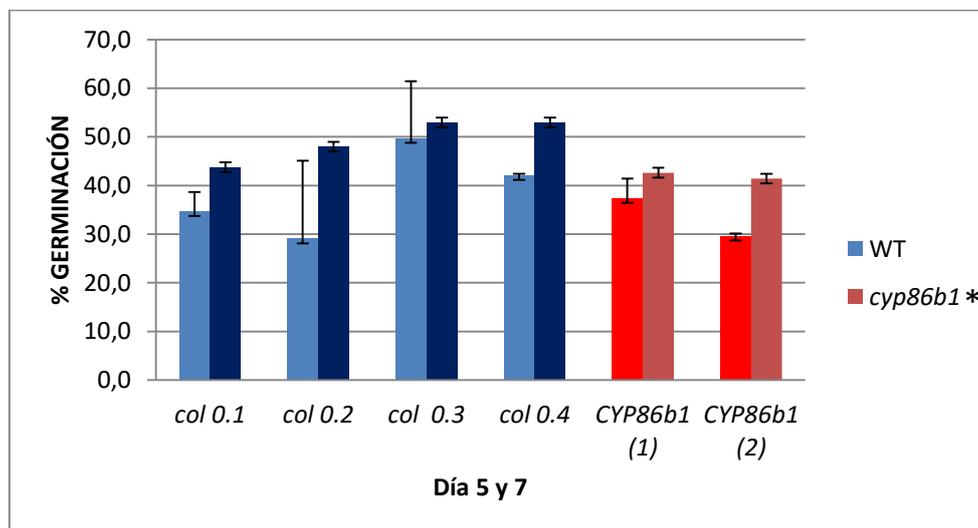


Figura 12: Ensayo de longevidad para el lote mutante *cyp86b1* de suberina. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con respecto al WT (Col. 0). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

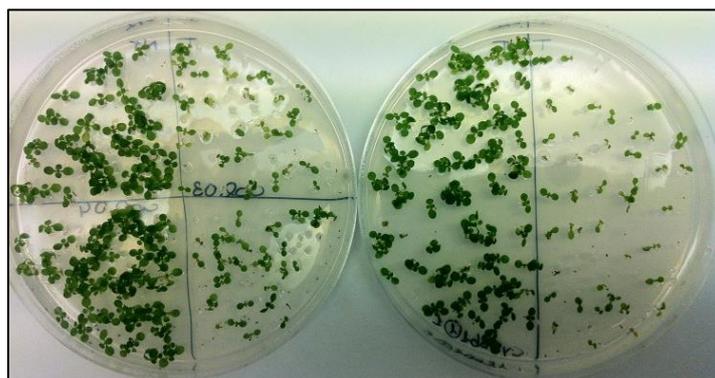


Figura 13: Mutante *cyp86b1* (Imagen derecha) a día 7 tras la siembra. Imagen representativa de los diferentes lotes y repeticiones con las semillas sin tratar a la izquierda de cada placa y las tratadas a la derecha.

Como se puede observar en la figura 14, el ensayo de longevidad provocó una reducción de la longevidad del genotipo salvaje de un 40% al séptimo día tras la siembra (50-60% de semillas germinadas), aunque con un comportamiento anómalo en dos de los lotes (Col.0-1 y Col.0-2). Sin embargo, aunque con ligeras variaciones en los ensayos, las líneas mutantes en el gen FACT redujeron su germinación en un 70-80% siendo consistente el resultado en los dos alelos ensayados.

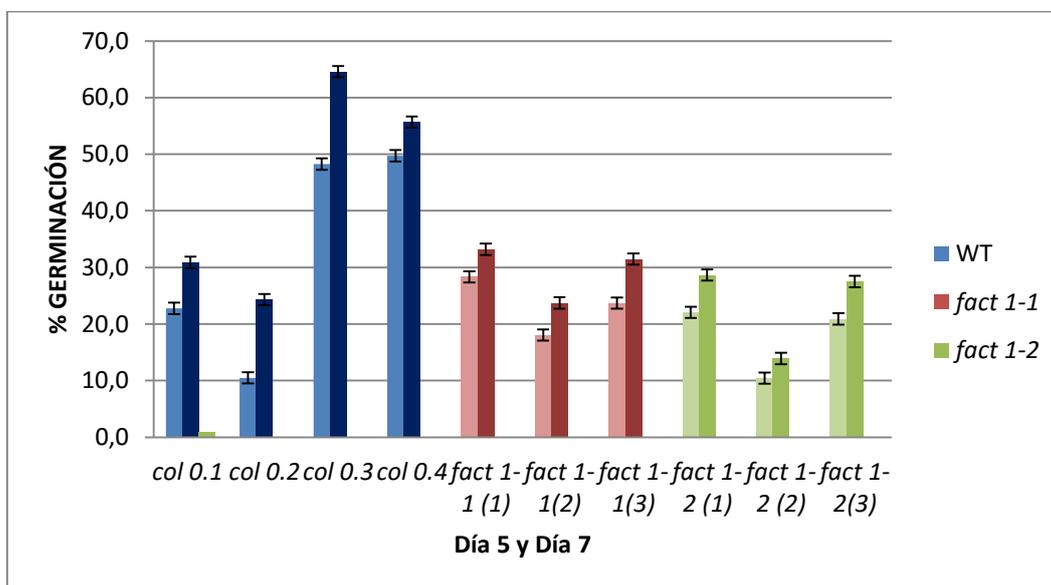


Figura 14: Ensayo De longevidad para el lote del mutante *fact* de suberina. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

El gen TT15 es una UDP-glucosiltransferasa (Debolt *et al.*, 2009) que interviene en el transporte de precursores de lípidos y por tanto a la síntesis de la suberina durante el

desarrollo de la semilla lo que afecta así a su tamaño. Además se sabe que el mutante *tt15* causa fenotipo *Transparent Testa*, relacionado también con la ruta de las proantocianinas. En la figura 15 se presentan los datos del ensayo de envejecimiento acelerado en el que, a pesar de las variaciones presentes en los diferentes WT, bajo las mismas condiciones de manipulación, se observa claramente la pérdida de germinación por parte de los mutantes, donde *tt15* para el alelo 3 presenta un porcentaje de germinación de entre el 5-7%, para el alelo 4 un 10-18% y para el alelo 5 entre un 0 y un 5% frente a la germinación de entre un 35-60% que se observa en Col.0.

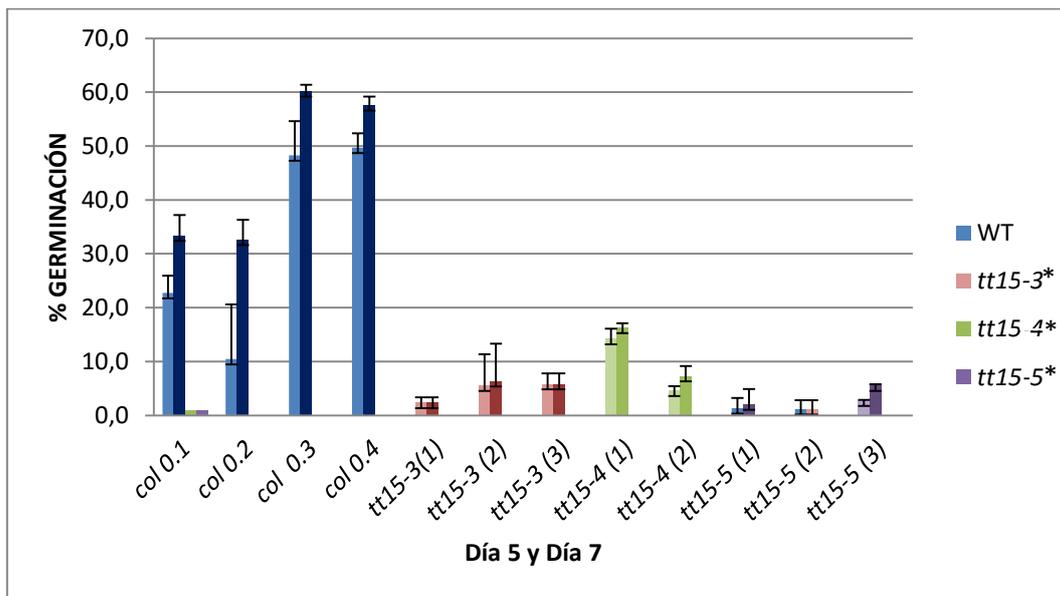


Figura 15: Ensayo de longevidad para el lote de mutantes *tt15* y sus diferentes alelos. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Conteo realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

Por último, el otro genotipo de interés que apoya los estudios sobre la importancia de la suberina en el desarrollo y germinación de la semilla, es el mutante *abcg* relacionado con transportadores. Este mutante ve alterada la diferenciación celular en las células epidérmicas lo que hace que las semillas no posean barreras frente a la desecación (Nawrath *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2014). En nuestro ensayo, el mutante presenta un drástico descenso del porcentaje de germinación, que se sitúa en torno a un 30-40%, en el doble mutante, *abcg 2-1-xabcg20-1* (Figuras 16 y 17) y de un 15% para el triple mutante *abcg 2-1xabcg6-1xabcg20-1*, bajo las mismas condiciones (Figura 16).

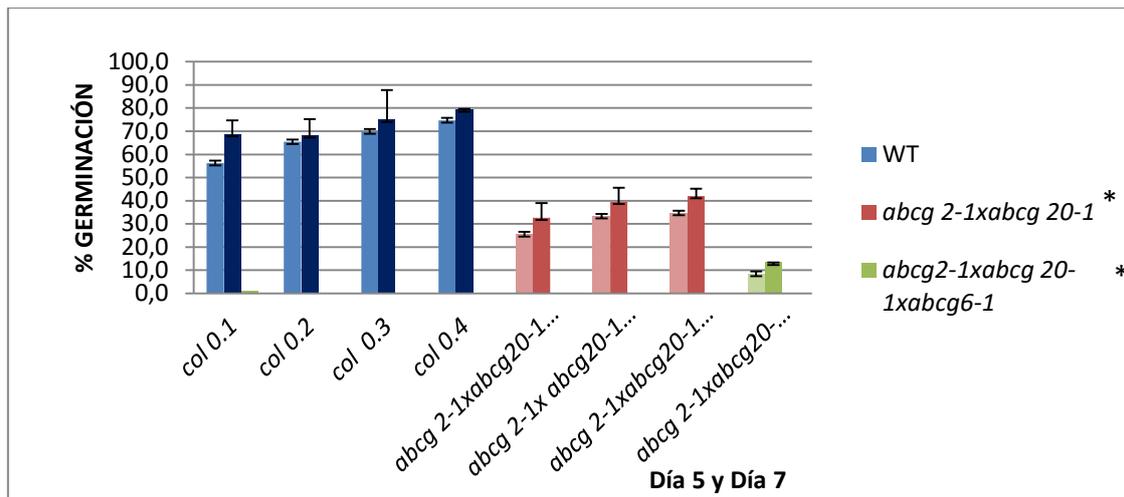


Figura 16: Ensayo de longevidad para el doble y triple mutante *abcg* de suberina. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Conteo realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

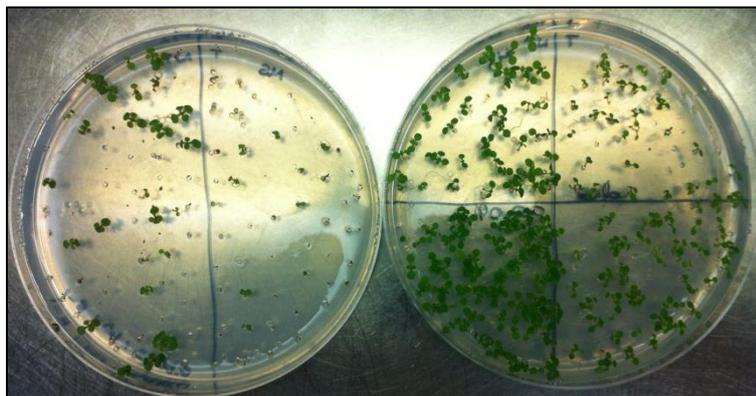


Figura 17: Imagen del doble mutante *abcg 2-1xabcg20-1* (Figura izquierda) frente a dos lotes de Col.0 (Figura derecha) a día 7 tras la siembra. Imagen representativa de todos los lotes y repeticiones. Semillas no tratadas a la izquierda y semillas tratadas a la derecha.

D) Proantocianinas

Se trata de compuesto fenólicos que al oxidarse presentan un color marrón característico en la cubierta de la semilla. De este compuesto derivan tres tipos de pigmentos según su metabolismo. Por un lado, las antocianinas, relacionados con chalconas, flavonas, flavonoles y flavodiolos (Winkel-Shirley 2001) que dan colores rojo, naranja, morado y azul en hojas, y los carotenoides y betalainas (Tanaka *et al.*, 2008).

De esta ruta de compuestos secundarios se conocen más de 20 mutantes relacionados con el fenotipo *Transparent Testa (tt)*, o con la deficiencia de taninos (*tds*) (Appelhagen *et al.*, 2014). Estas deficiencias en biosíntesis, transporte o acumulación (receptores) de

PAs provocan una deficiencia en el desarrollo de la cubierta de la semilla en las células adyacentes.

Para el caso de los mutantes *tds* se conoce que la falta de pigmentación marrón oscuro es debida a la acumulación de taninos o de PAs en una zona concreta de la cubierta, detectables mediante tinciones de vanilina (DMACA) (Abrahams *et al.*, 2002) cuyos pasos enzimáticos se encuentran recientemente descritos (Saïto *et al.*, 2013). Mientras que, la biosíntesis de los flavonoides, en relación con el fenotipo *Transparent Testa* solo se conoce a nivel transcripcional (Weisshaar and Jenkins 1998).

De la tabla 1 presentada en el apartado de materiales y métodos, dónde se presentan la colección de mutantes con relación a la ruta de proantocianinas, se escogió un mutante por gen implicado, exceptuando para el gen TT15 para el cual se realizó el ensayo con sus alelos con el fin de corroborar los valores obtenidos en uno de ellos. En la figura 10 se muestra las posiciones conocidas de los diferentes genes en la ruta de biosíntesis de los diferentes compuestos para *Arabidopsis thaliana*.

Siguiendo con la distribución de la tabla 10, el primer gen del ensayo fue una chalcona-sintasa (CHS, *tt4*) que, junto con la chalcona-isomerasa (CHI, *tt5*) y la flavona-hidroxilasa (F3H, *tt6*) modulan los pasos generales de la formación de flavonoides afectando también, a la acumulación de antocianinas. Los resultados obtenidos para los tres mutantes se muestran en las figuras 18 y 19.

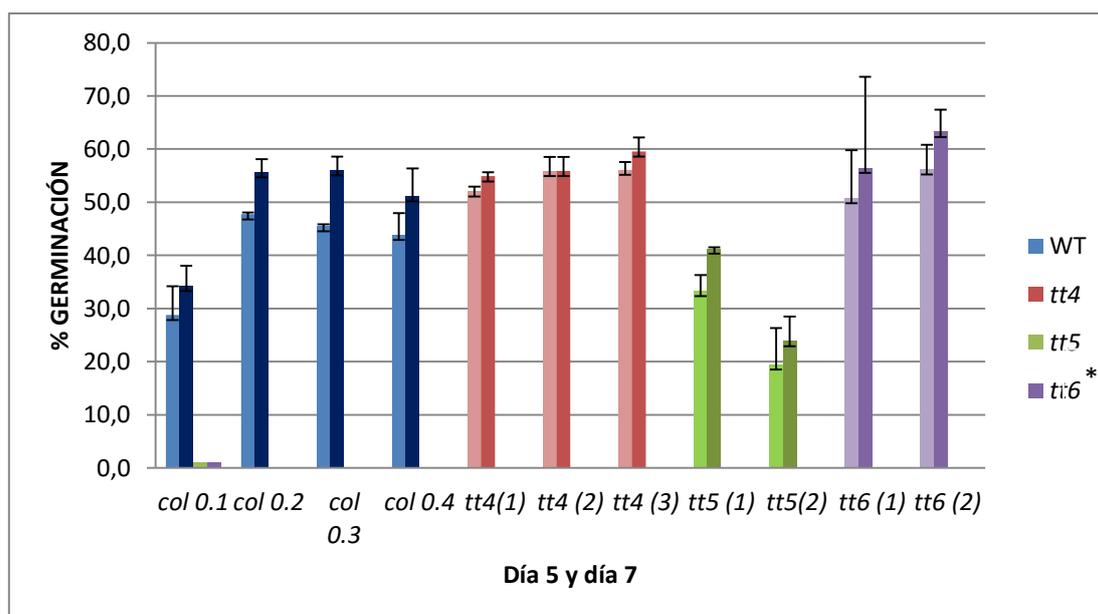
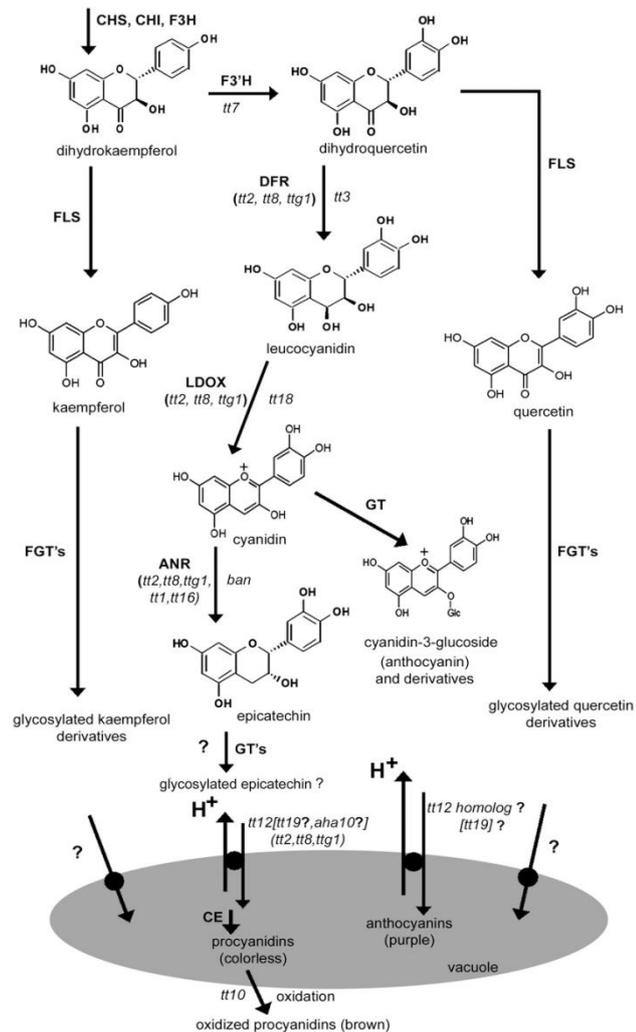


Figura 18: Ensayo de longevidad para los mutantes *tt4*, *tt5* y *tt6*. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) días tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

En la figura 18 se observa cómo, para los tres primeros pasos de la ruta, la germinación del WT permanecen dentro de un rango del 35 al 57% frente a una escasa variación para el mutante *chs* (72) del 55-60%, entre 22-40% para el mutante *chi* (73) y de entre el 58-63% para el mutante *f3h* (75). De estos resultados se pueden comparar con claridad los valores obtenidos por parte de los mutantes *chs* y *f3h* de los cuales no se han visto diferencias significativas con la germinación del WT, a pesar de la variación experimentada por parte de uno de los Col.0 ni tampoco, un retraso en la germinación en los primeros días del ensayo. Por tanto, esto nos lleva a pensar que la pérdida de dichas funciones no ha de ser determinante para la longevidad de la semilla o la existencia de una ruta alternativa complementaria a estas mismas. Por otro lado, para el mutante *chi*.

Sería interesante por tanto, la repetición del ensayo de este genotipo, aunque por su función bioquímica, es difícil argumentar el papel que pueda jugar en la longevidad, dado que los genes de los previos de la ruta no provocan ningún cambio.

Figura 19: Esquema simplificado de la ruta biosintética de las PAs en *Arabidopsis*. Incluye los pasos propuestos del transporte vacuolar. Dihidrocanferol se sintetiza a partir de 4-coumaroyl CoA y tres moléculas de malonil CoA mediante la acción secuencial de la chalcona sintasa (CHS), chalcona isomerasa (CHI), y flavanona 3-hidroxilasa (F3H). Las enzimas se representan en negrita mayúscula, mientras que las mutaciones genéticas están en cursiva minúsculas (Marinoiva *et al.*, 2007).



Continuando la línea que se sigue en la tabla 10 se presentan los datos obtenidos para los mutantes *tds 4-2*, dioxigenasa relacionada con el contenido de flavonoides de la familia LDOX, cuyos mutantes son deficientes para el contenido de antocianinas (Routaboul *et al.*, 2012), y el mutante en el gen BAN, que codifica una antocianidin-reductasa involucrada en el primer paso para la biosíntesis de PAs (Figura 20). De este último mutante se conoce la existencia de una redirección del flujo a través de la vía de biosíntesis de flavonoides de las PAs a las antocianinas viéndose bloqueado por la mutación en la reductasa del mutante (Devic *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2003).

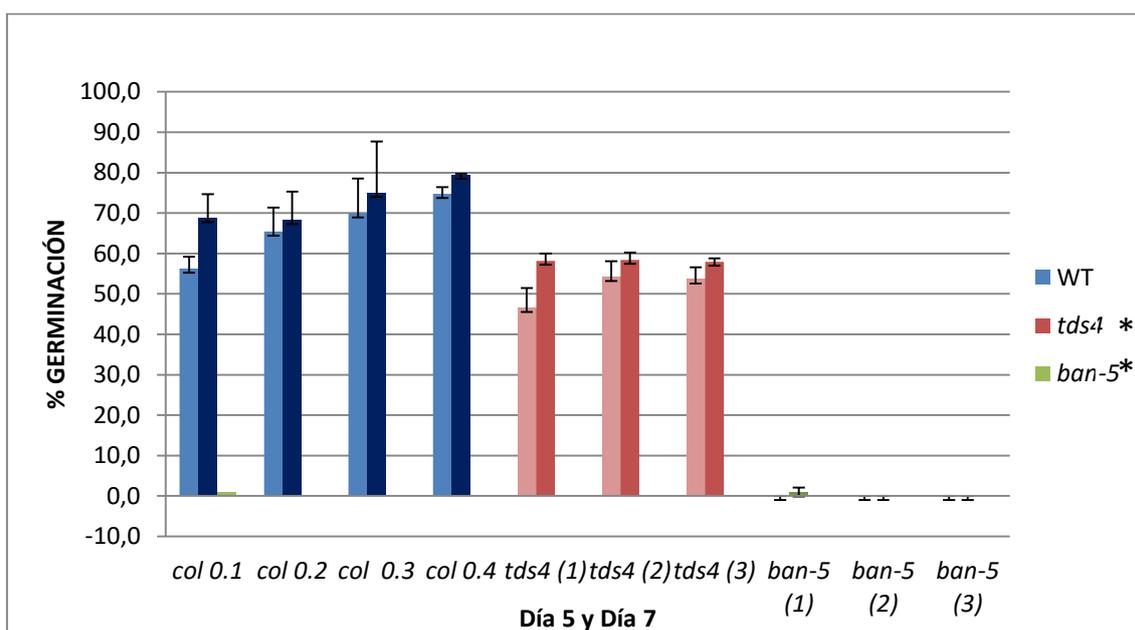
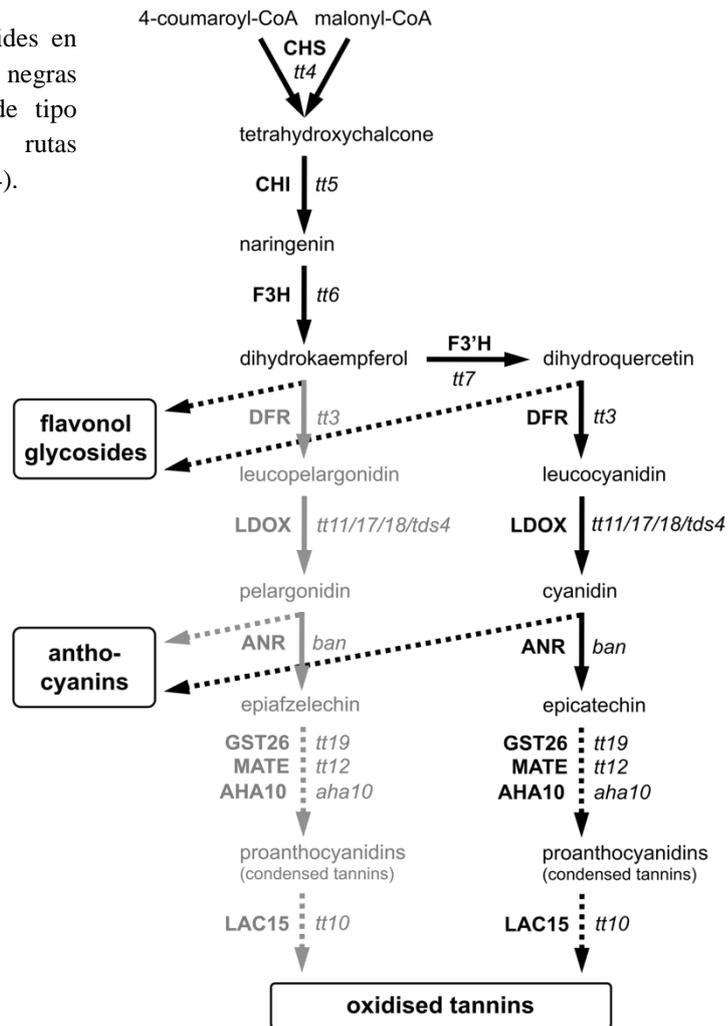


Figura 20: Ensayo de longevidad para los mutantes *tds4* y *ban*. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) días tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Cuento realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

En este caso vemos como la germinación presente entre los lotes de Col. 0 se encuentra entre un 70 y un 80% a día 7 mientras que el mutante *tds 4* presenta valores entorno al 60% frente a una clara disminución, casi total para el mutante *banyuls*, muy por debajo del 5% para todos los lotes obtenidos. Esto deja un primer tema de discusión claro, puesto que se conoce que el mutante *tds4* se encuentra situado como paso previo al mutante *ban*. Por ello, puede relacionarse como un paso limitante dentro de la ruta, o paso en el que, para el mutante *ban*, no existe ruta alternativa posible perdiendo así su función (Figura 21).

Figura 21: Biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis thaliana*. Las flechas negras muestran la vía en las plantas de tipo salvaje junto a las posibles rutas alternativas (Appelhagen *et al.*, 2014).



En la siguiente gráfica (Figura 22) se presentan los valores obtenidos para los mutantes *tt12*, *tt16* y *tt1*. Para TT1 y TT16 aún se desconoce su rol con exactitud dentro de la ruta, pero se sabe que interviene en alguna etapa relacionada con la acumulación de PAs durante el desarrollo de la semilla (Zhao *et al.*, 2010). Mientras que TT12 pertenece a una familia de transportadores relacionados con la acumulación de PAs, más concretamente de la epicatequina en el gradiente de protones (Zhao and Dixon 2009).

En la figura 22 se observa como Col. 0 no sufre apenas variación (80% de germinación en todos los ensayos) frente a la reducción de la germinación presente dentro de los tres diferentes mutantes. Siendo una variación de entre el 1-5% para el mutante *tt12*, del 16-30% para *tt16* y de entre 36 y 57% para el mutante *tt1*. Por lo que el único mutante con claras deficiencias se ve reflejado, con mayor uniformidad en *tt12*.

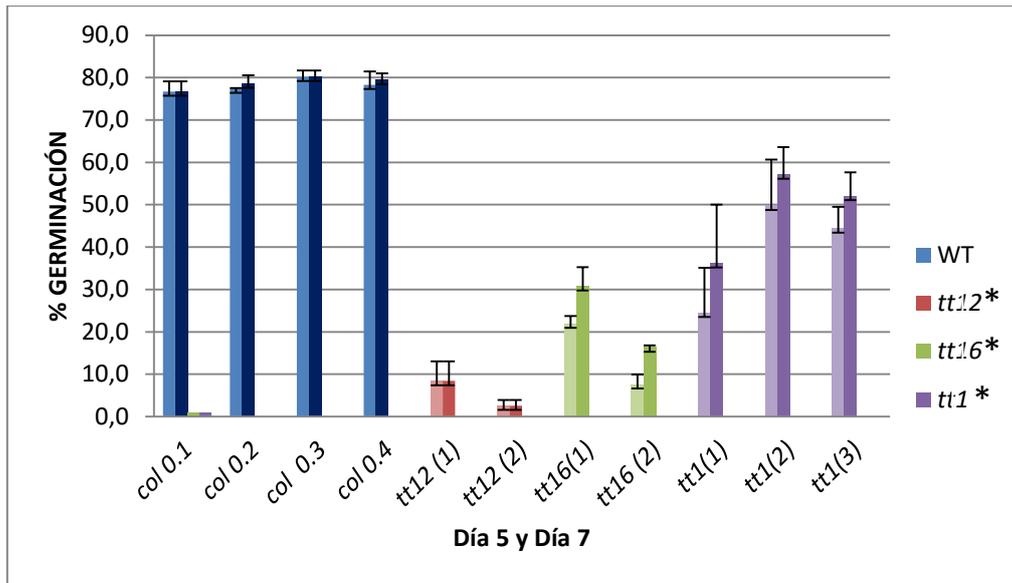


Figura 22: Ensayo de longevidad para los mutantes *tt12*, *tt16* y *tt1*. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Conteo realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

Por último, en la figura 23 se recogen los valores obtenidos para los mutantes *tt2*, *ttg1* y *ttg2* donde de TT2 y TTG1 se conoce la formación de un complejo regulador del metabolismo de PAs, junto con TT8 (Baudry *et al.*, 2004). Dicho complejo es necesario para la expresión correcta de Banyuls ya que se trata de activadores directos. Mientras que para TTG 2 su función no es del todo clara en la acumulación de PAs durante el desarrollo de la semilla de donde solamente se conoce que se trata de un factor implicado en la elongación celular (Appelhagen *et al.*, 2014).

Con una germinación de un 55% en el WT Col. 0 los valores de los diferentes mutantes también se han visto afectados por las variaciones existentes entre sus diferentes lotes., entre un 30 y un 40% para TT2, entre un 15-50% para TTG1 y de entre un 10 y un 50% y entre un 15 y un 30% a día 7. La alta variación obtenida en este ensayo entre réplicas del mismo genotipo, nos hace ser prudentes con cualquier interpretación. En estos momentos estamos generando nuevos lotes de semillas para repetir el ensayo en condiciones más controladas.

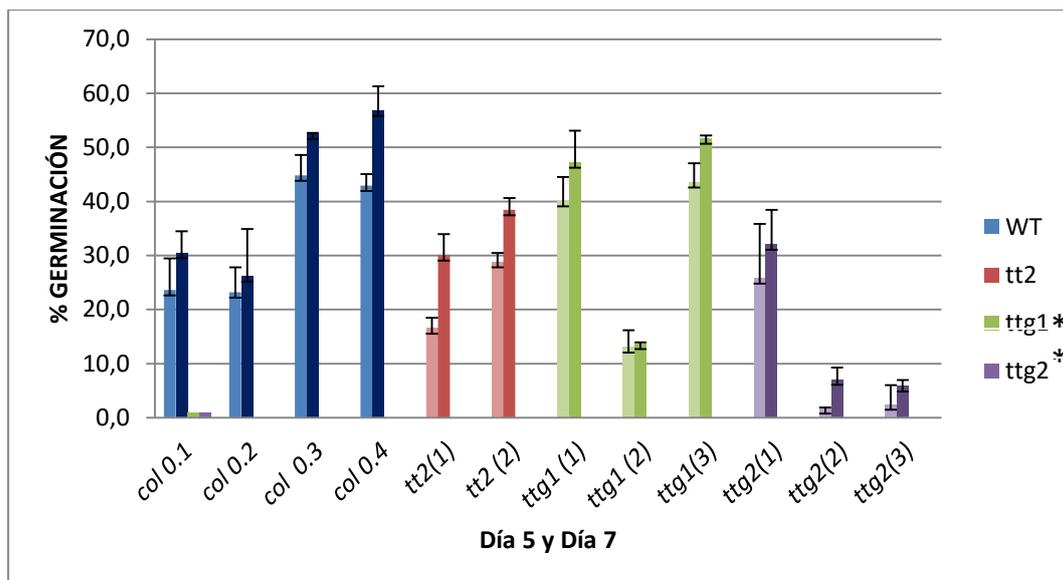


Figura 23: Ensayo de longevidad para los mutantes *tt2*, *ttg1* y *ttg2*. Datos obtenidos al quinto (columna izquierda) y séptimo (columna derecha) día tras la siembra con el respectivo WT (Col.0). Conteo realizado sobre una media de 70 semillas por lote. Datos acompañados de lotes sin tratar con germinación >90% (no mostrados). Diferencias significativas en asterisco.

4.2. Expresión de HB25 y COG1 en la semilla

4.2.1 Construcciones. Diseño de la clonación.

El objetivo de este ensayo es obtener dos construcciones que contengan una de ellas el promotor del gen HB25 dirigiendo la expresión de GUS-GFP y otra de ellas que contenga el promotor del gen COG1 dirigiendo de la misma manera la expresión de GUS-GFP con el fin de evaluar donde se está expresando en semilla.

Dichas construcciones se obtuvieron mediante el diseño experimental descrito en el apartado 3.3 de materiales y métodos (manejo y cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*). Para la amplificación se utilizaron una pareja de primers para cada promotor como se muestra en la tabla 5 donde para HB25 se amplificaron 2500 pb del promotor mientras que para COG1 se amplificaron 2000 pb del promotor.

HB25	Secuencia
At5g65410PromXbaIFor	CATGATGGTCAAGAAGTCGAGAAATGTGAAAC
At5g65410PromNcoIFor	TGCTCTAGAATAAACAGTAGACGTCGACATGGG
COG1	
At2g29160PromXbaIFor	TGCTCTAGATCATCCATTCATGAAAAAGGTAC
At2g29160PromNcoIRev	CATGCCATGGTAAAATGAGAGAGAGATAGA

Tabla 5: Pareja de primers utilizados para la amplificación

Para hacer la clonación más segura, se generaron extremos romos en pCambia1303 digeridos con XbaI y NcoI lo que aumentaba además, la eficiencia de las uniones.

Con la intención de estudiar la localización tisular de los factores de transcripción descritos, las construcciones obtenidas se agroinfiltraron en *Arabidopsis thaliana* (materiales y métodos 3.3) de cuyo resultado se obtuvieron las líneas que se describen en la figura 24.

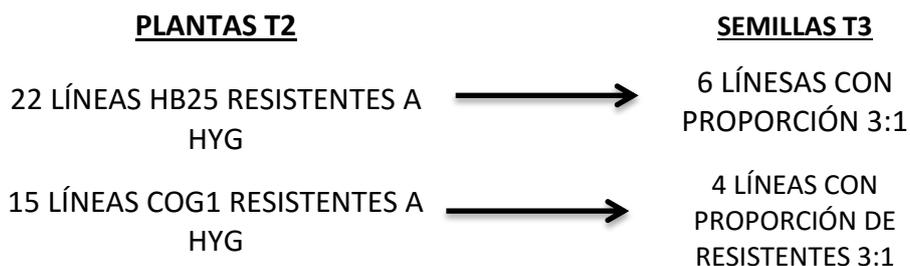


Figura 24: Esquema de las líneas obtenidas con una inserción para cada clonación.

El resto de líneas obtenidas poseían proporciones de semillas germinadas del 100% o cercanas por lo que estas líneas presentan más de una inserción. De estas líneas se obtuvieron los ensayos preliminares de expresión en tejido fresco, mientras que la selección de T2 con una inserción, se destinaron para la obtención de la T3 en homocigosis en los sucesivos ensayos con el fin de determinar el nivel de expresión de los promotores.

4.2.2 Ensayos preliminares de expresión de GUS

A. Ensayos de expresión en tejido fresco

El principal objetivo de las primeras tinciones GUS en tejido fue la puesta a punto de los diferentes protocolos para la comprobación de la expresión en líneas con una o más inserciones.

En la figura 26 se muestra la expresión GUS para una de las líneas de HB25 con más de una inserción (Figura 26 A y B) donde la expresión en hoja y raíz son claras mientras que, para las líneas con una inserción (Figura 26 C y D), la expresión aparece disminuida. Además se observa como las zonas meristemáticas esta expresión desaparece, lo que concuerda con el patrón de expresión obtenidos de la base de datos eFP Browser para COG1 (Figura 25).

Figura 25: Patrones de expresión de COG1 (Figura izquierda) y HB25 (Figura derecha).

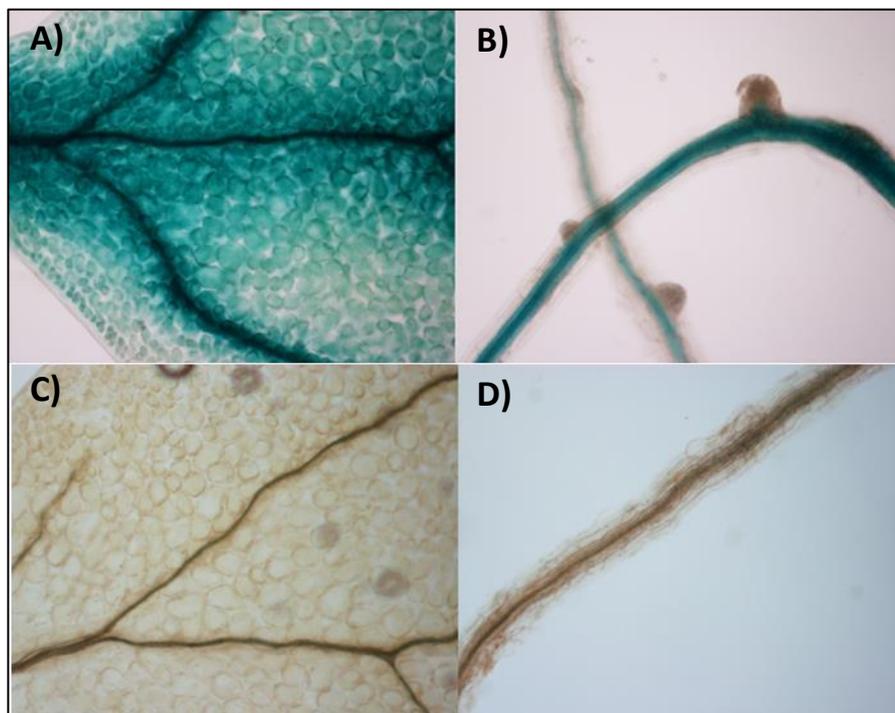
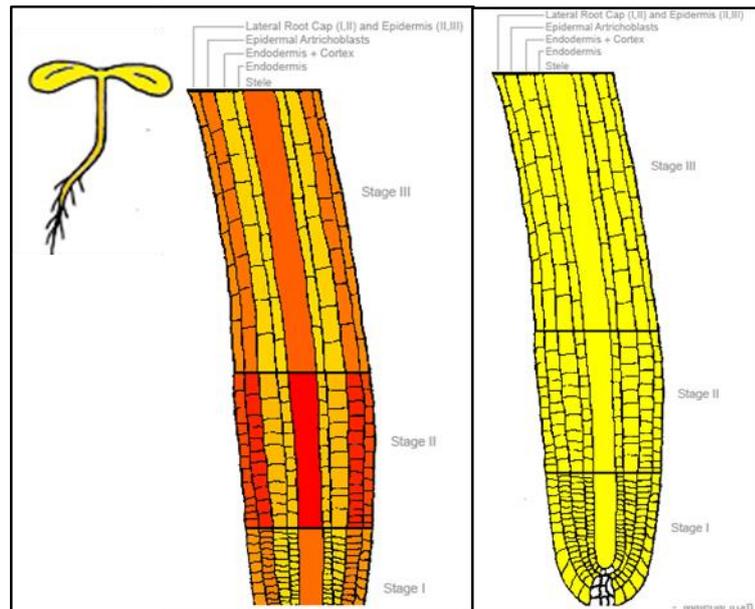


Figura 26: Expresión GUS en hoja y raíz principal para una línea de HB25 mediante protocolo de tinción estándar. Las A y B presentan una línea de HB25 con más de una inserción. Las imágenes C y D representan una línea de HB25 con solo una inserción.

De la misma manera, se realizaron tinciones GUS para las líneas de COG1 donde el nivel de expresión es muy similar, en primera instancia, que lo presente en HB25. Los resultados de las tinciones se recogen en la figura 27.

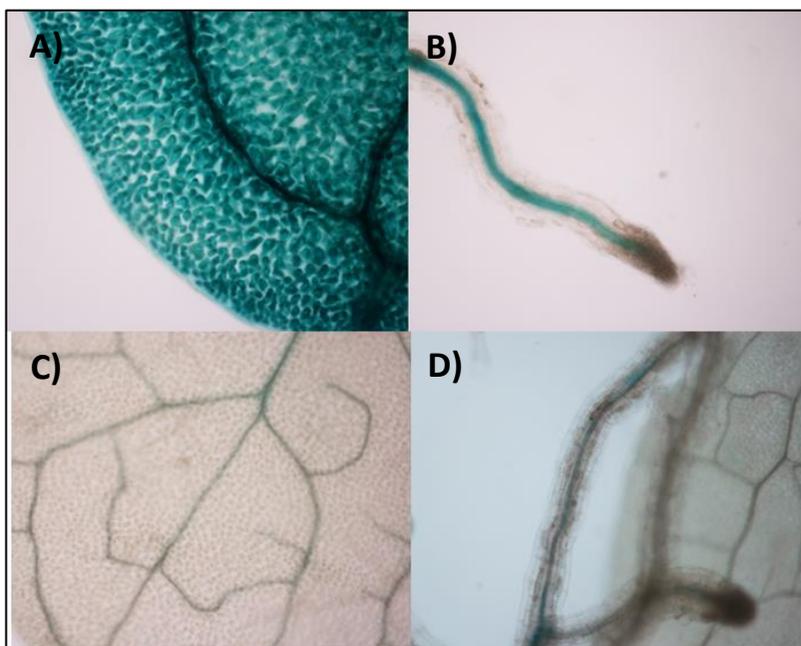


Figura 27: Expresión GUS en hoja y raíz principal para una línea de COG1 mediante protocolo de tinción estándar. Las figuras A y B representan una línea de COG1 con más de una inserción. Las figuras C y D representan una línea de COG1 con solo una inserción.

B. Ensayos de expresión en semillas

Para los ensayos en semillas se determinaron unos días de tomas de muestras en relación con los diferentes estadios de desarrollo de la semilla.

Después de los ensayos de expresión en tejido se determinó el marcaje de semillas de aquellas líneas con elevada expresión (> 1 inserción) siendo la posterior flor a la última florecida como día 0 de las que se tomaron muestras de silicuas a 3, 5 y 7 días, coincidiendo con el desarrollo de las diferentes capas de la cubierta de la semilla. Para el día 3 se buscaba que coincidiera con el primer estadio del desarrollo embrionario (globular), para día 5 un estadio de corazón-torpedo y para el día 7 un estadio del embrión de torpedo- bastón. Esta selección junto con el seguimiento del desarrollo, se determinó por las limitaciones existentes para la tinción GUS. A etapas mayores de 7

días, la imposibilidad de la entrada del GUS limita la posibilidad de determinar la disposición espacial de la señal.

El protocolo de tinción de semillas utilizado se basó en Debeaujon *et al.*, 2003, evitando los cortes de semillas. El objetivo principal de dicho ensayo fue detectar la presencia de GUS en semilla acotando de forma espacio-temporal la expresión de los promotores.

En la figura 28 se muestra la expresión GUS para semillas a día 3 de ambos promotores. En ellas se observa una intensa coloración en la zona del micrópilo, y de forma leve en la zona del embrión y en la parte más externa de la semilla.

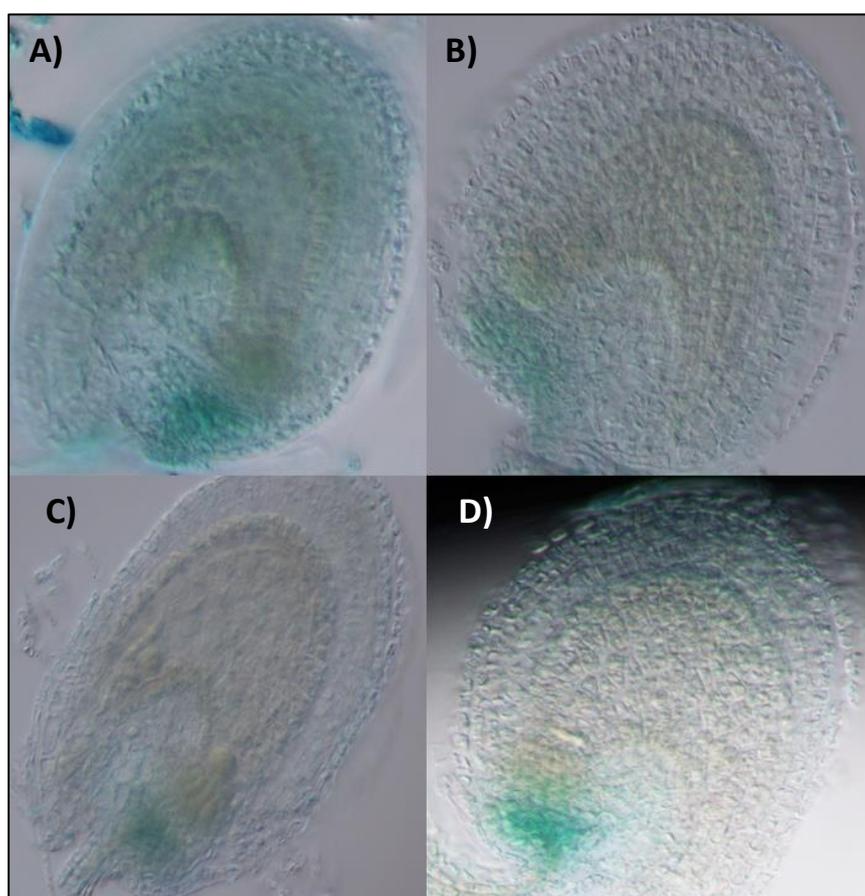


Figura 28: Expresión GUS en semilla a día 3 tras ser marcada para las líneas COG1 (Figuras A y B) y HB25 (Figuras C y D) con más de una inserción.

Continuando con el desarrollo de la semilla tenemos la figura 29 donde se muestra la expresión de ambas líneas para el día 5. En este caso la expresión GUS del endotelio es apenas observable, mientras las únicas zonas donde se distingue la coloración recaen la capa más exterior y en la zona del micrópilo. Esto puede ser debido al comienzo de la lignificación de la semilla lo que obstaculiza la tinción.

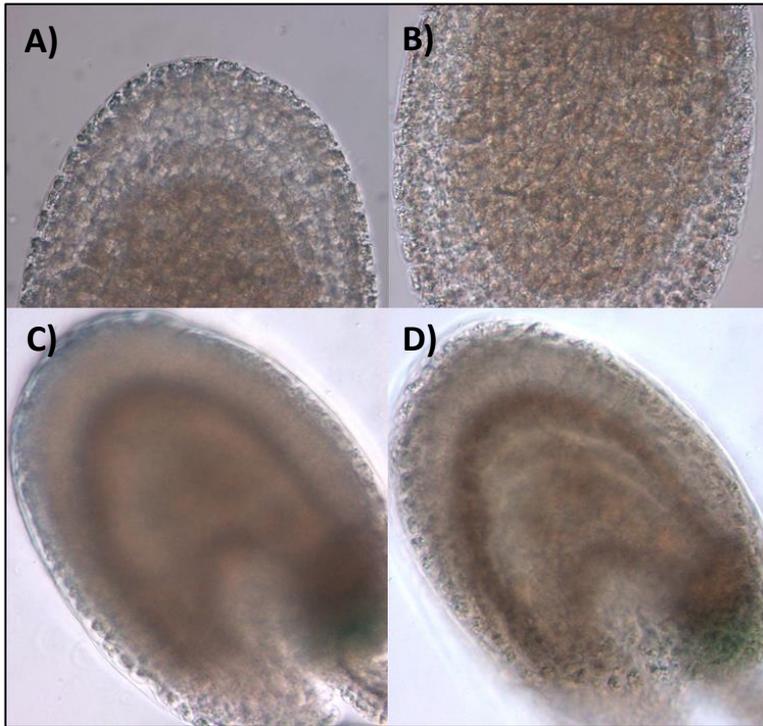


Figura 29: Expresión GUS en semilla a día 5 tras ser marcada para las líneas COG1 (Figuras A y B) y HB25 (Figuras C y D) con más de una inserción.

Por último, en la figura 30 se muestra la tinción GUS a día 7. En ella se observa la poca señal existente salvo en la zona del micrópilo para la línea de COG1. Esto nos confirma la posibilidad de una mala tinción debido a la lignificación total de la semilla al final de su desarrollo.

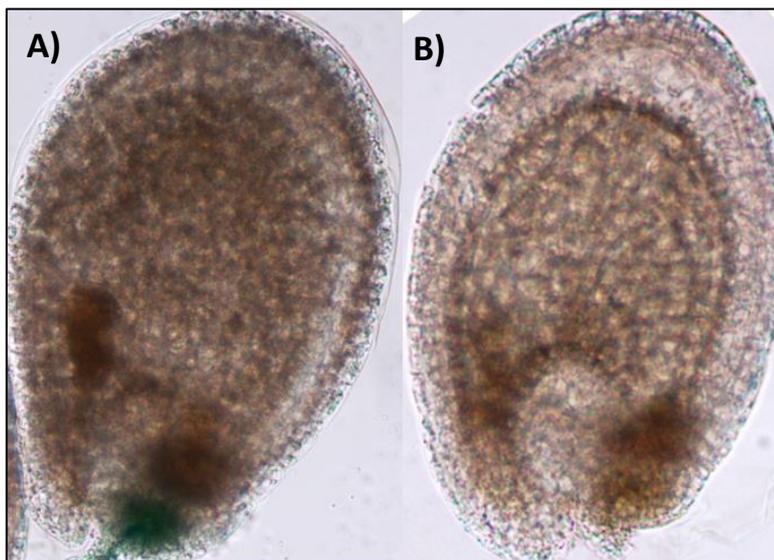


Figura 30: Expresión GUS en semilla a día 7 tras ser marcada para las líneas COG1 (Figura A) y HB25 (Figura B) con más de una inserción.

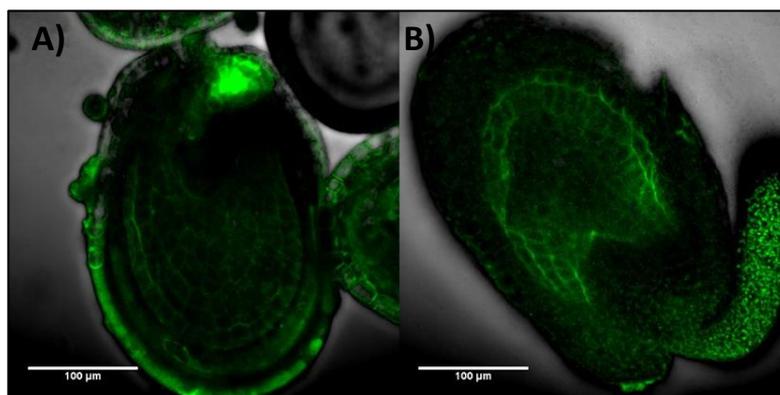
4.2.3 Ensayos preliminares de expresión GFP

Con el fin de determinar de forma más concreta las capas donde se expresan ambos promotores, se comprobaron dichos resultados a días 3,5 y 5, con estudios de expresión GFP profundizando así de una forma general en la expresión 3D de las diferentes capas.

En la figura 31 se muestran las imágenes obtenidas para la expresión GFP a día 7 donde se puede observar claramente la expresión por parte de los promotores. Encontramos que para HB25 la expresión se encuentra en las capas internas del endospermo a día 5 y se confirma a día 7 con una señal más clara como se aprecia en la figura 31. Mientras que para COG1 la expresión se observa en la capa más externa de la semilla. Esto corrobora y da consistencia a los datos obtenidos en los ensayos de expresión GUS.

Por otro lado, para el resto de los días (día 3 y día 5) las imágenes no son del todo concluyente, lo que no nos permite constatar la expresión en el tiempo, sino solamente en el espacio.

Figura 31: Expresión GFP a día 7 para las líneas COG 1 (Figura A) y HB25 (Figura B) con más de una inserción.



5. DISCUSIÓN

En los últimos años la cubierta de la semilla ha tenido una gran importancia en los estudios relacionados con la germinación de la semilla. Si bien está establecido en numerosos trabajos publicados su relación con la longevidad todavía es desconocida. Por ello, este trabajo final de máster fue diseñado con el fin de arrojar algo de luz entre las diferentes capas de la cubierta de la semilla y la longevidad de la misma.

La idea de la obtención de una amplia colección que pudiera conformar una visión general de las diferentes capas intenta relacionar los conocimientos publicados con los resultados obtenidos en nuestro ensayo de longevidad. Este tipo de rastreo y búsqueda tienen la originalidad de implicar todas las rutas conocidas hasta el momento, sin embargo, es de destacar las complicaciones que hemos encontrado, como la variabilidad de las muestras, pese a las medidas de aleatorización diseñadas, y las repeticiones llevadas a cabo bajo las mismas condiciones.

Así mismo el segundo objetivo de colocar de forma espacio-temporal los factores de transcripción HB25 y COG1, ambos implicados en la longevidad de la semilla, presenta un carácter importante de cara a futuros experimentos relacionados con la identificación de las dianas de ambos.

5.1. Importancia del mucilago en longevidad

En los últimos años los estudios publicados sobre el mucilago han tratado de estudiar su composición, posición y concentración en diferentes estadios como por ejemplo, en raíz y semilla. Por lo que esto se ha visto directamente relacionado con la germinación de la semilla (Clerkx *et al.*, 2004).

Para este ensayo hemos utilizado el mutante de una enzima necesaria para el aumento de volumen en contacto con el agua (MUM2) y dos líneas sobreexpresoras de dicho gen.

MUM2 actúa de manera conjunta con otros dos genes encargados de la modificación de la estructura de la pectina (Western *et al.*, 2001) y que dicho gen necesita de otros genes que actúen como reguladores para su desarrollo normal (MUM1 y LUH) (Huang *et al.*, 2011).

Por otra parte, de sus líneas sobreexpresoras solamente se conoce que intervienen en la recuperación de fenotipo de otros genes relacionados (Dean *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011). Aun así estos estudios de comportamiento y composición de mucilago no son determinantes para relacionar los resultados obtenidos en nuestros ensayos con la longevidad de la semilla.

5.2. Importancia del almidón en la longevidad

En nuestro laboratorio se llevaron a cabo experimentos previos sobre mutantes con fenotipo. En ellos se estudió la sensibilidad a envejecimiento del mutante *sex 1-7* dónde se estudió su drástica pérdida de germinación y se relacionó finalmente con una ausencia total de suberina.

Los resultados obtenidos en este apartado volvieron a ser poco definitivos de disminuciones de la germinación obtenidas fueron similares tanto para los simples como para los dobles mutantes de los diferentes genes estudiados.

El gen *SEX-4* interviene en el metabolismo del almidón defosforilándolo y posteriormente liberándolo por medio de amilasas e isoamilasas (*AMY3* e *ISA3*). Estos genes junto con el gen *LDA* pertenecen a un grupo de genes que intervienen descomposición del almidón cuyas funciones en algunos casos son redundantes (Streb *et al.*, 2012). Su función en semilla no está aún del todo claro, y los escasos trabajos relacionados no se encuentran especies modelo (Kang *et al.*, 2013). Sin embargo estudios de arrays (eFP Browser) muestran la expresión de los diferentes genes en los distintos estadios del desarrollo de la semilla.

Otra grupo de genes estudiados por medio de sus dobles y triples mutantes fueron los genes *SS1*, *SS2* y *SS3* de los que se conocen su función en la biosíntesis del almidón, concretamente en la síntesis de la amilopectina (Szydłowski *et al.*, 2011). De nuevo el conocimiento de redundancia de funciones entre estos genes se ha podido relacionar con los resultados obtenidos en los ensayos de germinación. La superposición de funciones puede enmascarar por tanto la pérdida de germinación haciendo que las diferencias no sean de carácter significativo.

5.3. Importancia de la suberina en la longevidad

El papel de la suberina en la germinación ha sido estudiado en profundidad por los diferentes mutantes ensayados a lo largo de este trabajo, procurando relacionar los resultados obtenidos en los mutantes cuya germinación se ha visto gravemente disminuida, con el importante papel que tiene la suberina como barrera en la pared celular y su posible relación en la longevidad.

En los últimos años se han descrito un amplio número de genes implicados en la biosíntesis de los precursores de este poliéster. Uno de los principales genes involucrados es CYP86b1 cuyos resultados obtenidos en este trabajo no dejan claro su relevancia en la germinación dónde la disminución de la germinación presentada no fue tan determinante como esperábamos lo que nos llevó a la búsqueda y consulta de bibliografía que pudiera constatar problemas en semilla o algún problema relacionado con la germinación. Los estudios existentes para este gen se han centrado en su repercusión en raíz y semilla donde se conoce su coexpresión con CYP86A1 que muestra una reducción de suberina en raíz del 60% (Compagnon *et al.*, 2009). Por otra parte, el gen estudiado interacciona de manera directa con otro gen de elevada similitud, GPAT5 descrito ya descrito en Beisson *et al.*, 2007 lo que por tanto, no lo hace suficiente para modificar las propiedades fisiológicas de la semilla ni de la planta (Compagnon *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos por tanto podrían ser relevantes para estudios futuros en la obtención de dobles mutantes que puedan explicar de forma más detallada su papel en la germinación.

Los resultados que se obtuvieron en el gen FACT muestran una disminución de la germinación significativa que queda enmascarada por la gran variación que presentan los diferentes lotes del WT lo que impide tomar como relevante estos datos.

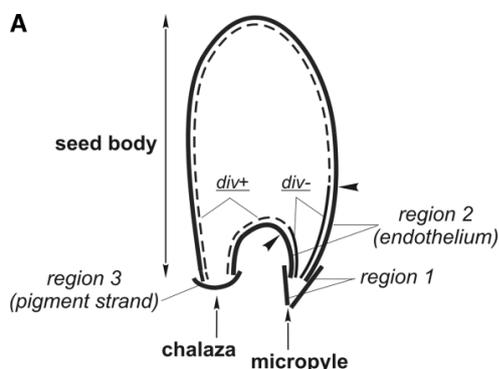
Para relacionar de alguna manera estos datos se buscó bibliografía relacionada con la acumulación en la semilla o su repercusión en esta. En este caso, se conoce que el gen FACT se encuentra en semillas en desarrollo, concretamente en la capa del tegumento exterior (Kosma *et al.*, 2012) controlando el contenido de cafetato y su deposición en la cubierta de la semilla. Estos estudios junto con la relación directa con otros genes como lo son FAR y ASFT en relación con la síntesis de suberina (Beisson *et al.*, 2012), hace destacar la posible importancia del gen FACT en la germinación de la semilla.

Por último los otros genes estudiados en este trabajo, como son el gen ABCG y el gen TT15, han permitido relacionar las publicaciones disponibles hasta el momento en el desarrollo de la semilla con la germinación y, por tanto, en primera instancia con una posible relación en la longevidad. Sus mutantes, conocidos y estudiados en profundidad en los últimos años con el fin de determinar las funciones de los diferentes genes (Yadav *et al.*, 2014; Appelhagen *et al.*, 2014) han permitido conocer el papel real que presentan en la cubierta de la semilla. Ambos factores de transcripción son por tanto, en diferentes alelos y mediante comprobación por dobles y triples mutantes, determinantes en la síntesis de suberina por lo que una pérdida de función conlleva a una pérdida casi total de germinación pudiendo tener un papel interesante en la longevidad.

5.4. Implicación de las proantocianinas en la longevidad

La existencia de un gran número de mutantes relacionados con la ruta biosintética de las PAs y en algunos casos, la relevancia de los diferentes alelos que intervienen para un mismo gen dificultan la obtención de resultados significativos en los ensayos de envejecimiento además, la importancia de la región de acumulación de las PAs puede ser determinante en la obtención de fenotipo (Figura 32).

Figura 32: Esquema de la disposición de las células que acumulan PAs en tres regiones principales y sus respectivas subdivisiones. Micropilo, endotelio y chalaza. Debeaujoun *et al.*, 2003.



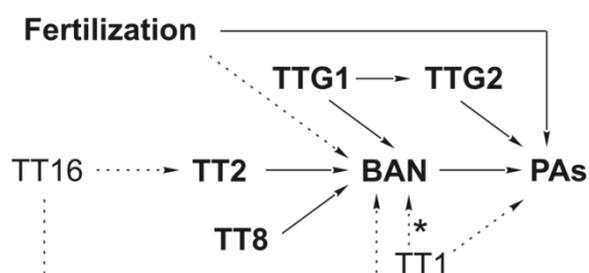
Entre los diferentes resultados obtenidos destacan los del mutante *ban-5* que, siguiendo el esquema de la figura 20 de los resultados, se encuentra posterior al gen TDS4 cuyos resultados de germinación por el contrario, no han sido significativos. Su drástica bajada de germinación hace interesante el estudio de los resultados.

En los pasos previos, hasta el mutante *tds4*, los resultados no presentan diferencias significativas a pesar de las variaciones presentes tanto por parte de los WT como por los diferentes lotes de los mutantes. Lo interesante aparece a partir del paso que existe entre el gen TDS y BAN donde hasta el momento no se ha descrito, ninguna ruta

alternativa, como las que se conocen para otros genes (Figura 21) que pueda realizar la misma función.

Para los genes conocidos TTG1, TT2 y TT1 si se conoce una relación con BAN. Estos tres genes poseen actividades dominantes (Figura 33), donde una posible pérdida de función de uno de ellos explicaría, de alguna manera, la pérdida de germinación de BAN. La relación de todos ellos en conjunto hacen significativo los resultados obtenidos y la posible repercusión en la longevidad debido a la pérdida de germinación de la semilla.

Figura 33: Actividades de los genes señalados. Los genes con actividades dominantes se muestran en negrita. Para el caso de TT1, solo se necesita en unas pocas células. Debeaujoun *et al.*, 2003



Por último, otra posible idea que surge a partir de estos resultados es la existencia de diferentes conformaciones de metabolitos que forman las proantocianinas y por lo tanto, unas presenten mayor relevancia frente a otras. Para ello, sería de interés el estudio de metabolitos para las diferentes líneas obtenidas.

5.5. Expresión de los genes HB25 Y COG1

Como ya se ha señalado en el apartado correspondiente en resultados, estas construcciones obtenidas con ambos promotores han permitido realizar una estimación de los genes en una capa concreta tanto en el endotelio para HB25 como en la capa más externa para COG1.

La baja expresión obtenida por parte de ambas construcciones nos hace restablecer el proceso inicial planteado de cara a la utilización de estudios de Chip-seq donde condiciona la necesidad del promotor original con elevada expresión.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahams S., Tanner G.J., Larkin P.J., Ashton A.R. (2002). Identification and biochemical characterization of mutants in the proanthocyanidin pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:561–576.
- Abrahams S., Lee E., Walker A.R., Tanner G.J., Larkin P.J., Ashton A.R. (2003). The *Arabidopsis TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J* 35:624–636.
- Appelhagen I, Thiedig K, Nordholt N, Schmidt N, Huet G, Sagasser M, Weisshaar B. (2014) Update on transparent testa mutants from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta* 240(5):955-70.
- Appelhagen I., Huet G., Lu G.H., Strompen G., Weisshaar B., Sagasser M. (2010) Weird fingers: functional analysis of WIP domain proteins. *FEBS Letters* 584:3116–3122.
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B., Lepiniec L. (2004) TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 39:366–380.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad Sci Paris* 316, 1194–1199.
- Bechtold N., Pelletier G. (1998) *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* no. 82: 259–266.
- Beeckman, T., De Rycke, R., Viane, R., and Inzé, D. (2000). Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* 113, 139–148.
- Beisson F., Li Y., Bonaventure G., Pollard M., Ohlrogge J.B. (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 351–368.
- Beisson F., Li-Beisson Y., Pollard M. (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 15: 329–337.
- Bernards, M.A. (2002) Demystifying suberin. *Can J Bot* 80: 227-240.

- Bowerman P.A., Ramirez M.V., Price M.B., Helm R.F., Winkel B.S. (2012). Analysis of T-DNA alleles of flavonoid biosynthesis genes in *Arabidopsis* ecotype Columbia. *BMC Res Notes* 5:485.
- Brillouet J.M., Romieu C., Schoefs B., Solymosi K., Cheynier V., Fulcrand H., Verdeil J.L., Conéjéro G. (2013) The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Ann Bot (Lond)* 112:1003–1014.
- Buer C.S., Sukumar P., Muday G.K. (2006) Ethylene modulates flavonoid accumulation and gravitropic responses in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140:1384–1396.
- Bueso, E., Muñoz-Bertomeu, J., Campos, F., Brunaud, V., Martínez, L., Sayas, E., Ballester, P., Yenush, L., Serrano, R. (2014). *Arabidopsis thaliana* homeobox25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiol* 164: 999-1010.
- Cameron, K.D., Teece, M.A., and Smart, L.B. (2006). Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 140: 176–183.
- Châtelain, E., Satour, P., Laugier, E., Ly Vu, B., Payet, N., Rey, P., Montrichard, F. (2013). Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 3633-3638.
- Clercx, E.J.M., Blankestijn-De Vries H., Ruys G.J., Groot P.C., Koornneef M. (2004) Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol Plant* 121: 448–461.
- Compagnon, V., Diehl, P., Benveniste, I., Meyer, D., Schaller, H., Schreiber, L., Franke, R. and Pinot, F. (2009) CYP86B1 is required for very long chain α -hydroxyacid and α,ω -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester. *Plant Physiol.* 150, 1831–1843.
- Dean GH, Zheng H., Tewari J., Huang J., Young D.S., Hwang Y.T., Western T.L., Carpita N.C., McCann M.C., Mansfield S.D., *et al.*, (2007) The *Arabidopsis* MUM2 gene encodes a β -galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties. *Plant Cell* 19: 4007–4021.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122: 403-414.

- Debeaujon I., Peeters A.J.M., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. (2001) The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* 13:853–872.
- Debeaujon I., Nesi N., Perez P., Devic M., Grandjean O., Caboche M., Lepiniec L. (2003) Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* 15:2514–2531.
- DeBolt S., Scheible W.R., Schrick K., Auer M., Beisson F., Bischoff V., Bouvier-Navé P., Carroll A., Hematy K., Li Y., Milne J., Nair M., Schaller H., Zemla M., Somerville C. (2009) Mutations in UDPglucose: sterol glucosyltransferase in *Arabidopsis* cause transparent testa phenotype and suberization defect in seeds. *Plant Physiol* 151:78–87.
 - Debono A., Yeats T.H., Rose J.K., Bird D., Jetter R., Kunst L., Samuels L. (2009) *Arabidopsis* LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell* 21: 1230–1238.
 - Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S. M., and Zeeman, S. C. (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J. Biol. Chem.* 281, 12050–12059.
 - Delvallé D., Dumez S., Wattebled F., Roldán I., Planchot V., Berbezy P., et al. (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* no. 43: 398–412.
 - Devic M., Guillemintot J., Debeaujon I., Bechtold N., Bensaude E., Koornneef M., Pelletier G., Delseny M. (1999) The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J* 19:387–398.
 - Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J., and Edwards, R. (2009). Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot* 60, 1207–1218.
 - Domergue F, Vishwanath SJ, Joubès J, Ono J, Lee JA, Bourdon M, Alhattab R, Lowe C, Pascal S, Lessire R, et al (2010) Three *Arabidopsis* fatty acyl-coenzyme A reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, generate primary fatty alcohols associated with suberin deposition. *Plant Physiol* 153: 1539–1554.

- Espelie, K.E., Davis, R.W., Kolattukudy, P.E. (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of the grapefruit (*Citrus paradise* Macfed.) *Planta* 149: 498-511.
- FAO (1983): [http://www.fao.org/docrep/x5563E/X5563e0a.htm#e.plant_genetic_resources_\(follow_up_of_conference_resolution_681\)](http://www.fao.org/docrep/x5563E/X5563e0a.htm#e.plant_genetic_resources_(follow_up_of_conference_resolution_681)) Noviembre-2015.
- Garcia D., Fitz Gerald J.N., Berger F. (2005) Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:52–60.
- Gasser, C.S., Robinson-Beers, K. (1993). Pistil development. *Plant Cell* 5: 1231-1239.
- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* 53:814–827.
- Gonzalez A., Mendenhall J., Huo Y., Lloyd A. (2009) TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation. *Developmental Biology* 325:412–421.
- Goto, N. (1985). A mucilage polysaccharide secreted from testa of *Arabidopsis thaliana*. *Arabid. Inf. Serv* 22: 143-145.
- Hand, S.C., M. A. Menze, M. Toner, L. Noswell and D. Moore. (2011) LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. *Annu Rev Physiol* 73: 115-134.
- Haughn, G., Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 10: 472-477.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Tetteroo F.A. and Wolkers W.F. (2001) Induction of Desiccation Tolerance in Plant Somatic Embryos: How Exclusive Is the Protective Role of Sugars? *Cryobiology* 43, no.2: 140-150.
- Huang J., DeBowles D., Esfandiari E., Dean G., Carpita N.C., Haughn G.W. (2011) The *Arabidopsis* transcription factor LUH/MUM1 is required for extrusion of seed coat mucilage. *Plant Physiol* 156:491–502.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama O. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, no. 1: 23-28.

- Iriondo J.M., (2001): Conservación de recursos fitogenéticos In: Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos 15-31. Eds.: González-Andrés F and Pita JM.
- Ishida T., Hattori S., Sano R., Inoue K., Shirano Y., Hayashi H., et al. (2007) *Arabidopsis* TRANSPARENT TESTA GLABRA2 is directly regulated by R2R3 MYB transcription factors and is involved in regulation of GLABRA2 transcription in epidermal differentiation. *Plant Cell*. 19:2531–43.
- Jia L., Wu Q., Ye N., Liu R., Shi L., Xu W., Zhi H., Bin Rahman A.N.M., Xia Y., Zhang J. (2012) Proanthocyanidins inhibit seed germination by maintaining a high level of abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 54: 663–673.
- Johnson C.S., Kolevski B., Smyth D.R. (2002) *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14: 1359–1375.
- Kang G.Z., Liu G.Q., Xu W., Zhu Y.J., Wang C.Y., Ling H.Q., Guo T.C. (2013) Identification of the isoamylase 3 gene in common wheat and its expression profile during the grain-filling period. *Genet Mol Res* 12 n°4:4264-75.
- Kim Y.C., Nakajima M., Nakayama A., Yamaguchi I. (2005) Contribution of gibberellins to the formation of *Arabidopsis* seed coat through starch degradation. *Plant Cell Physiol* 46: 1317–1325.
- Kitamura S., Shikazono N., Tanaka A. (2004) *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J* 37:104–114.
- Kitamura S., Matsuda F., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Yamazaki M., Saito K., Narumi I. (2010) Metabolic profiling and cytological analysis of proanthocyanidins in immature seeds of *Arabidopsis thaliana* flavonoid accumulation mutants. *Plant J* 62:549–559.
- Kitamura S., Oono Y., Narumi I. (2015) *Arabidopsis* pab1, a mutant with reduced anthocyanins in immature seeds from banyuls, harbors a mutation in the MATE transporter FFT. *Plant Mol Biol* :7-18.
- Kolattukudy, P.E. (2001). Polyesters in higher plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71: 1-49.

- Kosma D.K., Molina I., Ohlrogge J.B., Pollard M. (2012) Identification of an *Arabidopsis* fatty alcohol:caffeoyl-coenzyme A acyltransferase required for the synthesis of alkyl hydroxycinnamates in root waxes. *Plant Physiol* 160: 237–248.
- Kötting, O., Santelia, D., Edner, C., Eicke, S., Marthaler, T., Gentry, M. S., Comparot-Moss, S., Chen, J., Smith, A. M., Steup, M., Ritte, G., and Zeeman, S. C. (2009) STARCH-EXCESS4 is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21, 334–346.
- Kunst, L., Samuels, A.L., Jetter, R. (2005). The plant cuticle: Formation and structure of epidermal surfaces. In *Plant Lipids-Biology, Utilisation and Manipulation*, D. murphy, ed (Oxford, UK: Blackwell) 270-302.
- Macquet, A., Ralet, M.C., Kronenberger, J., Marion-Poll, A. and North, H.M. (2007) In situ, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. *Plant Cell Physiol.* 48, 984–999.
- Marinova, K., Kleinschmidt, K., Weissenbo C.K., G., and Klein, M. (2007). Flavonoid biosynthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiol* 144: 432–444.
- Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., Ryser, U. (1999). Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for and old hypothesis. *Plant Physiol* 119: 1137-1146.
- Molina, I., Li-Beisson, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2009). Identification of an *Arabidopsis* feruloyl-coenzyme A transferase required for suberin synthesis. *Plant Physiol.* 151: 1317–1328.
- Nawrath, C. (2002). The biopolymers cutin and suberin. In *The Arabidopsis Book*, Someville, C.R., Meyerowitz, E.M. (Rockville, MD: American Society of Plant Biologists), doi/10.1199/tab.0021, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
- Nawrath, C., Schreiber, L., Franke, R.B., Geldner, N., Reina-Pinto, J.J., and Kunst, L. (2013). Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* 11: e0167, doi/10.1199/tab.0167.

- North H., Baud S., Debeaujon I., Dubos C., Dubreucq B., Grappin P., et al. . (2010) Arabidopsis seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. *Plant J* 61: 971–981.
- Park D.H., Lim P.O., Kim J.S., Cho D.S., Hong S.H., and Nam H.G. (2003) The *Arabidopsis* COG1 gene encodes a DOF domain transcription factor and negatively regulates phytochrome signaling. *Plant J* 34, no. 2: 161-171.
- Penfield S., Meissner R.C., Shoue D.A., Carpita N.C., Bevan M.W. (2001) MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* 13, 2777–2791.
- Pinot F., Beisson F. (2011) Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS J*, 278:195-205.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L. and Debeaujon, I. (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell*, 17, 2966–2980.
- Rajjou, L., Debeaujon, I. (2008). Seed Longevity: Survival and Maintenance of High Germination Ability of Dry Seeds." *C R Biol* 331: 796-805.
- Rosso M.G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenised population (GABIKat) for flanking sequence tag based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53:247–259.
- Routaboul J.M., Dubos C., Beck G., Marquis C., Bidzinski P., Loudet O., Lepiniec L. (2012) Metabolite profiling and quantitative genetics of natural variation for flavonoids in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 63:3749–3764.
- Saito K., Yonekura-Sakakibara K., Nakabayashi R., Higashi Y., Yamazaki M., Tohge T., Fernie A.R. (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. *Plant Physiol Biochem* 72:21–34.
- Schneitz, K., Hülkamp, M., Pruitt, R.E. (1995). Wild-type ovule development in Arabidopsis thaliana: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J* 7: 731-749.
- Shirley B.W., Hanley S., Goodman H.M. (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two Arabidopsis *transparent testa* mutations. *Plant Cell* 4:333–347.

- Stark, R.E., and Tian, S. (2006). The cutin biopolymer matrix. In *Biology of the Plant Cuticle*, Vol. 23, M. Riederer, ed (Oxford, UK: Blackwell Publishing), pp. 126–144.
- Stevenson D.E. and Hurst R.D. (2007) Polyphenolic phytochemicals- just antioxidants or much more. *Cell Mol Life Sci* 64, no. 22: 2900-2916.
- Stracke R., Jahns O., Keck M., Tohge T., Niehaus K., Fernie A.R., Weisshaar B. (2010) Analysis of PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES-dependent flavonol glycoside accumulation in *Arabidopsis thaliana* plants reveals MYB11-, MYB12- and MYB111-independent flavonol glycoside accumulation. *New Phytol* 188:985–1000.
- Streb S., Eicke S., Zeeman S.C. (2012) The simultaneous abolition of three starch hydrolases blocks transient starch breakdown in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 287(50):41745–41756.
- Szydlowski N., Ragel P., Hennen-Bierwagen T.A., Planchot V., Myers A.M., *et al.* (2011) Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in *Arabidopsis* leaf starch. *J Exp Bot* 62: 4547–4559.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 54: 733–749.
- Tesnier, K., Strookman-Donkers, H.M., van Pijlen, J.G., van der Geest, A.H., Bino, R.J., Groot, S.P. (2002). A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Sci Technol* 30: 149-165.
- Usadel B., Kuschinsky A.M., Rosso M.G., Eckermann N., Pauly M. (2004) RHM2 is involved in mucilage pectin synthesis and is required for the development of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134: 286–295.
- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126, 485–493.
- Weisshaar B., Jenkins G.I. (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1:251–257.
- Western T.L., Burn J., Tan W.L., Skinner D.J., Martin-McCaffrey L., Moffatt B.A., Haughn G.W. (2001) Isolation and characterization of mutants defective in

- seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127: 998–1011.
- Western T.L., Skinner D.J., Haughn G.W. (2000) Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol* 122: 345–356.
 - Western T.L., Young D.S., Dean G.H., Tan W.L., Samuels A.L., Haughn G.W. (2004) MUCILAGE-MODIFIED4 encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by APETALA2, TRANSPARENT TESTA GLABRA1, and GLABRA2 in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol* 134: 296–306.
 - Xie D.Y., Sharma S.B., Paiva N.L., Ferreira D., Dixon R.A. (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. *Science* 299:396–399.
 - Xu W., Grain D., Le Gourrierec J., Harscoet E., Berger A., Jauvion V., Scagnelli A., Berger N., Bidzinski P., Kelemen Z., Salsac F., Baudry A., Routaboul J.M., Lepiniec L., Dubos C. (2013b) Regulation of flavonoid biosynthesis involves an unexpected complex transcriptional regulation of *TT8* expression, in *Arabidopsis*. *New Phytol* 198:59–70.
 - Yadav B., Molina I., Ranathunge K., Castillo I.Q., Rothstein S.J., Reed J.W. (2014) ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 26:3569–3588.
 - Zhao J., Dixon R.A. (2009) MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-*O*-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2323–2340.
 - Zhang X., Szydlowski N., Delvalle' D., D'Hulst C., James M.G., Myers A.M. 2008. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Bio* 8, 96.
 - Zhao J., Pang Y., Dixon R.A. (2010) The mysteries of proanthocyanidin transport and polymerization. *Plant Physiol* 153:437–443.