

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL
MEDI NATURAL



Estudio del papel de los flavonoides en la longevidad de la semilla de *Arabidopsis* *thaliana*

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Raquel Bertí Martínez

TUTORA: Regina Niñoles Rodenes

COTUTOR: José Gadea Vacas

Curso 2017-2018

València, marzo 2018

Datos del trabajo final de grado

Título: Estudio del papel de los flavonoides en la longevidad de la semilla de *Arabidopsis thaliana*.

Autora: Dña. Raquel Bertí Martínez

Tutora: Dña. Regina Niñoles Rodenes

Cotutor: D. José Gadea Vacas

València, marzo 2018

Resumen

La pérdida de viabilidad en el almacenamiento de las semillas es un inconveniente para la conservación de la biodiversidad en los bancos de germoplasma, así como para el almacenamiento de semillas de uso agronómico. El estudio de los procesos implicados en la longevidad de las semillas podría aportar soluciones a este problema. En concreto, la composición de la cubierta de la semilla es de gran importancia, puesto que supone una barrera natural de protección a agentes externos dañinos y contiene moléculas antioxidantes que reparan el daño oxidativo causado durante el almacenamiento.

En este proyecto se ha iniciado el estudio del papel que juegan los flavonoides de la cubierta de la semilla en la viabilidad de la misma. Para ello, se ha trabajado con una colección de semillas mutantes de *Arabidopsis thaliana* con distinta composición de flavonoides. Mediante tratamientos de envejecimiento acelerado se ha investigado si la composición de determinados tipos de flavonoides es clave para el aumento de la longevidad de las semillas. Además, se ha evaluado la capacidad de estos mutantes para germinar en ambientes oxidantes. De algunos de ellos se ha aproximado el daño oxidativo producido tras los tratamientos de envejecimiento acelerado y de otros mutantes se ha medido la permeabilidad de la cubierta a sales de tetrazolio y se ha observado su capa de suberina puesto un mayor grosor de esta capa implica mayor impermeabilidad.

Los experimentos sugieren que la composición en flavonoides tiene un papel en la longevidad de las semillas, aunque no son esenciales, y que un aumento de los mismos no supone un incremento de la longevidad en la semilla.

Palabras clave

Longevidad, semilla, flavonoides, envejecimiento acelerado, daño oxidativo, Proantocianidinas (PAs)

Title: Study of the role of flavonoids in the longevity of *Arabidopsis thaliana* seed

Abstract

The loss of viability in the storage of seeds has been a disadvantage for the conservation of biodiversity in germplasm banks, as well as for the storage of seeds for agronomic use. The study of the processes involved in seed longevity could provide solutions to this problem. In particular, the composition of the seed coat is important, since it supposes a natural barrier of protection against harmful external agents and because it contains antioxidant molecules that repair the oxidative damage caused during storage.

In this project, the study of the role played by seed coat flavonoids in the viability of the seed has been initiated. For this, we have worked with a mutant seed collection of *Arabidopsis thaliana* with different flavonoid composition. Through accelerated aging treatments, it has been investigated whether the presence of certain types of flavonoids increases seed longevity. In addition, the ability of these mutants to germinate in oxidant environments has been evaluated. The oxidative damage produced after accelerated aging treatments has been approximated in some of these mutants. Moreover, the permeability of tetrazolium salts intake has been measured and the layer of suberin has been observed as a greater thickness of this layer implies greater impermeability.

The experiments suggested that flavonoids composition has a role in seed longevity, although they are not essential and their increase does not mean an increment in seed longevity.

Key words

Longevity, seeds, flavonoids, accelerating aging, oxidative damage, Proanthocyanidins (PAs)

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Longevidad de semillas: concepto e importancia	1
1.2.	Mecanismos involucrados en la longevidad de la semilla	2
1.3.	Estructura y composición de la cubierta de la semilla	4
1.4.	Antioxidantes presentes en la cubierta de la semilla: Flavonoides	5
2.	OBJETIVOS	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1.	Material vegetal	9
3.2.	Manipulación y crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
3.2.1.	Esterilización de semillas.....	9
3.2.2.	Cultivo de semillas.....	9
3.3.	Caracterización fenotípica de los mutantes en la biosíntesis de flavonoides.....	10
3.4.	Medida del daño oxidativo en semilla	11
3.5.	Medida de la permeabilidad de la cubierta de la semilla	12
3.5.1.	Tinción de la capa de suberina	12
3.5.2.	Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1.	Selección de los mutantes a emplear.....	13
4.2.	Fenotipo de las semillas mutantes tras tratamientos de envejecimiento acelerado	14
4.2.1.	Tratamiento de envejecimiento acelerado con semillas embebidas en agua a 37,5°C de temperatura durante 2 días	15
4.2.2.	Tratamiento de envejecimiento acelerado con semillas en seco a 75% de humedad relativa y 37°C de temperatura.....	16
4.3.	Fenotipo en presencia de estrés oxidativo	19
4.3.1.	Fenotipo en presencia de paraquat (PQ)	19
4.3.2.	Fenotipo en presencia de agua oxigenada.....	20
4.4.	Medida del daño oxidativo (MDA) en semilla	21
4.4.1.	Puesta a punto del método.....	21
4.4.2.	Prueba de concepto	23
4.5.	Estudio de la permeabilidad de la cubierta de la semilla.....	24
4.5.1.	Tinción de la capa de suberina	24
4.5.2.	Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio	25
5.	CONCLUSIONES	28
6.	BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Esquema de la descendente viabilidad de la semilla durante el tiempo de almacenamiento.....	2
Figura 2. Representación esquemática de la semilla de Arabidopsis y sus diferentes capas.....	4
Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de los flavonoides en semillas de Arabidopsis thaliana..	6
Figura 4. Composición en flavonoides de la semilla silvestre o wild type de Arabidopsis thaliana con fondo Wassilewskija (Ws).	6
Figura 5. Porcentaje de cotiledones verdes de semillas germinadas en placa de medio MS a 10 días post siembra.....	16
Figura 6. Puesta a punto del tratamiento de envejecimiento acelerado a 75% de humedad relativa y 37°C.....	17
Figura 7. % de cotiledones verdes tras 7 días de la siembra	18
Figura 8. Placa Petri sembrada para el análisis del porcentaje de germinación a los 7 días postsiembra.....	18
Figura 9. Porcentaje de cotiledones a los 5 y 7 días postsiembra en un medio con una concentración de paraquat del 0,6 µM.....	19
Figura 10. Porcentaje de cotiledones verdes a los 5 y 7 días postsiembra en un medio con una concentración de agua oxigenada 8mM.....	20
Figura 11. Espectros de absorbancia de muestras del control WS. Las barras en vertical amarillas señalan los picos de absorbancia a 440nm y a 532nm.	22
Figura 12. A) Porcentaje de cotiledones verdes sin envejecer y envejeciendo 17 días a 75% de humedad. B) Equivalentes de MDA sin envejecimiento y tras 17 días a 75% de humedad relativa y 37°C.....	22
Figura 13. Ensayo MDA.	23
Figura 14. Imagen obtenida con el microscopio Eclipse tras la tinción de las semillas (Ws <i>tt10-2</i>).	24
Figura 15. Imagen obtenida con el microscopio Eclipse tras la tinción de las semillas (Ws <i>tt7-4</i>)....	25
Figura 16. Etapas del proceso de medición del tetrazolio.	26
Figura 17. Gráfica de la absorbancia a 485 nm de los distintos genotipos tras 48h y 96h de incubación con una solución de tetrazolio al 1%.	26
Tabla 1. Contenido de los diferentes flavonoides en cada mutante de la ruta biosintética..	14

ABREVIATURAS

aa: *accelerated aging* (envejecimiento acelerado)

ABA: Ácido Abscísico

Abs: Absorbancia

ANR: Antocianidina reductasa

CDT: *Controlled deterioration treatment* (envejecimiento acelerado)

CHI: Chalcona isomerasa

CHS: Chalcona sintasa

DFR: Dihidroflavonol 4-reductasa

F3'H: Flavonoide 3'-hidroxilasa

FLS/ *fls*: Flavonol sintasa (ENZIMA)/(*gen que codifica a esa enzima, mutante con ese gen truncado*)

HSP: *Heat Shock Protein*

ii: Integumento interno

LEA: *Late Embryogenesis Abundant protein*

LDOX: *Leucoanthocyanidin dioxygenase*

Ler: *Landsberg erecta*

MDA: Malondialdehído

mM: milimolar

mg: miligramo

µg: microgramo

ms: milisegundos

nm: nanómetros

oi: Integumento externo

PA(s): Proantocianidina(s)

PEG: Polietilenglicol

PPO: Polifenol oxidasa

PQ: Paraquat

(p/v): Peso / volumen

Redox: Reducción-oxidación

ROS: Especies reactivas de oxígeno

TBA: Ácido tiobarbitúrico

tt: *transparent testa*

(v/v): volumen/volumen

Ws: *Wassilewskija*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Longevidad de semillas: concepto e importancia

La semilla es el principal vector de propagación que tiene la planta. Este órgano determina la persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas y, por tanto, se ha especializado en perdurar en condiciones óptimas durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, durante su almacenamiento, las semillas van perdiendo progresivamente viabilidad, se vuelven más sensibles a estreses durante su germinación hasta que son incapaces de germinar. Habitualmente este proceso recibe el nombre de envejecimiento natural (*natural aging*) y, en general, es necesario el transcurso de varios meses o incluso años. Este descenso en la viabilidad de la semilla queda representado gráficamente en la Figura 1 y es debido a una serie de factores externos a la semilla de tipo biótico (patógenos y depredadores) o abiótico (humedad, temperatura, oxígeno, luz ultravioleta, etc.) (Cuadrado con bordes redondos en la Figura 1). Uno de los efectos que causan estos factores responsables del envejecimiento es la producción de moléculas perjudiciales en el interior celular conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS oxidan el ADN, los lípidos y las proteínas causando lo que se denomina estrés oxidativo. Estas moléculas pueden ser de distintos tipos como aniones superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) y oxígeno singlete (1O_2). Otros. En concreto, los investigadores Donohue *et al.*, (2005), determinaron que para conservar la viabilidad durante largos periodos las condiciones ideales de almacenamiento son una baja humedad relativa y una baja temperatura. En los bancos de semillas, llamados bancos de germoplasma, se mantienen estas condiciones para conservar la biodiversidad de las especies de plantas silvestres existentes así como disponer de una fuente de recursos agrícolas permanente (Long *et al.*, 2014).

La longevidad de la semilla podría definirse como el tiempo total durante el cual la semilla permanece viable. Este tiempo varía entre especies y poblaciones y depende de las características genéticas de la semilla y de cómo le afectan los entornos bióticos y abióticos en los que se encuentra (Long *et al.*, 2014). En un extremo estarían las semillas de *Phoenix dactylifera* que son capaces de germinar tras el paso de más de dos mil años (Sallon *et al.*, 2008).

En un contexto de cambio climático, es importante preservar especies que podrían desaparecer debido a las condiciones adversas, por su interés agronómico y, por ejemplo, con el fin de poder realizar cruces entre una especie longeva y especies con otras características. Así mismo, después de algún desastre natural, interesa disponer de semillas de las plantas de la zona afectada para reforestarla. Por ello, incrementar el tiempo durante el cual la semilla es capaz de mantenerse viable es fundamental. Esto supone una ventaja para los agricultores y para las empresas distribuidoras de semillas que llevan a cabo dichas tareas de conservación de especies vegetales. Así habrá disponibles durante más tiempo el mismo lote de semillas y el coste de producción se reducirá abaratándose así la venta de estas semillas. Además, para reponer las semillas de los bancos de germoplasma, es importante conocer la duración de esta viabilidad en cada especie. Si no se tiene una estimación correcta de ese periodo de viabilidad, se puede definir un tiempo demasiado largo de almacenamiento y perder la especie o se puede estimar un tiempo demasiado corto y malgastar semillas. De esta manera, este conocimiento supone una ventaja económica además de medioambiental (Long *et al.*, 2011b).

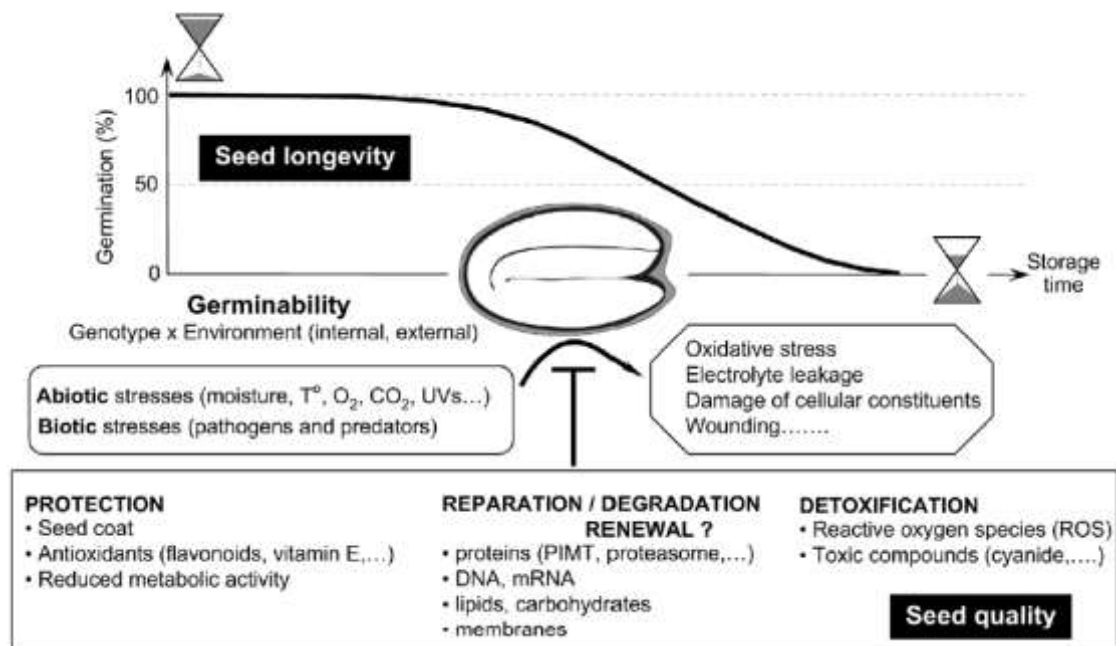


Figura 1. Esquema de la descendente viabilidad de la semilla durante el tiempo de almacenamiento y las posibles causas (encuadradas con bordes redondos) y consecuencias (dentro de una forma octogonal) así como los mecanismos que dispone para afrontar ese descenso en la capacidad de germinación (encuadrados en la parte inferior de la figura). Extraído de Rajjou et al., (2008).

Debido a la importancia de alargar la viabilidad de la semilla, existe un interés en investigar cuáles son los procesos que se dan para tratar de suprimirlos o ralentizarlos. Generalmente el envejecimiento dura meses e incluso años por eso en el laboratorio existen tratamientos conocidos como *controlled deterioration treatment (CDT)* o también *accelerated aging (aa)* que consisten en someter a las semillas a unas condiciones de alta temperatura y alta humedad relativa para que envejezcan en tan solo unos pocos días. Así se pueden evaluar con mayor facilidad y comodidad los mecanismos complejos del envejecimiento de las semillas y los componentes que intervienen en éste (Tesnier et al., 2002).

1.2. Mecanismos involucrados en la longevidad de la semilla

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, la semilla es el órgano de la planta que determina su persistencia y dispersión, por ello posee mecanismos para conservar su capacidad de germinación tras periodos largos de almacenamiento. Dichos procesos hacen que la semilla sea un buen modelo para estudiar qué moléculas están implicadas en un aumento en la longevidad de la misma.

Uno de los mecanismos consiste en reducir su actividad metabólica reemplazando el agua del citoplasma por azúcares y confiriéndole, así, un estado vídrioso (Walters et al., 2005). Así se limita la movilidad de las moléculas además de proporcionar energía en la germinación posterior. Estos azúcares también estabilizan proteínas y mantienen los lípidos de las membranas en correcto funcionamiento (Crowe et al., 1987).

Otra estrategia la llevan a cabo las proteínas llamadas *late embryogenesis abundant (LEA)*. La acumulación de estas proteínas proporciona tolerancia a la desecación inhibiendo una serie de reacciones perjudiciales (Wu et al., 2011).

Eliminar las ROS generadas durante el envejecimiento sería otro mecanismo frente al envejecimiento. Para ello, se distinguen dos mecanismos: enzimáticos y no-enzimáticos. Por un lado, en los mecanismos enzimáticos, las enzimas que eliminan las ROS son las que participan en el llamado sistema detoxificador. Algunos ejemplos son las superóxido dismutasas (SOD), las catalasas (CAT), ascorbato peroxidasas (APX), glutatión reductasas, etc. Una de las funciones de estas enzimas es mantener el ambiente intracelular de reducción-oxidación adecuado. Si estas enzimas son dañadas, la viabilidad de la semilla se vería reducida (Goel *et al.*, 2003). Por otro lado, en los mecanismos no enzimáticos o pasivos participan moléculas no-enzimáticas como los tocoferoles, el glutatión y los flavonoides. Los tocoferoles como la vitamina E previenen la peroxidación de los lípidos y, por tanto, aumentan la longevidad de la semilla (Sattler *et al.*, 2004). Al igual que las enzimas antioxidantes, el glutatión se encarga de mantener un equilibrio de reducción-oxidación en la semilla adecuado para su conservación. Por último, los flavonoides, antioxidantes presentes en la cubierta de la semilla, se tratarán con mayor profundidad en el siguiente apartado.

Además, la tolerancia a la desecación y el mantenimiento de un estado quiescente, están relacionados con la presencia de otra clase de proteínas llamadas chaperonas conocidas también como proteínas HSP (*Heat Shock Protein*). Un experimento con sobreexpresión de HSP101 en semillas resultó en un aumento de su longevidad (Prieto-Dapena *et al.*, 2006). Estas enzimas protegen las proteínas contra el daño oxidativo además de asistir a la estabilidad y al plegamiento correcto de las proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, los ácidos nucleicos (ADN, ARN) pueden ser dañados y su reparación constituiría otra manera de conservar la viabilidad de la semilla durante el almacenamiento. Las bases nitrogenadas pueden sufrir modificaciones durante el envejecimiento de la semilla, debido a la presencia de ROS, lo que puede generar apareamientos incorrectos. Existe un conjunto de enzimas reparadoras que se encargan de eliminar la base modificada (ADN glicosilasas), sintetizar la base correcta (ADN polimerasa) y juntar la nueva base a las bases adyacentes (ADN ligasa) (Balestrazzi, 2011). La modificación mayoritaria es la hidroxilación de un carbono de la base nitrogenada guanidina. De esta manera la guanidina en vez de aparearse solo con la citosina puede aparearse también con la adenina dando lugar a apareamientos erróneos (Biedermann, 2011).

Una vía de reparación alternativa es aquella que llevan a cabo las fitohormonas como el ácido abscísico y las giberelinas. El ácido abscísico (ABA) tiene un papel importante en la longevidad como se demostró con la reducción de la viabilidad de la semilla al suprimir el gen *aba1-5* (Clerkx *et al.*, 2004). Esta fitohormona regula la actividad de proteínas, por ejemplo inactiva fosfatasa o ayuda a las proteínas llamadas acuoporinas a expulsar el agua oxigenada (H_2O_2) tóxica que se acumula en el interior celular. Así mismo, las plantas tratadas con la hormona giberelina produjeron semillas más resistentes a tratamientos de envejecimiento acelerado (CDT) que las que no se habían tratado (Bueso *et al.*, 2014a).

Por último, de todas las estructuras de la semilla, la cubierta juega un papel muy importante en la longevidad de la misma ya que supone una barrera natural que proporciona sobre todo protección e impermeabilidad a agentes externos dañinos (Finkelstein *et al.*, 2008). Por esta razón se considera una parte determinante en la viabilidad de la semilla a largo plazo. De hecho se ha demostrado que el grosor de su capa de suberina (ver apartado siguiente, 1.3.) influye de forma directa sobre la tolerancia de la semilla de *Arabidopsis* a los tratamientos de envejecimiento acelerado (Bueso *et al.*, 2014b).

1.3. Estructura y composición de la cubierta de la semilla

En angiospermas, como lo es nuestra planta de estudio *Arabidopsis thaliana*, la fertilización o fecundación del óvulo tiene como resultado la formación de la semilla. Se distinguen tres partes en la semilla: el embrión, el endospermo y la cubierta de la semilla (Figura 2A e, pe y t). El embrión es la parte de la semilla que dará lugar a la futura planta y el endospermo es aquella que contiene las sustancias necesarias para nutrir al embrión. Como se ha introducido en el apartado anterior, la cubierta es muy importante ya que es una barrera natural que confiere protección a la semilla.

En *Arabidopsis*, la cubierta (*testa*) de la semilla tiene diversas capas, dos en el integumento exterior y tres en el integumento interior. En el integumento interior (ii), la capa más interna llamada endotelio (Figura 2B, capa ii1) está compuesta por células que acumulan en sus vacuolas proantocianidinas (PA) también llamadas taninos condensados y que, cuando se oxidan, proporcionan un color pardo a las semillas (Debeaujon *et al.*, 2003). Las siguientes capas del integumento interno (Figura 2B, capas ii1' ii2) no se diferencian mucho entre sí y se fusionan cuando la semilla se desarrolla. Las células de las capas del integumento exterior (oi) llamadas palizada y epidermis (Figura 2B, capas oi) acumulan almidón en los amiloplastos durante la fase de crecimiento. Asimismo, por un lado, las células de la epidermis (Figura 2B, capa oi2) sintetizan y secretan al apoplasto o espacio intercelular grandes cantidades de un polisacárido pectinoso llamado mucílago. El mucílago está relacionado con la imbibición y desecación de la semilla, también es considerado una barrera adicional de protección de estas capas celulares y se relaciona con otras muchas funciones por lo que se dice que es una molécula multifuncional (Sano *et al.*, 2015). Por otro lado, las células de la palizada (Figura 2B, capa oi1) forman la llamada capa de suberina, un tipo de lípido poliéster insoluble formado a partir de la ruta de los ácidos grasos en plantas (Molina *et al.*, 2008). Esta capa actúa como principal barrera impermeable contra el agua, flujo de gases, patógenos y la entrada de nutrientes (Pollard *et al.*, 2008).

En las últimas etapas del desarrollo de la semilla, las células de la cubierta mueren y se aplastan entre ellas. La estructura de la semilla se conserva gracias al mucílago. Finalmente, las PA son liberadas de la capa del endotelio e impregnan el resto de células (Haughn *and* Chaudhury, 2005).

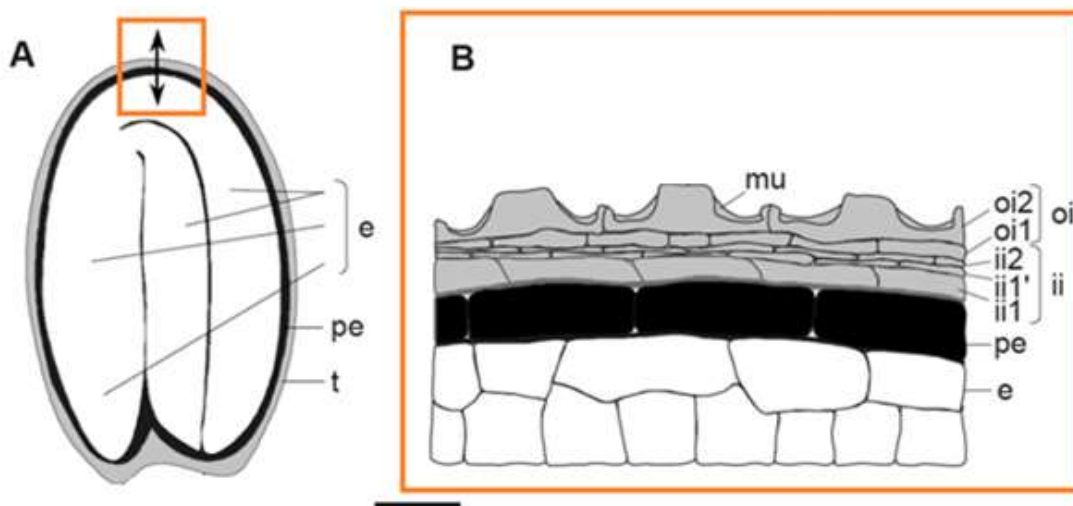


Figura 2. Representación esquemática de la semilla de *Arabidopsis* y sus diferentes capas. A) Visión global de la semilla entera. B) Sección transversal en detalle de las capas de la cubierta de la semilla. e=embrión, pe=endospermo de la periferia, t=cubierta (*testa*), ii=integumento interno, ii1=endotelio (PAs), oi=integumento exterior, oi1=capa de suberina, oi2=epidermis, mu=mucílago. Barra de 100 μ m. Modificado de Rajjou and Debeaujoun, (2008).

1.4. Antioxidantes presentes en la cubierta de la semilla: Flavonoides

Como se ha dicho anteriormente, la acción de los antioxidantes es imprescindible para eliminar o prevenir la formación de las ROS que puedan dañar el embrión, afectando la germinación de la semilla y reduciendo, por tanto, su longevidad. En este trabajo se han estudiado concretamente los flavonoides, moléculas con capacidad antioxidante presentes en la cubierta de la semilla.

En el reino de las plantas, los flavonoides forman un grupo representativo de productos de su metabolismo secundario (Saito *et al.*, 2013). En cada especie vegetal existen diferentes tipos de flavonoides, pero en este trabajo se va a tratar solo los flavonoides presentes en las semillas de *Arabidopsis thaliana* L. por ser una planta modelo para análisis genéticos y moleculares. Entre las subclases mayoritarias de flavonoides en la semilla de *Arabidopsis* se pueden encontrar los flavonoles y las proantocianidinas (PAs) (encuadrados en negro en la Figura 3). Los flavonoles (pigmentos amarillos) se localizan en la cubierta de la semilla y en el embrión (Figura 2A, t y e) (Routaboul *et al.*, 2005). Las PAs son polímeros incoloros de la unidad flavan-3-ol que, como se ha dicho en el apartado 1.3, se acumulan exclusivamente en el integumento interno, concretamente en las células del endotelio. Los polímeros de PAs pueden sufrir modificaciones secundarias para oxidarse adquiriendo una coloración parda responsable del color de la cubierta de la semilla (Marles *et al.*, 2003). La biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis* se ha caracterizado principalmente usando mutantes llamados *transparent testa* (*tt*) que tienen afectada la pigmentación de la cubierta y es posible diferenciarlos del genotipo silvestre o *wild type* a simple vista (Abrahams *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis*, los flavonoides se sintetizan mediante un complejo multienzimático localizado en el retículo endoplasmático (Kitamura, 2006) como se observa en la Figura 3. Todos los flavonoides en su biosíntesis tienen como precursores al coumaril-CoA y el malonil-CoA; dichos compuestos se condensan en intermediarios de chalconas por la acción de las enzimas chalconas sintetas (CHS) hasta llegar al compuesto dihidrokaempferol. Este es un punto de inflexión en la ruta ya que, si actúa la enzima flavonolsintasa (FLS), se formará el precursor kaempferol (Figura 3 encuadrado en verde) que sufrirá modificaciones para dar lugar a los flavonoles derivados de kaempferol; mientras que, si actúa la enzima flavonoide-3'-hidroxilasa (F3'H), se formará el intermediario dihidroquercetina. Este intermediario supone otro punto de inflexión; Por un lado, si actúa la enzima FLS se formará el precursor quercetina que sufrirá modificaciones para dar lugar a los flavonoles derivados de quercetina. En el genotipo silvestre o *wild type*, los flavonoles derivados de quercetina son mucho más abundantes que los derivados de kaempferol (Lepiniec *et al.*, 2006). A partir de modificaciones del precursor quercetina se puede sintetizar el precursor isoramnetina aunque este tipo de flavonoles son mucho menos abundantes como se observa en la Figura 4 (colores de la leyenda: amarillo, naranja y rojo vivo). Por otro lado, si sobre la molécula dihidroquercetina actúan consecutivamente otras enzimas como la DFR, la LDOX y la ANR, se formará la epicatequina (Figura 3 encuadrado en verde), monómero común de las proantocianidinas (PAs). Cuando debido a una mutación, la ruta anteriormente descrita no es posible, la enzima ANR puede formar un precursor alternativo llamado epiafzelequina (Figura 4 encuadrado en morado). Las PA construidas con este monómero alternativo tendrán una composición diferente respecto a las construidas con el monómero habitual, la epicatequina.

La Figura 4 muestra la composición en flavonoides propia de la semilla silvestre de *Arabidopsis thaliana* con fondo genético Wassilewskija (Ws). Puede observarse que la cantidad de flavonoles total es similar a la cantidad total de proantocianidinas (PAs). Por otra parte, los flavonoles derivados de quercetina son mucho más abundantes que los derivados de kaempferol o isoramnetina

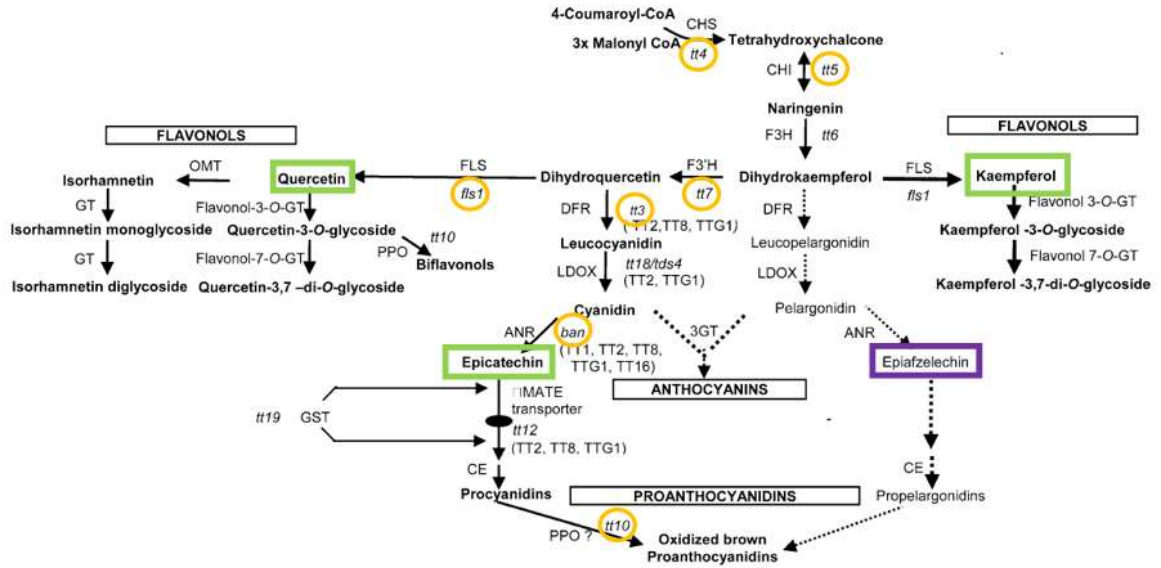


Figura 3. Esquema de la ruta biosintética de los flavonoides en semillas de *Arabidopsis thaliana*. Los diferentes intermediarios en la ruta están conectados mediante flechas, los encuadrados en verde son los monómeros que forman los dos tipos de flavonoles y las proantocianidinas más comunes y en morado unos monómeros alternativos de PA poco comunes. La ruta de biosíntesis de las antocianinas y de las propelargonidinas está representada por una línea discontinua debido a que no están presentes en la semilla silvestre o wild type de *Arabidopsis*. Los mutantes de cada paso enzimático están indicados en minúscula y en cursiva y cercados en color amarillo. Las proteínas regulatorias están indicadas en mayúscula al lado de sus genes diana que están entre paréntesis. *fls*: flavonol synthase, *tt*: transparent testa. Modificado de Routaboul et al., (2006).

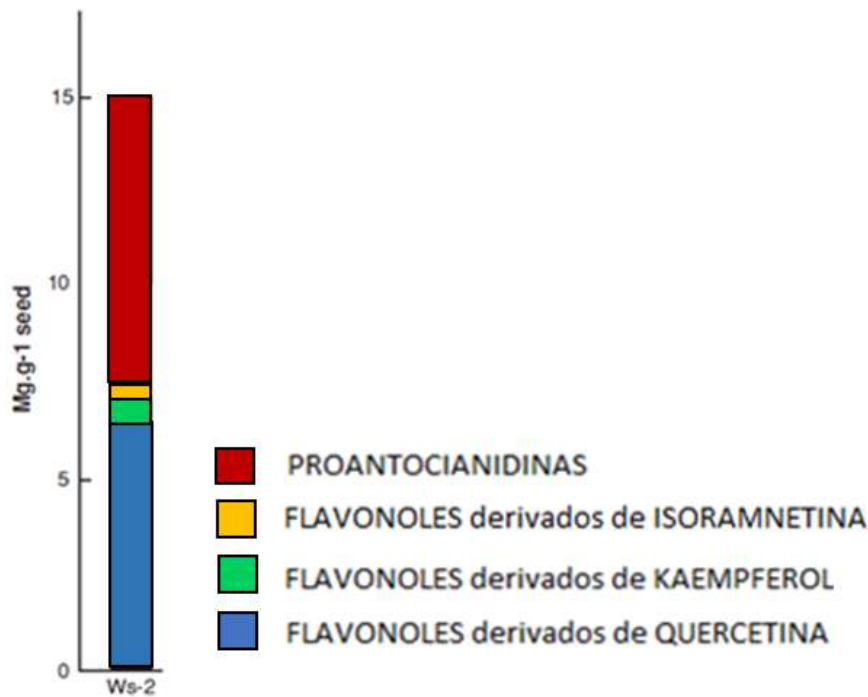


Figura 4. Composición en flavonoides de la semilla silvestre o wild type de *Arabidopsis thaliana* con fondo Wassilewskija (Ws). Modificado de Lepiniec et al., (2006).

Hay evidencias que afirman que los flavonoides están relacionados con la longevidad. Como se ha descrito anteriormente, la cubierta de la semilla juega un papel importante en la longevidad ya que protege durante el almacenamiento contra estreses bióticos y abióticos (patógenos, radiaciones ultravioletas, humedad, elevadas temperaturas, entrada de oxígeno o ROS, etc.). Por esta razón, resulta interesante estudiar la relación de los flavonoides presentes en la cubierta de la semilla con la longevidad. En este caso, se sabe que los mutantes como los *tt* tienen una germinación reducida respecto a su *wild type* tras un tratamiento de envejecimiento acelerado o un periodo prolongado de almacenamiento conocido como envejecimiento natural o *natural aging* (Debeaujon *et al.*, (2000). Como cada mutante *tt* tiene una composición diferente en flavonoides, se pretende realizar experimentos con estos mutantes y poder asociar su composición a su capacidad de respuesta al tratamiento del experimento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Investigar la posible implicación de los flavonoides en la longevidad de la semilla de *Arabidopsis thaliana* y si existe relación con su capacidad antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar si la cantidad o composición específica de determinados tipos de flavonoides es clave para la longevidad de la semilla.

2.2.2. Evaluar si la variación en la cantidad o composición de flavonoides en semilla afecta a su comportamiento en ambientes oxidantes.

2.2.3. Analizar la permeabilidad de la semilla en mutantes en la ruta de biosíntesis de flavonoides y su relación con la longevidad de sus semillas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Las semillas empleadas pertenecen a la planta *Arabidopsis thaliana* L. de los ecotipos Wassilewskija (Ws) y Landsberg *erecta* (Ler). Los mutantes se obtienen mediante la inserción de un T-DNA para truncar la secuencia de un gen que codifica una enzima específica de la ruta de biosíntesis de las proantocianidinas (Figura 3). El material fue donado previamente por la investigadora Isabelle Debeaujon del *Laboratoire de Biologie des Semences*, UMR 204 INRA-INAPG, Versailles Cedex, Francia. Por un lado, con el fondo genético o ecotipo Ws los mutantes empleados son *tt3-4*, *tt4-8*, *tt7-4*, *tt10-2*, *ban1* y *fls1-3*. Por otro lado, con el ecotipo Ler el mutante aportado es *tt5-1*. Cada mutante tiene una composición diferente de los distintos tipos de flavonoides que se recoge en la Tabla 1.

3.2. Manipulación y crecimiento de *Arabidopsis thaliana*

3.2.1. Esterilización de semillas

Se abordan dos estrategias de esterilización, en seco y en húmedo.

Las semillas depositadas en un microtubo abierto se introducen dentro de un desecador sellado con *parafilm* que contiene un vaso de precipitados con una solución de 100 mL de hipoclorito sódico (menos de 5% (v/v)) a la que se le añade lentamente 3 mL de ácido clorhídrico al 37% (v/v) creándose el gas cloro que esteriliza las semillas. El desecador debe estar en una campana de extracción de gases para evitar la intoxicación por dicho gas cloro. Todo material que está en contacto con el cloro se desecha en el contenedor de residuos halogenados correspondiente. Transcurridas 4 horas, se trasladan los tubos con recipientes estériles a una cabina de flujo laminar donde se airean durante 30 minutos. A continuación, se añade a los tubos 500 μ L de agua *MilliQ* estéril y se depositan a 4°C durante 2 días con el fin de estratificar las semillas y favorecer su germinación.

La esterilización en húmedo se realiza añadiendo aproximadamente 700 μ L de una solución de etanol al 70% (v/v) y triton X-100 al 0,1% (v/v) durante 25 minutos en agitación. El triton es un detergente que facilita el recubrimiento de la semilla para mejorar su esterilización. Transcurridos los minutos se realizan tres lavados con agua *MilliQ* estéril en cabina de flujo laminar y se depositan las semillas embebidas en agua a 4°C para su estratificación.

3.2.2. Cultivo de semillas

Cultivo en medio sólido

Para cultivar y germinar *in vitro* las semillas de *Arabidopsis* se emplean placas Petri de 9 cm de diámetro con una solución de medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) que contiene las sales MS (Duchefa Biochemie) al 0,4% (p/v); 10 mM de tampón MES (ácido 2-N-morfolino etanosulfónico) pH=6; sacarosa al 1% (p/v); *phytoagar* (Duchefa Biochemie) al 0,9% (p/v) y ajustando el pH a 5,7 con KOH 5M o HCl al 37%.

El medio se autoclava a 121°C durante 20 minutos a una presión de 1,2 bares y se espera a que tenga una temperatura de 40-50°C para verter 25mL por placa en cabina de flujo laminar. Se espera a que se solidifique el medio y se siembra una a una con micropipeta alrededor de 25

semillas por genotipo. Después de la siembra se sellan las placas con cinta porosa (*Micropore*) y se incuban en una cámara a 24°C y un fotoperiodo controlado de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una intensidad de luz de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Cultivo en invernadero

Para la obtención de semillas de los diferentes mutantes, plántulas de aproximadamente 7 días crecidas en medio MS, se pasan a unas macetas con un sustrato compuesto de turba:virgiculita al 2:1 y se cultivan en una cabina de invernadero a 23°C con una humedad relativa de 70% y una intensidad lumínica de $130 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las macetas se colocan en bandejas rectangulares y se irrigan 2 veces por semana con una solución nutritiva preparada por el personal del invernadero del IBMCP. La solución nutritiva está compuesta por 4 mM KNO_3 , 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1,5 mM MgSO_4 , 0,75 mM KH_2PO_4 , 0,035% (p/v) EDTA- FeSO_4 , 70 μM H_3BO_3 , 14 μM MnCl_2 , 0,5 μM CuSO_4 , 1 μM ZnSO_4 , 0,2 μM Na_2MoO_4 , 10 μM NaCl , 0,01 μM CoCl_2 . El pH de la solución es 6,5.

Las plantas son periódicamente entutoradas, para evitar contaminar con las semillas a bandejas o plantas adyacentes. Al cabo de 2 o 3 meses se recogen las semillas para proceder con los experimentos.

3.3. Caracterización fenotípica de los mutantes en la biosíntesis de flavonoides

3.3.1. Envejecimiento de semillas embebidas

Semillas esterilizadas y estratificadas se envejecen embebidas en agua dentro de un microtubo durante 48h en un baño de agua a 37,5°C. Posteriormente se siembra en medio MS y se observa el establecimiento de la plántula. Concretamente se cuentan aquellas semillas que presentan los dos cotiledones verdes abiertos a los 5, 7 y 9 días post-siembra, sobre el total de semillas sembradas.

3.3.2. Envejecimiento en presencia de alta humedad relativa

Para medir el contenido de MDA y simular un envejecimiento más parecido al real, las semillas son envejecidas en presencia de alta humedad relativa. Para ello se emplea un desecador con una solución de agua saturada con sales de cloruro de sodio creando una atmósfera de 75% de humedad relativa. En este caso las semillas no están embebidas y el microtubo se coloca abierto en el interior del desecador y se mantiene durante 7-20 días. Finalizado el tratamiento, las semillas se esterilizan, estratifican y se siembran en medio MS para cuantificar la aparición de cotiledones verdes.

3.3.3. Ensayo de aparición de cotiledones verdes en condiciones oxidantes

En este caso las semillas esterilizadas y estratificadas se siembran de una en una en cabina de flujo laminar en medio MS con un agente oxidante, como paraquat (con una concentración de 0,6 μM) o agua oxigenada (con una concentración de 8 mM). Se cuentan aquellas que presentan los dos cotiledones verdes abiertos a los 5 días para y a los 7 días para paraquat.

3.4. Medida del daño oxidativo en semilla

Una de las maneras de medir el daño oxidativo dentro de la semilla es observar el estado de las macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos o lípidos.

En este caso se mide el nivel de peroxidación de los lípidos. Estos lípidos peroxidados tienen como producto final el malondialdehído (MDA) que forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico (TBA) que absorbe a una longitud de onda de 532 nanómetros (nm) y se puede cuantificar en un espectrofotómetro.

Para este experimento se pesan 5 réplicas biológicas de 25 mg de semillas de cada genotipo y se muelen con mortero y mazo con ayuda de nitrógeno líquido. A todas ellas se les añade 1 mL del tampón TRIS pH8 con 175mM NaCl (Devaiah *et al.*, 2007). A continuación, se añade 1 mL de una solución al 0,5% de TBA y 20% de ácido tricloracético (TCA) a las réplicas con TBA (3 réplicas) y 1 mL de una solución al 20% de TCA a las réplicas sin TBA (2 réplicas). Las réplicas sin TBA sirven para detectar todo aquello que absorbe a 532 nm y no es el complejo MDA-TBA. Acto seguido se incuban los microtubos 30 minutos a 95°C para favorecer la formación del complejo MDA-TBA. Luego se enfrían los microtubos sumergiéndolos en hielo para parar la reacción y se centrifugan a 4°C durante 30 minutos a 12.000 rpm.

Finalmente se recoge el sobrenadante y se mide la absorbancia a 532 y 600 nm. La absorbancia a 600 nm sirve como medida de la turbidez del fondo de cada extracto, por lo que se resta a todas las medidas para calcular los equivalentes de MDA. A partir de la absorbancia es posible saber la concentración de una sustancia gracias a la ecuación de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon \cdot l \cdot C$). Por tanto, se calcularon los equivalentes de MDA utilizando las siguientes ecuaciones:

$$[(Abs_{532}TBA^+) - (Abs_{600}TBA^+) - (Abs_{532}TBA^- - Abs_{600}TBA^-)] = Valor A$$

$$Abs = \epsilon \cdot l \cdot C \text{ ó Equivalentes de MDA}$$

$$Equivalentes de MDA = \left(\frac{Valor A}{\epsilon} \right) \cdot 10^6$$

Donde:

Abs: Absorbancia

C: concentración

ϵ : coeficiente molar del MDA con valor 155000

l: camino óptico de la cubeta de 1 cm

3.5. Medida de la permeabilidad de la cubierta de la semilla

3.5.1. Tinción de la capa de suberina

Una manera de analizar la permeabilidad de la cubierta de la semilla es mediante la tinción de la capa de suberina con el reactivo de Sudan Red 7B para su observación al microscopio.

Para llevar a cabo el experimento se prepara una solución de triton:lejía al 1:1000 y se añade unos 800 μL a cada tubo con las semillas dejándolos en agitación durante 20-30 minutos. Este tratamiento elimina la pigmentación de la semilla por lo que facilita la observación posterior de la tinción.

A continuación, se quita la lejía y se lava con agua *MilliQ* y después con etanol absoluto. Posteriormente se añade 1 mL de Colorformo:Metanol al 2:1 y se mantiene durante 15 minutos agitando cada 5 minutos. Este tratamiento elimina los lípidos propios de la semilla que podrían teñirse con el Sudan. Transcurrido ese tiempo se lava con etanol absoluto y se añade 200 μL de una solución previamente preparada de Sudan Red 7B al 0,2% (p/v) con Polietilenglicol (PEG) y glicerol al 90% (v/v). La solución se deja durante dos horas a temperatura ambiente lavándose finalmente con agua *MilliQ*.

Por último las semillas teñidas se depositan sobre un portaobjetos para su observación en el microscopio Eclipse con el objetivo 20X y una exposición de 20 ms. Las fotografías se toman con el programa informático.

3.5.2. Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio

Una manera de cuantificar la permeabilidad de la cubierta de la semilla es mediante las sales de tetrazolio. Estos compuestos son transparentes y en el interior de la semilla se reducen a sales de formazano, de color rojizo, por la acción de reductasas NADH dependientes.

Para realizar el experimento se pesan tres réplicas biológicas de 25 mg de semillas de cada genotipo y se prepara una solución de tetrazolio al 1% (p/v). Se añade 500 μL de la solución al microtubo con las semillas y se incuba a 30°C durante 48 o 96 horas. Transcurrido ese tiempo se hacen 2 lavados con agua *MilliQ* y se filtran las semillas con *cheese-cloth*. A continuación, se procede a moler completamente las semillas con un mazo empleando nitrógeno líquido. Una vez molido el material, se añade 2 mL de etanol absoluto 96°. Acto seguido se centrifugan los tubos durante 7 minutos a 4°C a 15000 rpm. Se recoge el sobrenadante y se realizan dos réplicas técnicas a partir de cada réplica biológica. Todas ellas se miden en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 485 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de los mutantes a emplear

En este trabajo, se ha seguido una aproximación genética, basada en el empleo de mutantes en la ruta de biosíntesis de los flavonoides (Figura 3), para investigar el papel de estos compuestos en la longevidad de la semilla y su posible relación con su poder antioxidante. Esto ha sido posible gracias a que no existe redundancia génica lo que permite estudiar el efecto de pérdidas de función de genes individuales. Además, como se ha dicho en el apartado 1.4., estos mutantes se denominan *tt*: *transparent testa* y sus semillas poseen diferentes colores como consecuencia de los distintos tipos de flavonoides que acumulan.

Por ello, en primer lugar se realizó un trabajo bibliográfico con el objetivo de determinar qué mutantes podrían resultar los mejores candidatos para abordar el problema planteado. Es importante mencionar que de entre los distintos alelos disponibles para cada uno de estos mutantes, se seleccionaron aquellos de los que se tenían datos de su metabolómica, por lo que su composición exacta en flavonoides era conocida. La Tabla 1 resume la información extraída de los trabajos de Routaboul, *et al.*, 2006; Pourcel, *et al.*, 2005 y Bowerman, *et al.* 2012 referente a los flavonoides presentes en cada mutante seleccionado. A continuación se detallan los mutantes seleccionados y el motivo de su elección en cada caso (círculos amarillos en Figura 3).

Por un lado, se consideró interesante analizar el efecto de la ausencia total de flavonoides sobre la longevidad de la semilla. Para ello, se eligieron los genotipos mutantes *tt4-8* y *tt5-1* (Routaboul *et al.*, 2006) cuyas semillas no tienen flavonoides de ningún tipo (Tabla 1). Esto es debido a que tienen truncado el gen que codifica para la primera y segunda enzima de la ruta de biosíntesis común a todos los flavonoides (chalcona sintasa, CHS y chalcona isomerasa, CHI respectivamente, Figura 3). El empleo de estos mutantes se consideró una herramienta muy útil para estudiar hasta qué punto es relevante el papel de los flavonoides para la longevidad de las semillas.

Por otro lado, se quiso investigar si un aumento en la cantidad de flavonoides tiene alguna respuesta positiva frente al envejecimiento acelerado de semillas. Para ello, se escogió el mutante *tt10-2* (Pourcel *et al.*, 2005) que presenta tanto un aumento de proantocianidinas como de flavonoles (derivados de quercetina) respecto al genotipo silvestre o sin mutación (Tabla 1). Esto ocurre porque estas semillas tienen truncado el gen de la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Figura 3) que cataliza el último paso de oxidación necesario para formar las proantocianidinas.

Con el objetivo de evaluar si un cambio en la composición de flavonoides influye en la longevidad de la semilla, se seleccionó el mutante *tt7-4*. Este mutante tiene truncado el gen de la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) por lo que no se llega a formar dihidroquercetina (Routaboul *et al.*, 2006), precursor directo de la quercetina y necesario para la síntesis de epicatequina, monómero habitual de las PAs (Figura 3). Por este motivo todos los flavonoles que contiene son derivados de kaempferol (Tabla 1) y las proantocianidinas (PAs) se acumulan en menor medida y se construyen con un monómero distinto al habitual llamado epiafzelequina (Figura 3 encuadrado en morado).

Para tratar de determinar qué compuesto de entre los múltiples flavonoides puede tener más relevancia en la longevidad de las semillas, se seleccionaron los mutantes *fls1-3*, *tt3-4* y *ban1*:

Por un lado *fls1-3* (Bowerman *et al.*, 2012), es un mutante que tiene truncado el gen que codifica a la enzima flavonol sintasa (FLS) lo que provoca un aumento en sus proantocianidinas (PAs) y una ausencia de flavonoles (Tabla 1). Este mutante se seleccionó para analizar si los flavonoles son esenciales para soportar tratamientos de envejecimiento acelerado además de un incremento en PA.

Por otro lado, el mutante *tt3-4* (Routaboul *et al.*, 2006) fue seleccionado. Contrariamente al mutante anterior, contiene más flavonoles y ninguna PA respecto a su genotipo silvestre (Tabla 1). Esto ocurre porque el gen de la enzima DFR, dihidroflavonol 4-reductasa, está truncado. Este genotipo se utilizó para evaluar si un aumento en los flavonoles junto con la ausencia de PA es perjudicial o beneficioso para el envejecimiento de la semilla.

Por último, el mutante *ban1* (Routaboul *et al.*, 2006) tiene los mismos niveles de kaempferol que el genotipo *wild type* pero ningún contenido en PAs (Tabla 1). Esto es posible gracias a que el gen de la enzima ANR, antocianidina reductasa, está truncado (Figura 3). Este mutante fue empleado para analizar si las PAs son esenciales para el envejecimiento de la semilla.

Tabla 1. Contenido de los diferentes flavonoides en cada mutante de la ruta biosintética. 0: 0% de contenido en ese tipo de flavonoide; = : igual contenido que el *wild type*; - : menor contenido que el *wild type*; + : mayor contenido que el *wild type*. *Los monómeros de las PAs de *tt7-4* son de epiafzelequina a diferencia del *wild type* que son de epicatequina (Fig. 3).

Alelos mutantes	Enzima afectada	Composición en flavonoides		
		PA	Flavonoles	
			Quercetina	Kaempferol
<i>tt4-8</i>	CHS (chalcona sintasa)	0	0	0
<i>tt5-1</i>	CHI (chalcona isomerasa)	0	0	0
<i>tt10-2</i>	PPO (polifenol oxidasa)	+	+	=
<i>tt7-4</i>	F3'H (flavonoide 3'-hidroxilasa)	-*	0	+
<i>tt3-4</i>	DFR (dihidroflavonol 4-reductasa)	0	+	=
<i>fls1-3</i>	FLS (flavonol sintasa)	+	0	0
<i>ban1</i>	ANR (antocianidina reductasa)	0	=	=

4.2. Fenotipo de las semillas mutantes tras tratamientos de envejecimiento acelerado

En primer lugar, se quiso analizar la longevidad de las semillas de los mutantes seleccionados. Como se ha explicado en la introducción, en los laboratorios se llevan a cabo tratamientos de envejecimiento acelerado (*accelerating aging, aa*) para tratar de mimetizar el envejecimiento natural. Estos tratamientos consisten en someter a las semillas a altas temperaturas y a elevada humedad relativa para reducir el tiempo necesario para su envejecimiento sin tener que esperar a que ocurra el lento envejecimiento natural. Concretamente, en este trabajo se siguieron dos aproximaciones diferentes que se han denominado como envejecimiento de semillas embebidas y envejecimiento en presencia de alta humedad relativa.

Tras ambos tratamientos, se evaluó la aparición de cotiledones verdes de los diferentes mutantes respecto a su control. Así mismo, en cada ensayo se comprobó que la aparición de cotiledones en condiciones control (sin tratamiento) oscilaba entre el 90 y el 100% para todos los genotipos, por lo que las diferencias observadas tras el tratamiento se deben a ese estrés y no a cambios en la viabilidad inicial de las semillas empleadas.

4.2.1. Tratamiento de envejecimiento acelerado con semillas embebidas en agua a 37,5°C de temperatura durante 2 días

En este tratamiento las semillas previamente esterilizadas y estratificadas se mantenían embebidas en agua y se sometían a una temperatura de 37,5°C durante 2 días. Tras el tratamiento, se sembraban en medio MS. Como se ha indicado anteriormente, al mismo tiempo, se sembraron placas con semillas control, es decir, sin haberles aplicado el tratamiento de envejecimiento acelerado y los resultados fueron que la aparición de cotiledones osciló entre el 90-100% a 9 días post siembra para todos los genotipos excepto para *tt10-2* que germinó peor en condiciones normales (Figura 5A) pero sin embargo mostró tolerancia al tratamiento de envejecimiento acelerado (Figura 5B). Esto demuestra un buen estado de las semillas, del medio de siembra y de las condiciones en las que se sembró.

En la Figura 5B se representa el porcentaje de cotiledones verdes de semillas tratadas 10 días después de su siembra en medio MS. En primer lugar, se puede observar que las semillas *wild type* (Ws y Ler) se ven claramente afectadas por el tratamiento, ya que presentan un porcentaje de cotiledones verdes del 35 y el 40% respectivamente, frente al 100% mostrado sin tratamiento (Figura 5A). Sorprendentemente, los mutantes *tt4-8* y *tt5-1* no muestran sensibilidad en estas condiciones. Este resultado concuerda con el obtenido previamente por Clerkx *et al.*, 2004, e indica que la eliminación total de flavonoides (Tabla 1) no tiene un efecto directo sobre la longevidad de las semillas. Del mismo modo, el incremento en la cantidad de flavonoides propio del mutante *tt10-2* no mejora su comportamiento tras el envejecimiento. Este dato contrasta con el que publicó Debeaujon en el 2000 ya que en su caso este mutante sí mostraba cierta sensibilidad, aunque las condiciones del ensayo no coinciden con las de este trabajo. A diferencia de estos mutantes, el porcentaje de cotiledones verdes del mutante *tt7-4* sí es significativamente menor que el de su *wild type* (Ws), lo que en un principio sugiere que un cambio en la composición de flavonoides (Tabla 1) disminuye la longevidad de las semillas.

Como se observa en la Figura 5, el mutante *tt3-4* que carece de PA, no muestra mayor sensibilidad al envejecimiento, al igual que el mutante *fls1-3*, sin flavonoles. En ambos casos, este fenotipo podría deberse a un mecanismo de compensación, ya que presentan más flavonoles y PA, respectivamente (Tabla 1). Es decir, el mutante *tt3-4* supliría la ausencia de PAs con un aumento en flavonoles mientras que el mutante *fls1-3* compensaría su carencia en flavonoles aumentando las PAs. Finalmente, la sensibilidad del mutante *ban1*, con menor contenido en PAs pero similar contenido en flavonoles, podría indicar que una reducción en el contenido de PAs en la semilla sí que afecta a su longevidad siempre que no pueda compensarse con un aumento de flavonoles.

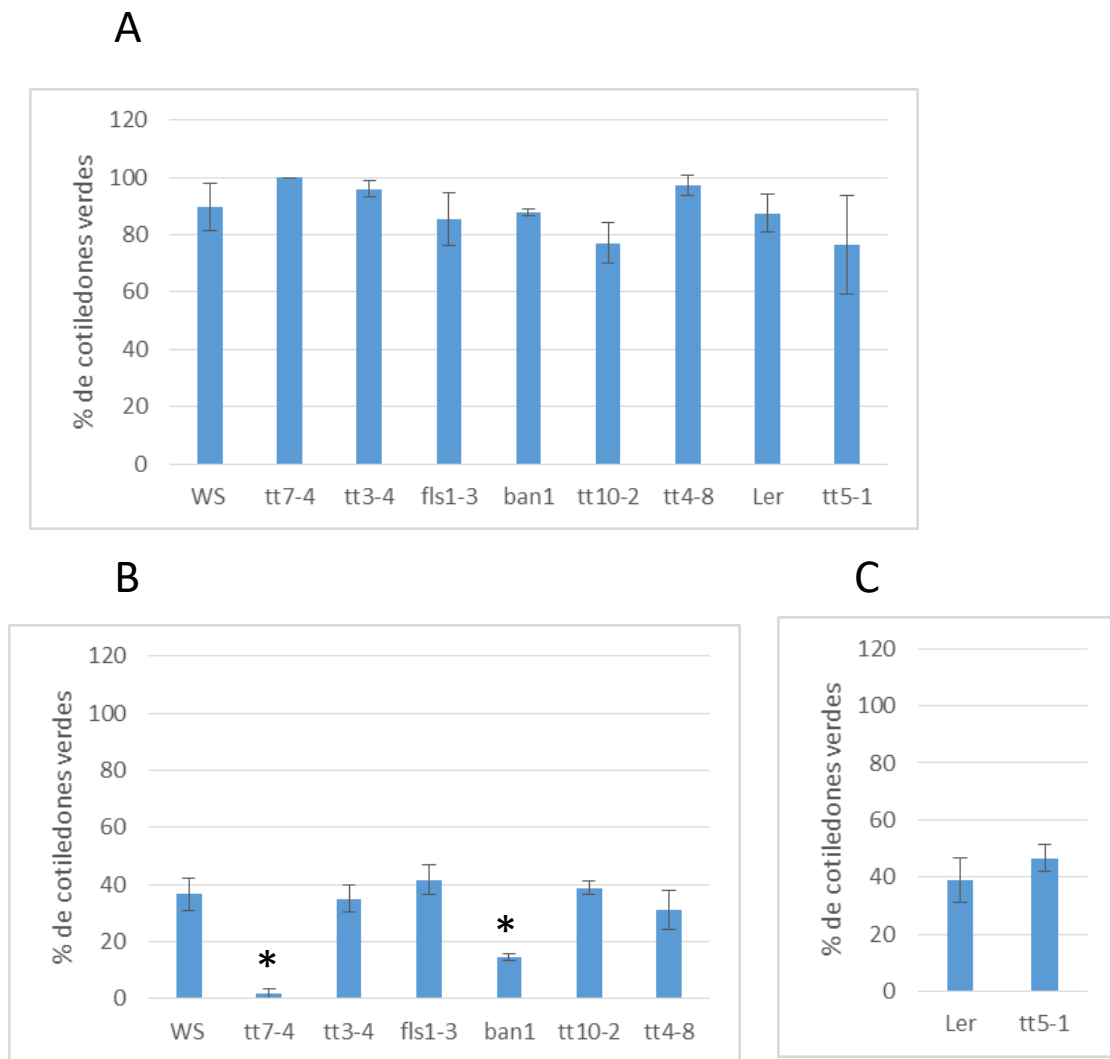


Figura 5. Porcentaje de cotiledones verdes de semillas germinadas en placa de medio MS a 10 días post siembra A) semillas sin tratamiento o control. B) Semillas de WS y mutantes con ese fondo genético tras 48 horas embebidas en agua a 37,5°C. C) Semillas de Ler y mutantes con ese fondo genético tras 48 horas embebidas en agua a 37,5°C. * representa que existe una diferencia significativa entre la media de ese mutante respecto a la de su wild type con un p-valor menor al 0,05 en la prueba t-Student.

4.2.2. Tratamiento de envejecimiento acelerado con semillas en seco a 75% de humedad relativa y 37°C de temperatura

En este tratamiento las semillas se mantenían en seco y se sometían a una temperatura de 37°C. En un recipiente hermético, una solución de cloruro de sodio saturada era responsable de proporcionar una atmósfera interior de 75% de humedad relativa. Tras el tratamiento, se esterilizaron y estratificaron para su posterior siembra en medio MS.

Este método no había sido empleado con anterioridad en el laboratorio por lo que en primer lugar se realizó una puesta a punto para determinar las condiciones apropiadas para cada genotipo. La Figura 6 representa el decreciente porcentaje de cotiledones verdes a medida que se aumentan los días de envejecimiento. Se observa que sin envejecimiento las semillas tienen entre 80 y 100% de

cotiledones verdes y a medida que se envejecen ese porcentaje va disminuyendo. El genotipo Ws resiste mejor el tratamiento que el genotipo Ler, es decir el genotipo Ler es más sensible al tratamiento. Por esta razón, se eligieron un tratamiento menos severo de sólo 7 días de envejecimiento para Ler y un tratamiento un poco más severo de 10 días para Ws, cada uno con sus mutantes.

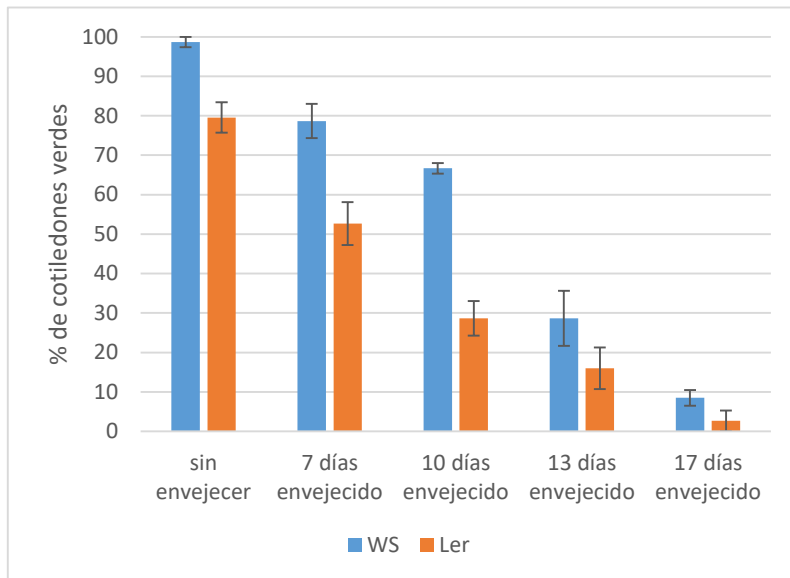


Figura 6. Puesta a punto del tratamiento de envejecimiento acelerado a 75% de humedad relativa y 37°C. % de cotiledones verdes de semillas de los wild type Ws y Ler a 7 días de la siembra de izquierda a derecha en semillas sin tratar, semillas tratadas durante 7, 10, 13 y 17 días.

Como se ha indicado anteriormente, al mismo tiempo, se sembraron placas con semillas control, es decir, sin haberles aplicado el tratamiento de envejecimiento acelerado y los resultados fueron que la aparición de cotiledones osciló entre el 90-100% a 9 días post siembra para todos los genotipos excepto *ban1* que estaba sobre el 70% y siempre ha tenido ese defecto en su germinación Figura 8A. Esto demuestra un buen estado de las semillas, del medio de siembra y de las condiciones en las que se sembró. En la Figura 7 se puede observar una placa sembrada con semillas sometidas al tratamiento y otra con semillas control o sin tratamiento (Figura 7A y Figura 7B, respectivamente).

La Figura 8B y 8C muestra que tras este tratamiento de envejecimiento acelerado el porcentaje de cotiledones verdes se ve reducido a una media de 70% en Ws y un 80% para Ler. En primer lugar, estos resultados no coinciden con la puesta a punto. Esto es debido a que estas semillas pertenecen a un lote más nuevo que el de la puesta a punto y por eso resisten mejor el tratamiento y tienen los porcentajes de cotiledones verdes ligeramente superiores. Por otro lado, se puede observar que el tratamiento resulta menos agresivo que el de semillas embebidas (apartado 4.2.1). Sin embargo, al igual que en el apartado anterior, los mutantes *ban1* y *tt7-4* son los únicos significativamente más sensibles al tratamiento.

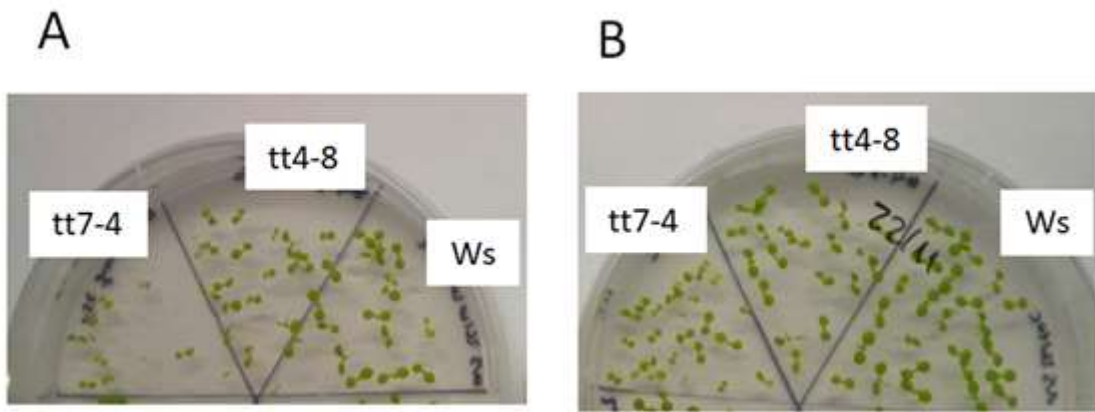


Figura 7. Placa Petri sembrada para el análisis del porcentaje de germinación a los 7 días postsiembra. A) Semillas tratadas durante 10 días a 75% humedad relativa y 37°C, de izq. a derecha mutantes tt7-4, tt4-8 y genotipo silvestre Ws. B) Semillas control sin tratar, de izq. a derecha tt7-4, tt4-8 y Ws.

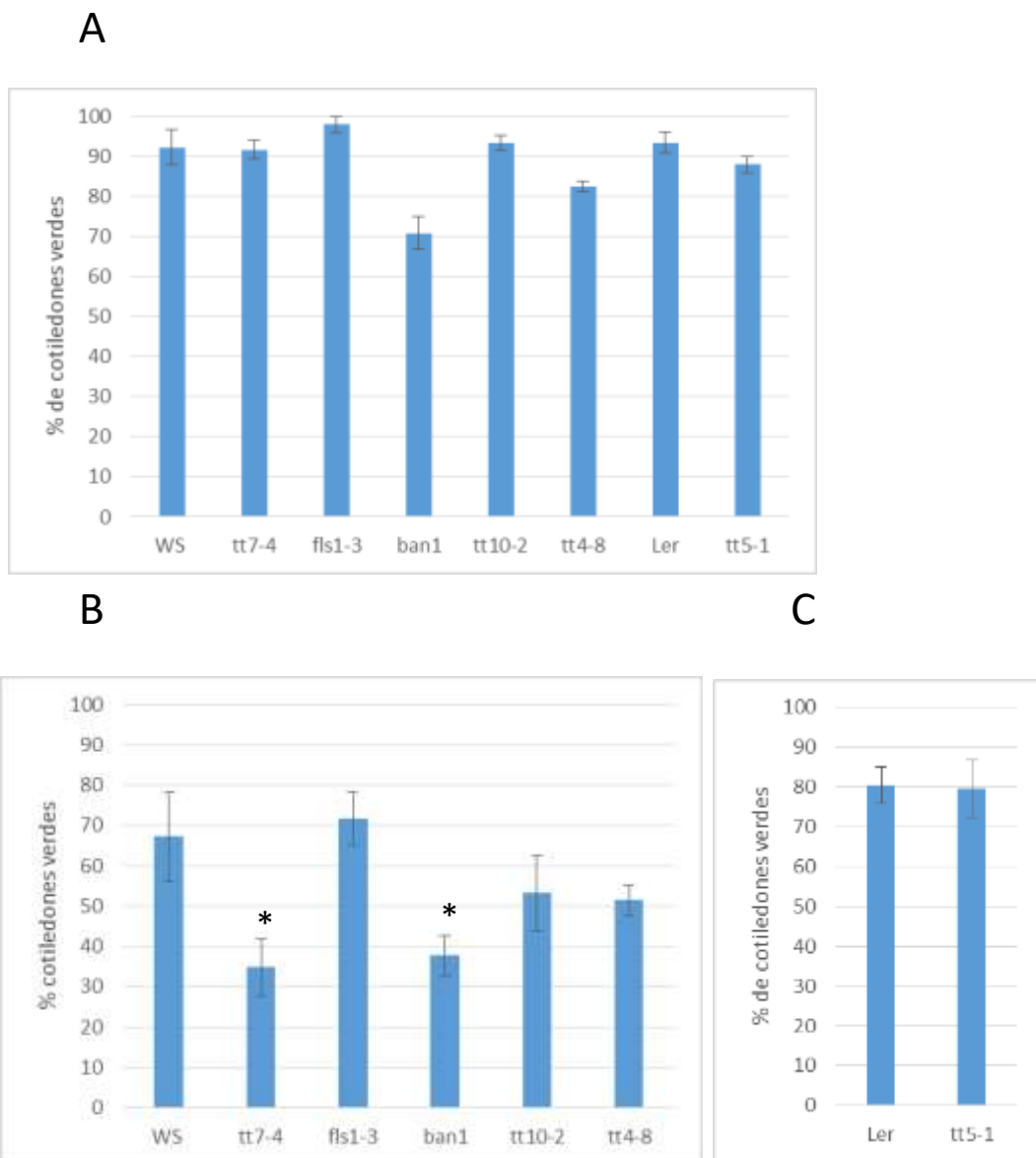


Figura 8. % de cotiledones verdes tras 7 días de la siembra A) Condiciones sin tratamiento o control. B) Tras el tratamiento de 10 día a 75% humedad relativa y 37°C para Ws y sus mutantes C) Tras el tratamiento de 7 días a 75% humedad relativa y 37°C para Ler y su mutante tt5-1. * indica que hay diferencias significativas entre ese mutante y su wild type con un p-valor menor a 0,05 en la prueba t-Student.

Por lo tanto, los resultados obtenidos con ambos tratamientos coinciden en señalar a los mutantes *tt7-4* y *ban1* como los únicos más sensibles al envejecimiento. Como se recoge en la Tabla 1, *tt7-4* posee menos PA y están formadas con monómeros diferentes al *wild type* (epiafzelequina en vez de epicatequina). Además, no posee flavonoles derivados de quercetina, sino únicamente de kaempferol. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que un cambio en la composición de flavonoides sí afecta a la longevidad de semillas.

Por otro lado, como se ha indicado anteriormente el mutante *ban1* no contiene PA, y su contenido en flavonoles no varía respecto al genotipo silvestre *Ws* (Tabla 1), lo que sugiere que las PA pueden tener un papel en la longevidad de semillas.

4.3. Fenotipo en presencia de estrés oxidativo

Como se ha explicado en la introducción, estudios previos relacionan a los flavonoides con la longevidad de semillas y sugieren que su efecto se debe a la capacidad antioxidante de estos compuestos (Debeaujon, 2000). Además, Clerck y colaboradores en su trabajo publicado en 2004 indican que "sería esperable que los mutantes con una función antioxidante defectuosa fueran más sensibles a un compuesto generador de ROS como el agua oxigenada".

Por ello, se planteó realizar tratamientos de estrés oxidativo consistentes en sembrar las semillas en un medio MS con sustancias oxidantes (paraquat y agua oxigenada) para evaluar la capacidad antioxidante inherente de cada semilla. La hipótesis es que los mutantes empleados, al carecer de algún o algunos flavonoides (Tabla1) sean más sensibles que el *wild type* en estas condiciones.

4.3.1. Fenotipo en presencia de paraquat (PQ)

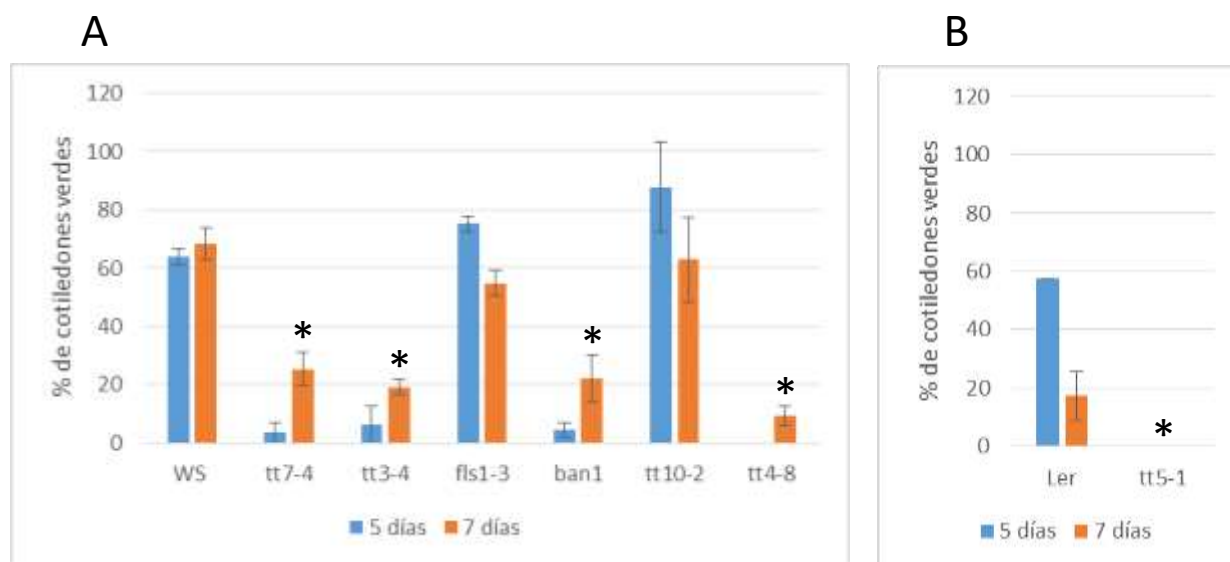


Figura 9. Porcentaje de cotiledones a los 5 y 7 días postsiembra en un medio con una concentración de paraquat del 0,6 μ M. A) Mutantes con fondo genético *Ws*. B) Mutantes con fondo genético *Ler*. * indica que hay diferencias significativas entre el porcentaje de cotiledones verdes de ese mutante y el de su *wild type* con un *p*-valor menor a 0,05 en la prueba *t*-Student.

El paraquat (PQ) es un agente oxidante que produce un radical superóxido que es muy reactivo y tóxico para la semilla. Este compuesto fue añadido al medio y después de 5 y 7 días desde la siembra, se midieron los cotiledones verdes de cada genotipo.

En primer lugar, es importante mencionar que la gran diferencia en el porcentaje de cotiledones verdes del genotipo Ler entre 5 y 7 días post siembra (Figura 9) se debió a que muchos cotiledones verdes a día 5, habían blanqueado a día 7. Por otro lado, los resultados obtenidos tras el tratamiento con paraquat muestran que, como cabría esperar, todos los mutantes excepto *fls1-3* y *tt10-2* son más sensibles al tratamiento que su correspondiente *wild type*. Esta excepción coincide con que se trata de dos mutantes con el contenido de PAs incrementado respecto a su *wild type* (Tabla 1). Por tanto estos resultados sugieren que el contenido en PAs parece ser esencial para la tolerancia al paraquat durante el establecimiento de la plántula. Estos datos concuerdan con lo observado por Jia *et al.*, (2012) quien sugiere que las PAs protegen frente al radical superóxido del paraquat.

Comparando los resultados obtenidos tras tratamientos de envejecimiento acelerado con los de estrés oxidativo con paraquat, se observa una falta de correlación entre ellos, ya que en el caso del paraquat hay más mutantes sensibles al tratamiento. De hecho mutantes como *tt3-4*, *tt4-8* o *tt5-1*, que muestran sensibilidad al paraquat, no son más susceptibles al envejecimiento. Estos datos sugieren que la tolerancia al radical superóxido (PQ) no resulta esencial para la longevidad de la semilla. No obstante, se observa que *fls1-3* y *tt10-2* se comportan de manera similar a su *wild type* Ws tanto en los tratamientos de envejecimiento acelerado como en el tratamiento con paraquat, y que los mutantes sensibles a un tratamiento lo son también al otro como el caso de *tt7-4* y *ban1*.

4.3.2. Fenotipo en presencia de agua oxigenada

El agua oxigenada es un agente oxidante que resulta tóxico para la germinación de la semilla. Este compuesto fue añadido al medio donde se sembraron las semillas y después de 5 y 7 días desde la siembra se midieron los porcentajes de cotiledones verdes como se muestra en la Figura 10.

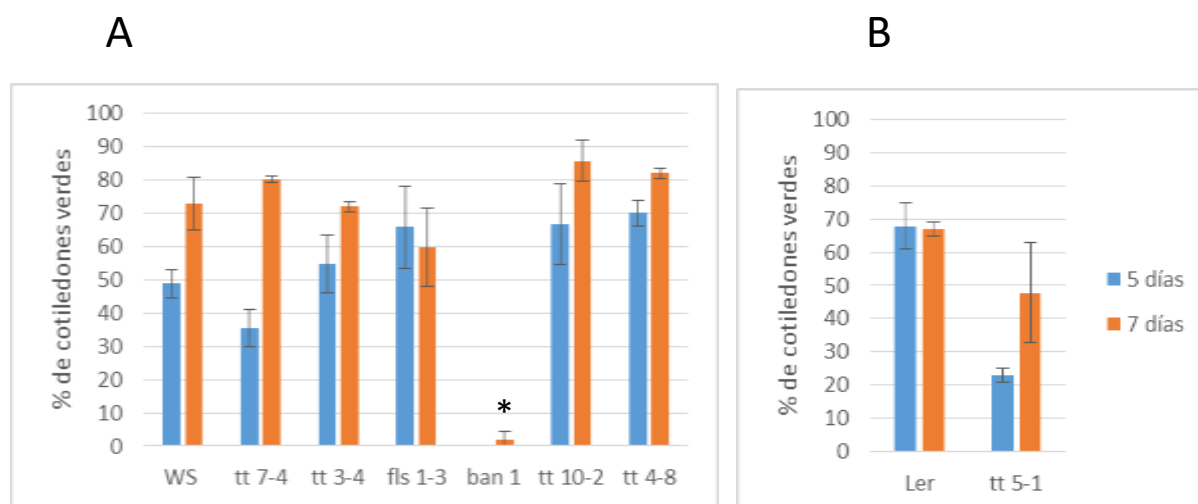


Figura 10. Porcentaje de cotiledones verdes a los 5 y 7 días postsiembra en un medio con una concentración de 8mM. A) Mutantes con fondo genético Ws. B) Mutantes con fondo genético Ler. * indica que hay diferencias significativas entre el porcentaje de cotiledones verdes de ese mutante y el de su *wild type* con un *p*-valor menor a 0,05 en la prueba t-Student.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento con agua oxigenada parecen indicar que todos los mutantes, excepto *ban1*, tienen un porcentaje de cotiledones verdes igual al de su *wild type* tras el tratamiento. Este resultado parece indicar que de forma general, a diferencia de lo observado en el caso del paraquat (PQ), la alteración del contenido en flavonoides no es importante para la tolerancia a agua oxigenada.

Sin embargo, como ya se ha comentado, *ban1* es un mutante con el contenido de PA reducido y un igual contenido en flavonoles respecto a su *wild type* (Tabla 1). Por ello, su sensibilidad a agua oxigenada (y paraquat) sugiere que una reducción de PA supone una menor tolerancia a estrés oxidativo, que, en este caso, se correlaciona con su sensibilidad a envejecimiento acelerado. A diferencia de *ban1*, el mutante *tt7-4*, que también presenta menor longevidad de semilla, es sensible a PQ pero no a agua oxigenada. Por tanto, no puede afirmarse que los mutantes sensibles a envejecimiento lo son también a estrés oxidativo (PQ y agua oxigenada).

4.4. Medida del daño oxidativo (MDA) en semilla

Los tratamientos de envejecimiento acelerado provocan daño oxidativo a las moléculas biológicas de la célula. Uno de los fenómenos que ocurren es la peroxidación de los lípidos, en la que se forma un producto llamado malondialdehído (MDA). El MDA forma un complejo con el ácido tiobarbitúrico (TBA), MDA-TBA, y es posible cuantificarlo mediante la mayor o menor absorbancia a 532nm en un espectrofotómetro.

El objetivo de este ensayo es cuantificar el MDA presente en muestras control sin tratamiento alguno y en muestras que han sufrido el tratamiento de envejecimiento acelerado en presencia de alta humedad relativa descrito en el apartado 3.3.2. Se espera que la muestra control contenga menos MDA que la muestra que ha sufrido el envejecimiento.

4.4.1. Puesta a punto del método

En primer lugar, se quiso comprobar si los espectros obtenidos tras la extracción de MDA eran los esperados. Tal y como se indicó en el apartado 3.4. de materiales y métodos, para cada genotipo se realizaron medidas con TBA (el MDA se extrae de la semilla con una solución que contiene TBA); y sin TBA (el MDA se extrae con una solución que no contiene TBA). Las medidas sin TBA servirán para mostrar las posibles interferencias de compuestos que absorban a 532nm, ya que es de suponer que no se va a formar el complejo MDA-TBA. En la Figura 11 muestra un espectro típico obtenido para el genotipo silvestre (Ws) en presencia de TBA (A) o sin TBA (B). En el primer caso, se observa el pico esperado a 532nm, propio de la formación del complejo MDA-TBA. Así mismo, aparece un pico a 440nm. Este pico lo forman los azúcares presentes en la semilla con el TBA (Hodges *et al.*, 1999). En la Figura 11B se observa el espectro propio de una muestra sin TBA que se asemeja a una línea horizontal. En este caso, no se forman complejos, por lo que no aparecen picos de absorbancia. Por lo tanto, parece que efectivamente, se está produciendo la formación del complejo MDA-TBA, que se traduce en un pico de absorbancia a 532 nm que no se observa en las muestras sin TBA.

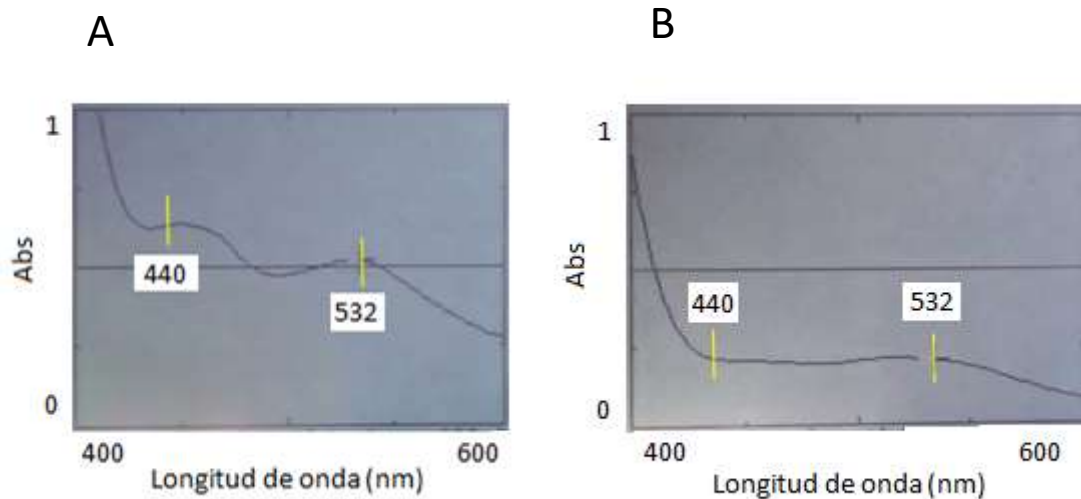


Figura 11. Espectros de absorbancia de muestras del control WS. Las barras en vertical amarillas señalan los picos de absorbancia a 440nm y a 532nm. A) Extracto con TBA, se observan dos picos. B) Extracto sin TBA, no se observan picos definidos.

Por otro lado, se hizo un primer ensayo con plantas en un ecotipo silvestre equivalente a Ws como lo es Col 0 (Columbia), para comprobar si el tratamiento de envejecimiento acelerado en presencia de alta humedad relativa aumentaba la producción de MDA, tal y como se muestra en el trabajo de Devaiah *et al.*, 2007.

La figura 12 muestra cómo en Col 0, en las condiciones ensayadas, no fue posible observar un incremento en los equivalentes de MDA entre la muestra tratada y la muestra sin tratar. Esta discordancia con el trabajo previo de Devaiah *et al.*, 2007 podría explicarse porque en su caso sólo un 25% de las semillas envejecidas eran capaces de formar cotiledones verdes mientras que en nuestro caso lo hacía un 70%. Sugerimos, por tanto, que es necesario realizar tratamientos más fuertes para poder observar el incremento en los equivalentes de MDA.

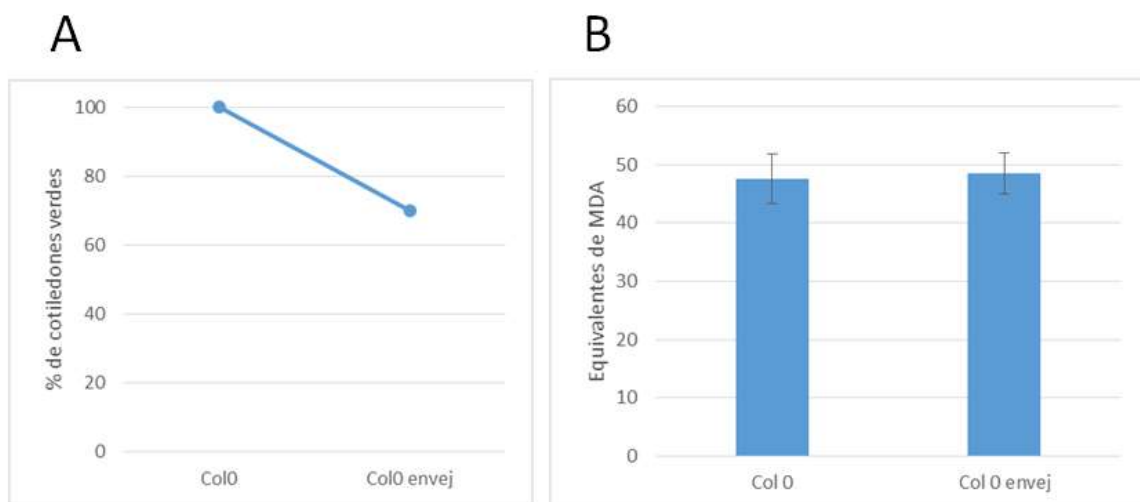


Figura 12. A) Porcentaje de cotiledones verdes sin envejecer y envejeciendo 17 días a 75% de humedad. B) Equivalentes de MDA sin envejecimiento y tras 17 días a 75% de humedad relativa y 37°C

4.4.2. Prueba de concepto

Como prueba de concepto, se decidió realizar el ensayo de medida de MDA con uno de los mutantes más sensibles al envejecimiento: *ban1*.

La Figura 13A muestra el porcentaje de cotiledones verdes tras 0, 13 y 20 días de envejecimiento acelerado. Puede observarse que tras 13 días sólo el 20% de las semillas del mutante *ban1* expanden sus cotiledones verdes, mientras que el genotipo silvestre *Ws* mantiene un 80% de formación de cotiledones verdes. En esas condiciones, no se observa un aumento en el contenido de MDA del genotipo silvestre (Figura 13B), y sí una tendencia a aumentar en el mutante *ban1* (si bien no resulta significativa). Tras 20 días de envejecimiento acelerado, tanto el control como el mutante poseen menos de un 20% de cotiledones verdes. Ese descenso en germinación y aparición de cotiledones se corresponde con un aumento del contenido en MDA del mutante, pero, sorprendentemente, no del genotipo silvestre (*Ws*) a pesar de estar igualmente afectado por el tratamiento.

Estos resultados no concuerdan con los resultados obtenidos por Devaiah *et al.*, 2007, probablemente debido a que en su caso el tratamiento de envejecimiento eran dos días de envejecimiento acelerado a 43°C y 100% de humedad relativa a diferencia del tratamiento aplicado en este trabajo descrito en el apartado 3.3.2. Por este motivo, es posible que no observemos cambios en el genotipo silvestre *Ws*.

Sin embargo, en el mutante *ban1* que es más sensible (Figura 7), sí se observa un aumento de sus equivalentes de MDA tras el envejecimiento. Probablemente, estas semillas mutantes sufren un mayor daño oxidativo con el paso del tiempo por lo que se forma más MDA en su interior y, por ello, tienen menor longevidad.

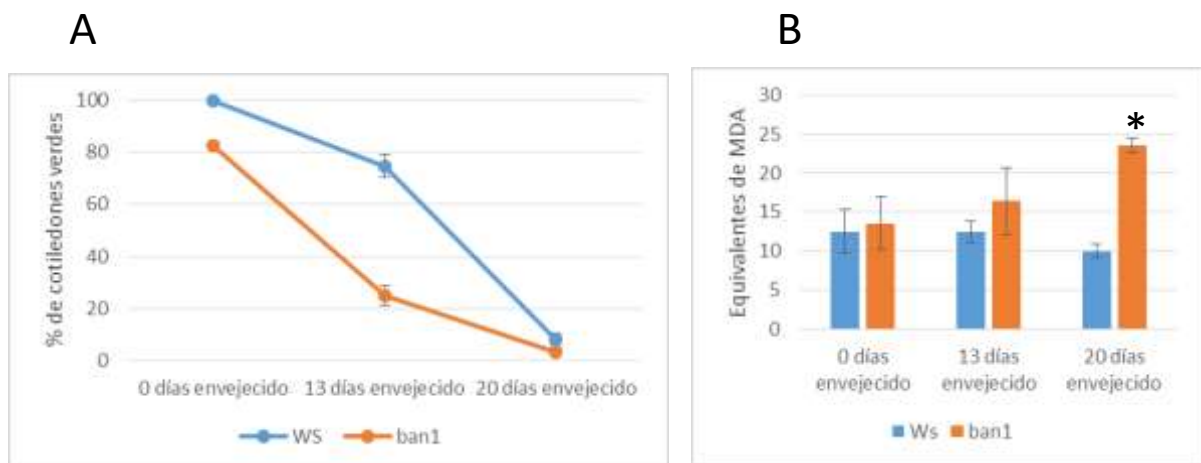


Figura 13. Ensayo MDA. A) % de cotiledones verdes de las semillas *Ws* (azul) y *ban1* (naranja) a los 0, 13 y 20 días de envejecimiento acelerado a 75% de humedad relativa y 37°C. B) Equivalentes de MDA a los 0, 13 y 20 días de envejecimiento acelerado.

4.5. Estudio de la permeabilidad de la cubierta de la semilla

Se ha descrito en Finkelstein *et al.*, (2008) que uno de los factores que determinan la longevidad de las semillas es la permeabilidad de su cubierta a factores externos como oxígeno o agua, que pueden provocar ROS y dañar el embrión. Para estudiar la importancia de este componente en el fenotipo de los mutantes tras envejecimiento acelerado, se emplearon dos aproximaciones complementarias: por un lado, se observó al microscopio la capa de suberina (uno de los componentes principales de la cubierta que determina su permeabilidad) y, por otro lado, se hicieron mediciones cuantitativas de la toma de tetrazolio tal y como se explica a continuación.

4.5.1. Tinción de la capa de suberina

Como se ha indicado anteriormente, un mayor grosor de la capa de suberina confiere mayor impermeabilidad a la cubierta de la semilla y, por tanto, mayor protección contra agentes externos dañinos. Para observar dicha capa en el microscopio, se escogió un genotipo sensible a envejecimiento acelerado (*tt7-4*) y un genotipo de los más tolerantes (*tt10-2*).

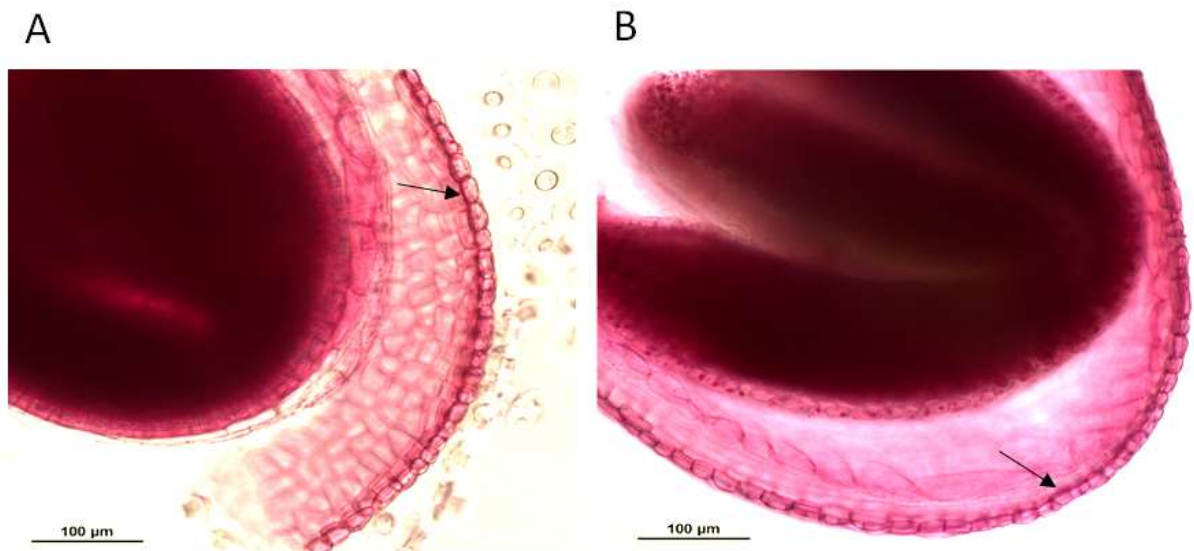


Figura 14. Imagen obtenida con el microscopio Eclipse tras la tinción de las semillas de *Ws* (A) y del mutante *tt10-2* (B). Objetivo empleado: 20X. Tiempo de exposición: 20ms.

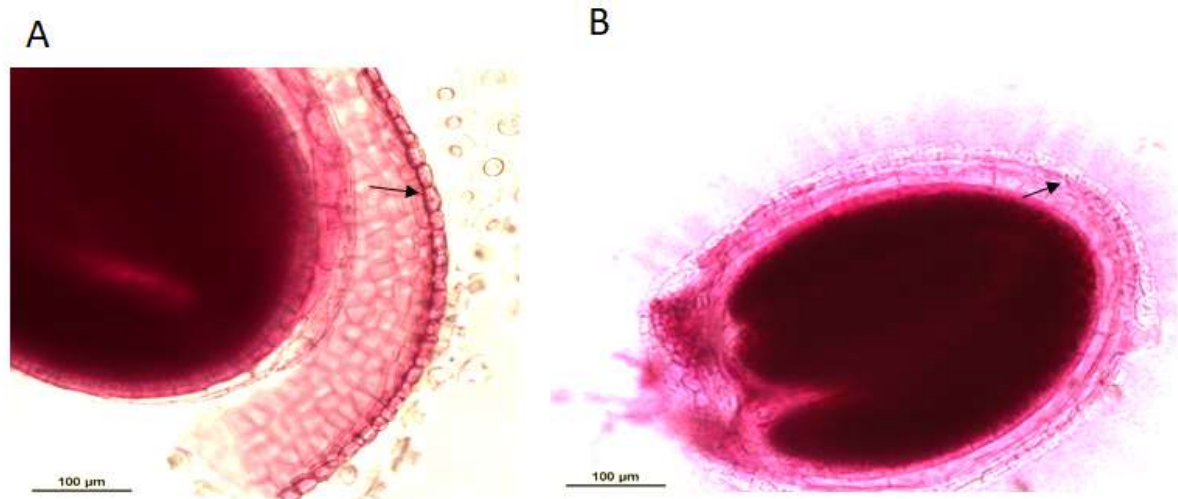


Figura 15. Imagen obtenida con el microscopio Eclipse tras la tinción de las semillas de Ws (A) y del mutante *tt7-4* (B). Objetivo empleado: 20X. Tiempo de exposición: 20ms.

En la Figura 14 se puede apreciar que tanto Ws como el mutante *tt10-2* presentan una capa de suberina en sus cubiertas. Sin embargo, no es posible establecer diferencias entre ellas. Este resultado es esperable dado que este mutante no es más sensible que el control al tratamiento de envejecimiento acelerado.

En cambio, la Figura 15 parece señalar que no hay presencia de capa de suberina en el mutante *tt7-4* lo que podría explicar su alta sensibilidad a los dos tratamientos de envejecimiento acelerado. Un dato curioso es que las semillas del mutante *tt7-4* son más pequeñas que las de Ws como se aprecia en la Figura 15.

4.5.2. Medida de la permeabilidad a sales de tetrazolio

Con el objetivo de evaluar la permeabilidad de manera cuantitativa se realizó la medida de la entrada de sales de tetrazolio al interior de la semilla. Para ello, se decidió incluir en este caso dos genotipos sensibles (*ban1* y *tt7-4*) y el mismo mutante como ejemplo de los más tolerantes (*tt10-2*).

Las sales de tetrazolio en disolución son incoloras, pero cuando penetran en el interior de la semilla se reducen a formazano de color rojizo (Figura 16) (Debeaujon *et al.*, 2000). Es posible realizar una extracción con etanol (Figura 16B) y medir la absorbancia de este producto final colorimétrico en un espectrofotómetro (Figura 17). Una mayor absorbancia significa una mayor concentración de tetrazolio que ha entrado en la semilla tras un periodo de incubación de 48 o 96 horas y, por tanto, una mayor permeabilidad de la cubierta de la semilla.

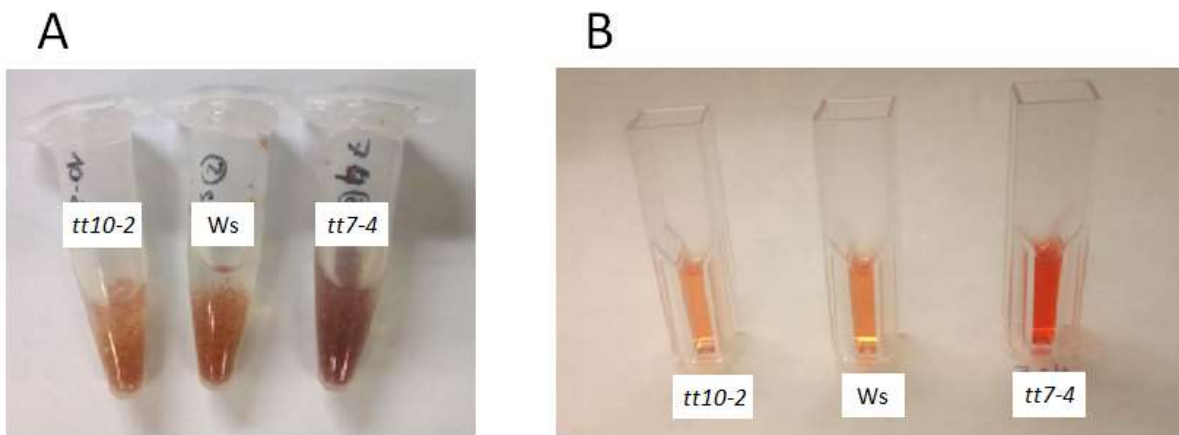


Figura 16. Etapas del proceso de medición del tetrazolio. A) Semillas incubadas en la solución de tetrazolio en microtubos. B) Extracto de las semillas en cubetas para medir en el espectrofotómetro.

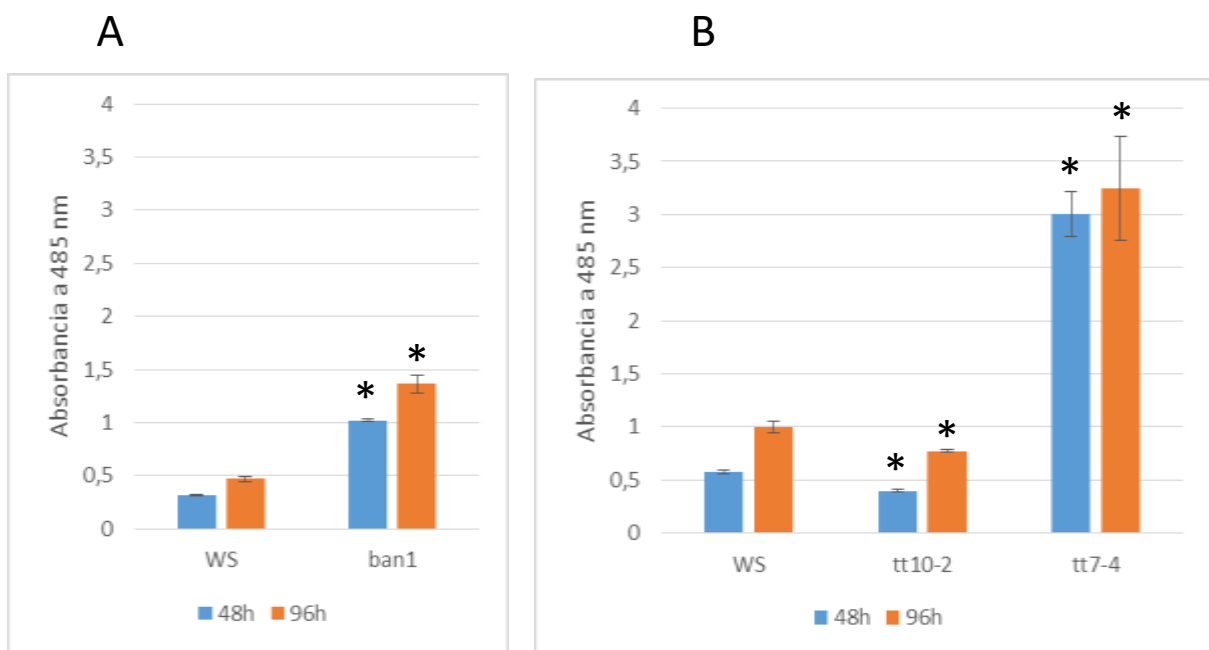


Figura 17. Gráfica de la absorbancia a 485 nm de los distintos genotipos tras 48h y 96h de incubación con una solución de tetrazolio al 1%. A) Ws y ban1. B) Ws, tt10-2 y tt7-4. * representa que existe una diferencia significativa entre la absorbancia de ese mutante respecto a la de su wild type con un p-valor menor al 0,05 en la prueba t-Student.

Así, los datos representados en la Figura 17 sugieren que las semillas de los mutantes *ban1* y *tt7-4* son más permeables que la de su *wild type* Ws, puesto que los extractos de sus semillas tienen mayor absorbancia, es decir, mayor tetrazolio ha penetrado en la semilla comparado con su *wild type*. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente por Debeaujon *et al.*, 2000, si bien en ese trabajo no se obtuvieron datos cuantitativos. Por ello, resulta interesante comentar que la permeabilidad de *tt7-4* es mayor que la de *ban1* ya que tras 48h de incubación, la absorbancia de *ban1* es 3,5 veces mayor que la de su *wild type*, mientras que la absorbancia de *tt7-4* es 5 veces mayor. Por otro lado, el mutante *tt10-2*

es menos permeable ya que la absorbancia de su extracto es significativamente menor que la de su *wild type* Ws.

Comparando estos resultados obtenidos con los obtenidos en la tinción de la capa de suberina, se podría concluir que la mayor entrada de tetrazolio en la semilla de *tt7-4* podría deberse a que este mutante no presenta capa de suberina. Sin embargo, no se observó un mayor grosor de la capa de suberina que explique la reducción en la entrada de tetrazolio observada en el mutante *tt10-2*. Esto podría deberse a la falta de sensibilidad del método empleado o a que son otros componentes de la cubierta, y no la suberina, los que determinan la mayor impermeabilidad en el mutante *tt10-2*.

Finalmente, resulta coherente que los mutantes *ban1* y *tt7-4* sean más sensibles al envejecimiento acelerado, dado que son más permeables a la entrada de posibles agentes oxidantes. Por el contrario, el mutante *tt10-2* es menos permeable y estaría más protegido frente a este posible daño oxidativo, lo que se traduce en una mayor longevidad de la semilla.

5. CONCLUSIONES

- Si analizamos los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir:
 - Los flavonoides no son componentes esenciales para la longevidad de la semilla ya que los mutantes *tt4-8* y *tt5-1* (sin flavonoides) no son sensibles a los tratamientos de envejecimiento acelerado. Probablemente estos mutantes suplen esta carencia con otros mecanismos de detoxificación como, por ejemplo, enzimas antioxidantes.
- Un aumento del contenido en flavonoides de la semilla no mejora su longevidad, como se muestra con el mutante *tt10-2*. Esto sugiere que el *wild type* ya contiene los niveles óptimos de flavonoides.
- Un adecuado contenido en proantocianidinas parece ser esencial para la tolerancia al agente oxidante paraquat durante el establecimiento de la plántula, ya que todos los mutantes con menor contenido en PA son susceptibles a este compuesto independientemente de su contenido en flavonoles.
- La alteración del contenido en flavonoides no parece importante para la tolerancia a agua oxigenada, ya que sólo el mutante *ban1* muestra sensibilidad a este compuesto oxidante.
- Algunos mutantes en la biosíntesis de flavonoides tienen alterada la permeabilidad de la cubierta de la semilla. En los mutantes analizados, se ha observado que los más permeables resultan más sensibles al envejecimiento de semillas y viceversa, tal y como ha sido descrito previamente para otros mutantes.
- La susceptibilidad del mutante *tt7-4* al envejecimiento acelerado podría deberse al cambio en la composición de flavonoides de su semilla y/o a la mayor permeabilidad de su cubierta (y ausencia de capa de suberina). Serán necesarios futuros estudios para determinar cuál de estos componentes juega un papel más importante.
- La sensibilidad del mutante *ban1* a envejecimiento acelerado podría deberse a su menor contenido en PA (sin aumento de flavonoles), a su sensibilidad a estrés oxidativo (agua oxigenada y PQ) y/o a la mayor permeabilidad de la cubierta de su semilla. Todo ello se traduce en un mayor daño oxidativo durante el envejecimiento. Al igual que en el caso anterior, serán necesarios futuros estudios para determinar cuál de estos componentes juega un papel más importante.
- Como conclusión general, en este trabajo no se ha podido demostrar que la sensibilidad de los mutantes al envejecimiento se deba únicamente a su falta de poder antioxidante. De hecho, queda patente que la longevidad de semillas es un carácter al que contribuyen numerosos factores como el contenido en flavonoides, la tolerancia a estrés oxidativo o la permeabilidad de la cubierta. Por tanto, es necesario continuar estudiando los mecanismos implicados en este carácter para poder determinar el componente más relevante y así llegar a obtener semillas más longevas.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abrahams, S.; Lee, E.; Walker, A. R.; Tanner, G. J.; Larkin, P. J. and 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

Agati, G.; Azzarello, E.; Pollastri, S. and Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196: 67-76

Appelhagen, I.; Thiedig, K.; Nordholt, N.; Schmidt, N.; Huep, G.; Sagasser, M. (2014). Update on transparent testa mutants from Arabidopsis thaliana: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta*, 240:955–970

Balestrazzi, A.; Confalonieri, M., Macovei, A. and Carbonera, D. (2011). Seed imbibition in *Medicago truncatula* Gaertn.: expression profiles of DNA repair genes in relation to PEG-mediated stress. *J. Plant Physiol.* 168: 706–713.

Biedermann, S.; Mooney, S. and Hellmann, H. (2011). Recognition and repair pathways of damaged DNA in higher plants. In Selected Topics in DNA Repair. Edited by Chen, C.C. *InTech Publishing, New York*. pp. 201–236

Bienert, G.P.; Møller, A.L.; Kristiansen, K.A.; Schulz, A.; Møller, I.M.; Schjoerring, J.K. and Jahn, T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.*, 282: 1183–1192

Bowerman, A.; Ramírez, M. V.; Price, M. B.; Helm R. F. and Winkel, B. S. J. (2012). Analysis of T-DNA alleles of flavonoid biosynthesis genes in *Arabidopsis* ecotype Columbia. *BMC Res Notes*, 5: 485

Bueso, E.; Ibáñez, C.; Sayas, E.; Muñoz-Bertomeu, J.; González-Guzmán, M.; Rodríguez, P.L. (2014b). A forward genetic approach in *Arabidopsis thaliana* identifies a RING-type ubiquitin ligase as a novel determinant of seed longevity. *Plant Sci.* 215–216: 110–116

Bueso, E.; Muñoz-Bertomeu, J.; Campos, F.; Brunaud, V.; Martínez, L. and Sayas, E. (2014a). ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX25 uncovers a role for gibberellins in seed longevity. *Plant Physiol.* 164: 999–1110

Caturla, N.; Vera-Samper, E.; Villalaín, J.; Mateo, C.R. and Micol, V. (2003). The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *FreeRad. Biol. Med.*, 34: 648-662

Clerkx, E.J.M.; Blankestijn-De Vries, H.; Ruys, G.J.; Groot, S.P.C. and Koornneef, M. (2004). Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.*, 121: 448–461

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F. and Wistrom, C.A. (1987). Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242: 1–10

Debeaujon, I.; Nesi, N.; Pérez, P.; Devic, M.; Grandjean, O.; Caboche, M. and Lepiniec, L. (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell*, 15: 2514–31

- Debeaujon, I.; Peeters, A. J. M.; Léon-Kloosterziel, K. M. and 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: 853-871
- Debeaujon, I.; Léon-Kloosterziel, K.M. and Koornneef, M. (2000). Influence of the Testa on Seed Dormancy, Germination, and Longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 122: 403–413
- Devaiah, S.P.; Pan, X.; Hong, Y.; Roth, M.; Welt, R. and Wang, X.(2007). Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 50: 950-957
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. (1995). Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1085-1097
- Dixon, R.A.; Xie, D.Y. and Sharma, S.B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.* 165: 9-28
- Donohue, K.; Dorn, L.; Griffith, C.; Kim, E.; Aguilera, A.; Polisetty, C.R. and Schmitt, J. (2005).The evolutionary ecology of seed germination of Arabidopsis thaliana: variable natural selection on germination timing. *Evolution*, 59: 758–770.
- Erlejman, A.G.; Verstraeten, S.V.; Fraga, C.G. and Oteiza, P.I. (2004). The interaction of flavonoids with membranes: potential determinants of flavonoid antioxidant effects. *Free Radic. Res.*, 38: 1311–1320
- Farag, M.A.; Huhman, D.V.; Lei, Z. and Sumner, L.W. (2007). Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of Medicago truncatula using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry*, 68: 342-354.
- Finkelstein, R.; Reeves, W.; Ariizumi, T. and Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 387–415
- Garbacki, N.; Tits, M.; Angenot, L. and Damas, J. (2004). Inhibitory effects of proanthocyanidins from Ribesnigrum leaves on carrageen in acute inflammatory reactions induced in rats. *BMC Pharmacology*, 4: 25
- Goel, A.; Goel, A.K. and Sheoran, I.S. (2003). Changes in oxidative stressenzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.*, 160: 1093–1100
- Gould, K. S.; McKelvie, J. and Markham, K. R. (2002). Do Anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environ.*, 25: 1261-1269
- Halliwell, B. (2009). The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.*, 46: 531–542
- Haughn, G. and Chaudhury, A. (2005).Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *TRENDS in Plant Science* Vol. 10 No. 10
- Hernández, I.; Alegre, L.; Van Breusegem, F. and Munné-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Cell press*

- Hodges, D. M.; DeLong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604 - 611
- Inoue, K. (2011). Emerging roles of the chloroplast outer envelope membrane. *Trends Plant Sci.* 16: 550 – 557
- Jia, L.G.; Sheng, Z.W.; Xu, W.F.; Li, Y.X.; Liu, Y.G.; Xia, Y.J. and Zhang, J.H. (2012). Modulation of anti-oxidation ability by proanthocyanidins during germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Mol. Plant.*,5 (2): 472–81
- Job, C.; Rajjou, L.; Lovigny, Y.; Belghazi, M. and Job, D. (2005). Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol.*, 138: 790–802
- Kitamura, S. (2006). Transport of flavonoids. in: *E. Grotewold (Ed.), The Science of Flavonoids*, Springer, New York, pp. 123–146
- Lepiniec, L; Debeaujon, I.; Routaboul, J.M.; Baudry, A.; Pourcel, L.; Nesi, N. and Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57:405-30
- Long, R. L.; Gorecki, M.J.; Renton, Scott, M. J. K.; Colville, L.; Goggin, D. E.; Commander, L. E.; Westcott, D. A.; Cherry, H. and Finch-Savage, W. E. (2015). The ecophysiology of seed persistence: a mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.*, 90: 31–59
- Long, R. L.; Stevens, J.C.; Griffiths, E.M.; Adamek, M.; Gorecki, M.J.; Powles, S.B.; Merritt, D.J. (2011b). Seeds of Brassicaceae weeds have an inherent or inducible response to the germination stimulant karrikinolide. *Annals of Botany*, 108: 933–944
- Long, R. L.; Steadman, K. J.; Panetta, F. D. and Adkins, S. W. (2009). Soil type does not affect seed ageing when soil water potential and temperature are controlled. *Plant and Soil*, 320: 131–140
- Long, R. L.; Panetta, F. D.; Steadman, K. J.; Probert, R.; Bekker, R. M.; Brooks, S. and Adkins, S. W. (2008). Seed persistence in the field may be predicted by laboratory-controlled aging. *Weed Science*, 56: 523–528
- Mao, Z. and Sun, W. (2015). *Arabidopsis* seed-specific vacuolar aquaporins are involved in maintaining seed longevity under the control of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3. *J. Exp. Bot.*, 66: 4781–4794
- Marles, M. A.; Ray, H. and Gruber, M.Y. (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64: 267-383
- Martinoia, E.; Maeshima, M. and Neuhaus, H.E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J. Exp. Bot.*, 58: 83-102
- Mehler, A.H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 33: 65–77
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). The reactive oxygen gene network in plants. *Trends PLant Sci.*, 9: 490-498

- Mladenka, P.; Zatloukalová, L.; Filipský, T. and Hrdina, R.(2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 49: 963–975
- Molina, I. O. (2008). Deposition and localization of lipid polyester in developing seeds of *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 53: 437-449
- Mubarakshina, M.M; Ivanov, B.N.; Naydov, I.A.; Hillier, W.; Badger, M.R. and Krieger-Liszkay, A.(2010). Production and diffusion of chloroplastic and its implication to signaling. *J. Exp. Bot.*, 61: 3577–3587
- Mullineaux, P. and Karpinski S. (2002). Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 43–48
- Pollard, M. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci*, 13: 236-246
- 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. *The Plant Cell*, 17: 2966–2980
- Prieto-Dapena, P.; Castaño, R.; Almoguera, C. and Jordano, J. (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.*, 142: 1102–1112
- Rajjou, L. and Debeaujon, I. (2008). Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C.R. Biologies*, 331: 796-805
- Rajjou, L.; Lovigny, Y.; Groot, S.P.C.; Belghazi, M.; Job, C. and Job, D. (2008). Proteome-wide characterization of seed aging in *Arabidopsis*. A comparison between artificial and natural aging protocols. *PlantPhysiol*. PMID: 18599647
- Rausher, M.D. (2006). The evolution of flavonoids and their genes. *The Science of Flavonoids* (Groteworld, E., ed.) pp. 175-211, Springer
- Routaboul, J-M.;Kerhoas, L.; Debeaujon, I.; Pourcel, L.; Caboche, M.; Einhorn, J. and Lepiniec, L. (2006). Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 224: 96-107
- Saito, K.; Yonekura-Sakakibara, K.; Nakabayashi, R.; Higashi, Y.; Yamazaki, M.; Tohge, T. and Fernie, A. R. (2013). The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity.*Plant Physiology and Biochemistry*, 72: 21-34
- Sallon, S.; Solowey, E.; Cohen, Y.; Korchinsky, R.; Egli, M. and Woodhatch, I. (2008). Germination, genetics, and growth of ancient date seed. *Science* 320: 1464
- Sano, N.; Rajjou, L.; North, H.M.; Debeaujon, I.; Marion-Poll, A. and Seo, M. (2015). Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. *Plant and Cell Physiology*, 0(0): 1-15
- Sattler, S.E.; Gilliland, L.U.; Magallanes-Lundback, M.; Pollard, M. and DellaPenna, D. (2004). Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell*, 16: 1419–1432.

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

Veit, M. and Pauli, G.F. (1999). Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Nat Prod*, 62: 1301-1303

Walters, C.; Wheeler, L.M. and Grotenhuis, J.M. (2005). Longevity of seeds stored in gene bank: species characteristics. *Seed Sci. Res.* 15: 1–20

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5: 218-223

Wisman, E.; Hartmann, U.; Sagasser, M.; Baumann, E.; Palme, K.; Hahlbrock, K.; Saedler, H. and Weisshaar, B. (1998). Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95: 12432-12437

Wu, X.; Liu, H.; Wang, W.; Chen, S.; Hu, X. and Li, C. (2011). Proteomic analysis of seed viability in maize. *Acta Physiol. Plant.*, 33: 181–191