

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**Papel de EARLY BOLTING IN
SHORT DAYS (EBS) en la regulación
de la dormición de semillas en
*Arabidopsis thaliana***



Tesis Doctoral
Laura Narro Diego
Madrid, 2014

Universidad autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología



**Papel de EARLY BOLTING IN
SHORT DAYS (EBS) en la regulación
de la dormición de semillas en
*Arabidopsis thaliana***

Tesis Doctoral
Laura Narro Diego
Madrid, 2014

Universidad autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

**Papel de EARLY BOLTING IN
SHORT DAYS (EBS) en la regulación
de la dormición de semillas en
*Arabidopsis thaliana***

Memoria presentada por Laura Narro Diego para optar al grado de Doctora por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Trabajo realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria (INIA) bajo la dirección de los Doctores Manuel Angel Piñeiro Galvín y José Antonio Jarillo Quiroga.

VºBº de los Directores

VºBº del Tutor

Doctoranda

M.A. PIÑEIRO

J.A. JARILLO

L.E. HERNÁNDEZ

L. NARRO

Tesis Doctoral
Laura Narro Diego
Madrid, 2014

A mis padres

Agradecimientos

Por fin ha llegado este momento. En primer lugar quiero agradecer a las personas que han colaborado en la realización de esta Tesis.

Gracias a mis Directores de Tesis, Manolo y Jose, por darme la oportunidad de hacer el Doctorado con ellos, y por tener siempre la puerta del despacho abierta, dispuestos a echar una mano. Gracias especialmente a Manolo, por su paciencia y por volverse loco conmigo mirando datos de ensayos repetidos una y otra vez, y otra vez hasta encontrar el sentido que estaba ahí y que yo no veía.

Gracias a Leti, Ana e Iván, por enseñármelo todo en el laboratorio; a Alfon, por su inestimable ayuda; a Pedro, por su ayuda en la realización del ChIP con semillas; a Regla, por su ayuda con el tratamiento de datos (y su documento ebs-shl-spt Laura-Leti-Regla; sin él todo hubiera sido mucho más difícil).

Han sido años de mucho trabajo, consiguiendo varios records, entre ellos el de tener 54 bandejas de plantas en crecimiento al mismo tiempo. Pero también ha habido grandes buenos momentos. Nunca olvidaré las comidas, cumpleaños, picnics, los momentos RAE en el labo (con grandes momentos como “semá-foro” o “a-tlán-ti-co” ¡Que me aspen!), los días de patines con Leti, Ana y sus amigos, las cañas, mi temporada de mala suerte, con las grandes soluciones de Zami y Elena, el día que montamos el tablao flamenco con Ana, Sara y los demás, las charlas sobre *política*, mi “gusano de secuencias”, los chistes intra-labo (aseregel, el baile del oligo...).

Durante este periodo de mi vida he compartido muchas cosas con gente que siempre recordaré. A los compañeros de nuestro querido Edificio Z, con Bruno, Karina, Tamara, Jesús, Marga, Mariano, Gema... y las “niñas del Z”. A David S., Dorota, Pedro, Eugenio, David C., Julieta, Bárbara, Mercedes, Alberto, Silva, Juan Carlos, Rosa, Regla, Mónica, Mar y todos los demás, siempre dispuestos a celebrar algo, a debatir sobre algo o a echar unas risas en los desayunos y comidas. A Silvia, con nuestros paseos por la calle de la Cruz y las fiestas con Rafa, Iñaki y Carlos. A Nacho, y su preocupación por mi vida sentimental. A Gema, ejemplo a seguir: tres niñas, patentes a la vista y sin olvidar su vida social. A Pablo, sus cánticos y sus conversaciones en català. A Zami, que a pesar de ser tan diferentes, pensamos tan parecido, y a sus niñas, encantadas de ayudarme a recoger silicuas. A Elena, con su creatividad y haciéndonos llorar de risa con las historias de sus niños. A Sara, con su sonrisa siempre presente y sus ojos brillantes. A Ruth, con sus mensajes positivos y sus fotos; tenemos un concierto pendiente! A Conchi, gracias por tu amistad, tus

consejos, y por los momentos Lost, gym y la despedida en la estación de autobuses el día que me fui de Madrid. A mi Sandri, por los momentos Zipi y Zape; gracias por tu complicidad, positividad, amistad y por entenderme siempre tan bien. Y por fin a amparitos y pichoncines: a Iván, el más cariñoso de labo, con sus explicaciones, compartiendo eSeCeLebraciones y siempre liado con una historia; a Angelita, la más folckórica del labo, con su energía, corriendo juntas por los montes de mi tierra como locas; a Ana, la más organizada del labo, reina de las listas (sin ellas hubiera sido un caos), siempre aportando la respuesta más racional, gracias por escucharme y por preocuparte por mí siempre; a Alfon, el más bueno del labo, por sus conversaciones, por los viajes en coche, por las cenas cuando salíamos a las mil de labo, felices como lombrices; a Leti, la más alta del labo (entre otros “la más”), gracias por tu amistad, por ejercer de hermana mayor y por estar siempre pendiente, en los buenos y en los malos momentos.

Mis amigos de fuera también fueron muy importantes en este tiempo. Gracias a mi familia de Madrid, mis sisters, Myriam y Emma, por tan buenos momentos en el mejor piso de Madrid. Gracias a mis amigos agrícolas, por continuar con las agroquedadas a pesar de las complicaciones de cada uno; en especial a Jorge, por leerme mi Tesis. Gracias a M^a José, por preocuparte por mí desde cualquier punto del mundo. Gracias a Cristi, por preocuparte cada día por mí, y a Ana y Eva, por estar siempre ahí; gracias a las tres por transmitirme vuestra positividad y por los grandes momentos en Cantabria y en Madrid.

Y como no, a mi familia. Gracias a mis padres, por las llamadas diarias, por darme una base sólida en mi vida a la que siempre poder volver, por apoyarme siempre y ayudarme con todos mis proyectos. ¡Ya puedo ser quiosquera! Gracias a mis abuelos Lali y Zique, por ser mis segundos padres, y por cuidarme durante toda mi vida. Gracias a mi abuela Juliana por preocuparse tanto por mí. Gracias a Marta, por entenderme solo con un gesto, y a Eric, por sus asesoramientos varios; gracias a los dos por estar siempre ahí y sobre todo gracias por darme lo que más quiero en esta vida, a Emma. Gracias a Carlos, por la carta que enviaste hablando de mí a un concurso de televisión; a ti y a Stanka por las pelis, juegos, calçotadas y soluciones informáticas. Gracias a mis tíos y primos, por las Navidades, los fines de año, los gritos de buenos deseos por el balcón, los acertijos recurrentes, los San Juanes, las vacaciones, las comidas de los sábados (antiguos domingos de paella), por las vendimias... y por preguntarme siempre por la tesis ¡Por fin ya está aquí!

¡¡¡Gracias, gracias, gracias!!! A todos os llevo en el corazón.

“¡Hip hip por los viejos tiempos! ¡Hurra por lo que vendrá!” (González, Q., 2009).

Abreviaturas y siglas	6
Summary	7
INTRODUCCIÓN	
1. La dormición de las semillas es un mecanismo clave para la supervivencia de las especies vegetales.	12
1.1 Clasificación de la dormición.	14
1.2 Maduración y establecimiento de la dormición de semillas en Arabidopsis.	16
1.2.1 Control de la dormición por la testa.	18
1.2.2 Control de la dormición por el endospermo.	19
1.2.3 Control de la dormición por el embrión	19
2. Mecanismos moleculares que participan en la regulación de la dormición de la semilla.	20
2.1 Regulación de la inducción de la dormición de la semilla.	20
2.1.1 Redes transcripcionales implicadas en la maduración de la semilla.	20
2.1.2 Inducción y mantenimiento de la dormición dependiente de hormonas: papel del ABA.	22
2.1.2.1 Regulación de la inducción de la dormición por ABA.	22
2.1.2.2 Papel de la señalización de ABA en la regulación de la dormición.	23
2.1.3 Papel de la señalización de GAs mediada por las proteínas DELLA en la dormición de semillas.	26
2.2 Mecanismos moleculares que median la salida de dormición de la semilla.	28
2.2.1 Cambios de expresión génica median la salida de dormición de la semilla.	29
2.2.2 Función de diferentes hormonas en la salida de la dormición.	31
2.2.2.1 Degradación de ABA.	31
2.2.2.2 Biosíntesis y señalización de GAs.	32
2.2.2.3 Auxinas.	35
2.2.2.4 Etileno.	35
2.2.3 El óxido nítrico (NO) funciona como molécula señalizadora en la liberación de la dormición de semillas.	36
2.2.4 Papel regulador de ROS en la germinación y dormición de semillas.	37
3. Regulación de la dormición por factores ambientales y el reloj circadiano.	37
3.1 Efecto de la temperatura en la dormición de la semilla.	38
3.2 Efecto de la luz en regulación de la dormición.	41

ÍNDICE

3.3	Efecto de los compuestos nitrogenados en la inducción de la dormición.	43
3.4	La participación del reloj circadiano en mediar el efecto de factores ambientales en el control de la dormición.	43
4.	Control de la dormición por la modificación en la cromatina.	44
4.1	Efecto de modificaciones de la cromatina que facilitan la transcripción sobre la dormición de la semilla.	47
4.2	Papel de la Metilación/Demetilación de histonas en la dormición de semillas.	49
4.3	La acetilación de histonas en el control de la dormición de la semilla.	52
5.	Antecedentes.	55
OBJETIVOS		59
MATERIAL Y MÉTODOS		
1.	Material vegetal.	63
1.1	Generación de líneas dobles mutantes.	64
2.	Condiciones de cultivo.	64
3.	Análisis fenotípicos.	65
3.1	Ensayos de dormición de semillas.	65
3.2	Medida del tiempo de floración.	67
3.3	Ensayos relacionados con la respuesta a hormonas.	67
3.3.1	Ensayos de respuesta de la expresión de <i>EBS</i> a hormonas.	67
3.3.2	Ensayos de dormición en respuesta a hormonas y a PAC.	67
3.4	Ensayos fenotípicos y de expresión con líneas de sobreexpresión inducibles mediante tratamientos con β -estradiol.	68
4.	Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal.	68
5.	Técnicas de clonación y manipulación de ácidos nucleicos.	70
5.1	Clonación por Tecnología Gateway (GW).	70
5.2	Obtención de las construcciones plasmídicas utilizadas.	71
5.3	Transformación genética de plásmidos de interés en cepas bacterianas.	72
5.4	Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.	72
6.	Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.	72
7.	Métodos histoquímicos.	73
7.1	Ensayos histoquímicos para la visualización de β -glucuronidasa.	73
7.2	Tinción con rojo de rutenio.	73
8.	Análisis de expresión.	73
8.1	Extracción de RNA.	73
8.1.1	Extracción de RNA de semillas de <i>Arabidopsis</i> .	73

8.1.2	Extracción de RNA de plántulas de Arabidopsis.	74
8.2	Cuantificación y análisis de RNA.	74
8.2.1	Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	75
8.2.1.1	Cuantificación por RT-PCR e hibridación con sondas específicas.	75
8.2.1.2	Cuantificación por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).	75
8.3	Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.	77
8.4	Análisis transcriptómico global de semillas de mutantes <i>ebs</i> y <i>spt-10</i> .	77
9.	Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	78

RESULTADOS

1.	Caracterización del papel del gen EBS en el control de la dormición de semillas en Arabidopsis.	83
1.1	Análisis de la expresión de <i>EBS</i> en semillas de Arabidopsis.	83
1.2	Interacción entre <i>EBS</i> y factores ambientales en el control de la dormición de la semilla.	86
1.3	Efecto de la sobreexpresión de <i>EBS</i> sobre la dormición de la semilla.	89
1.3.1	Sobreexpresión constitutiva de <i>EBS</i> .	89
1.3.2	Sobreexpresión inducible de <i>EBS</i> .	93
2.	Papel del gen <i>SHL</i>, un homólogo de <i>EBS</i>, en el control de la dormición en Arabidopsis.	97
3.	Interacción de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> con hormonas implicadas en la regulación del proceso de la dormición de la semilla.	99
4.	Función de <i>EBS</i> y <i>SHL</i> en la regulación del desarrollo de la cubierta de la semilla.	100
5.	Análisis molecular de la función desempeñada por <i>EBS</i> en el control de la dormición de la semilla.	102
5.1	Identificación mediante análisis transcriptómicos globales de genes controlados por los reguladores transcripcionales <i>EBS</i> y <i>SPT</i> durante la dormición de la semilla.	102
5.1.1	<i>EBS</i> actúa sobre circuitos reguladores diferentes durante la imbibición de la semilla y el desarrollo vegetativo.	110
5.1.2	Diversos genes implicados en la regulación de la dormición y la germinación de semillas se encuentran desregulados en los mutantes <i>ebs</i> y <i>spt</i> .	111
5.1.3	Confirmación mediante q-PCR de las alteraciones transcripcionales observadas en los perfiles globales de expresión en semillas de los mutantes <i>ebs</i> y <i>spt</i> .	117
5.2	Análisis de los cambios de expresión en genes desregulados en el mutante <i>ebs</i> durante el proceso de germinación.	118
5.3	Efecto de mutaciones en <i>SHL</i> sobre la expresión de genes expresados diferencialmente en el mutante <i>ebs</i> .	120
5.4	Estudio de la posible implicación de los genes expresados	121

	diferencialmente en el mutante <i>ebs</i> en la regulación de la dormición mediada por <i>EBS</i> .	
5.4.1	Caracterización del fenotipo de dormición en semillas frescas de mutantes <i>agp31</i> .	123
5.4.2	Caracterización del fenotipo de dormición observado en semillas frescas de mutantes <i>sc14</i> .	124
5.4.3	Análisis de la interacción genética entre <i>EBS</i> y <i>RGL2</i> en el control de la dormición de semillas.	126
5.4.4	Caracterización del fenotipo de dormición en semillas frescas de los mutantes <i>flc</i> y <i>ft</i> .	126
5.4.5	Análisis de la posible interacción genética entre <i>EBS</i> y <i>AGL67</i> en el control de la dormición.	128
6.	Análisis de la posible interacción con <i>EBS</i> con otros factores remodeladores de cromatina en la regulación de la dormición.	134
6.1	Relación funcional de <i>EBS</i> con los genes <i>HUB1</i> y <i>HUB2</i> , implicados en la monoubiquitinación de la histona H2B.	135
6.1.1	Interacción de <i>EBS</i> con los genes <i>HUB1/2</i> en la regulación de la dormición.	135
6.1.2	Análisis de la interacción de <i>EBS</i> con <i>HUB1/2</i> en la regulación de la floración.	139
6.2	Implicación del complejo PAF1 en el control de la dormición.	140
6.3	Relación funcional de <i>EBS</i> con genes implicados en la metilación de histonas en el proceso de dormición.	140
6.3.1	Análisis de la interacción genética de <i>EBS</i> con <i>ATXR7</i> en el control de la dormición.	140
6.3.2	Análisis de la interacción genética de <i>EBS</i> con <i>ATXR7</i> en el control de la floración.	144
6.3.3	Participación de la metiltransferasa de histonas <i>SDG8</i> en la regulación de la dormición de semillas.	145
6.4	Análisis del posible papel de otros complejos remodeladores de cromatina en la regulación de la dormición.	148
6.4.1	Análisis del papel de <i>SWR1-C</i> en la regulación de la dormición de semillas.	148
6.4.2	Análisis del posible papel en dormición de <i>ELF6</i> Y <i>JMJ4</i> , otros remodeladores de la cromatina relacionados con <i>EBS</i> .	149
7.	Identificación de otros reguladores transcripcionales que podrían participar en la regulación de la dormición.	150
7.1	Diseño y optimización del procedimiento de identificación de reguladores transcripcionales implicados en el control de la dormición de semillas.	151
7.2	Identificación de líneas de la colección <i>TRANSPLANTA</i> con respuesta alterada durante la dormición de la semilla.	154
7.3	Aproximación a la caracterización funcional de <i>COL9</i> , cuya sobreexpresión inducible provoca una reducción de la dormición.	156

7.4	Aproximación a la caracterización funcional de <i>SCL30</i> , cuya sobreexpresión inducible provoca un aumento de la dormición.	160
	DISCUSIÓN	165
	CONCLUSIONES	189
	BIBLIOGRAFÍA	193
	ANEXO I	219
	ANEXO II	227
	ANEXO III	239

Abreviaturas y siglas

ABA	Ácido abscísico
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
GA	Giberelina
GM	Growth medium.
DDI	Días después de imbibición
DDP	Días después de polinización
DDS	Días después de siembra
DF	Dormición fisiológica
DI	Dormición física
DM	Dormición morfológica
DMF	Dormición morfofisiológica
DTT	Ditiotreitol
E	Estratificación
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetraacético
Est	B-estradiol
GAs	Giberelinas
GUS	β-D-glucuronidase.
Kb	Kilobase
LB	Luz blanca
LR	Luz roja
μE m-2 s-1	μEinsteins m-2 s-1.
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid.
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog.
NASC	Nottingham Arabidopsis Centre.
NCBI	Nacional Center of Biotechnology Information.
OSC	Oscuridad
PAC	Paclbutrazol
p/v	Peso/volumen.
pb	Pares de bases.
PBS	Phosphate buffered saline.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic) acid.
PM	Post-maduración
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride.
r.p.m	revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa
TBE	Tris/Borato/EDTA.
T-DNA	DNA de transferencia
TE	Tris-EDTA pH 8
Tris	Trihidrometil aminometano
UTR	Unstranlated Region.
v/v	volumen/volumen.

Summary

Our laboratory is interested in understanding the role of chromatin remodelling in the control of plant developmental processes. In particular, we are focused in the analysis of a plant-specific family of nuclear proteins characterised for containing a BAH and a PHD domain, two types of motifs present in chromatin remodelling factors. Our previous results indicate that the two members of this family in Arabidopsis, EARLY BOLTING IN SHORT DAYS (EBS) and SHORT LIFE (SHL), have independent roles in the repression of flowering and are required to maintain an inactive chromatin conformation in their target loci. Besides their role in flowering time, these proteins participate in the control of other developmental transitions. EBS has a role in the regulation of seed dormancy, as shown by the reduced latency phenotype of *ebs* mutant seeds, suggesting that this PHD-containing protein participates in the repression of germination during the seed dormancy period. Moreover, our seed dormancy analyses performed under different light conditions and in response to hormones involved in the control of seed germination (abscisic acid, ABA, and gibberellic acid, GA) indicate that *SHL* has a redundant function with *EBS* in dormancy regulation in Arabidopsis. To understand the role of EBS in the modulation of this developmental process, we have performed a transcriptomic approach. We will present data concerning the misregulation observed in the gene expression profiles of freshly harvested *ebs* mutant seeds, which are consistent with an essential role for EBS in the transcriptional regulation of central genes in the control of seed dormancy. Progress in understanding the role of some of the genes misregulated in the *ebs* mutant during the period of seed dormancy will be also presented. In addition, the genetic interactions of *EBS* with other genes encoding chromatin remodelling factors involved in the regulation of seed dormancy will be also discussed. These data highlight the essential role of chromatin remodelling processes in establishing the duration of the dormancy period that precedes seed germination.

INTRODUCCIÓN



La semilla es el óvulo transformado y maduro que se produce tras el proceso de fecundación. Contiene el embrión, rodeado por el endospermo y por una cubierta de protección llamada testa (Recasens y Conesa, 2009) (Figura 1). La función de la semilla es esencial para la reproducción de las especies vegetales, ya que es responsable de su multiplicación y perpetuación. Además, la semilla permite que el embrión maduro sobreviva el periodo que va desde que la semilla se separa de la planta madre hasta que se establece como una nueva plántula capaz de generar los recursos necesarios para su crecimiento y desarrollo tras la germinación. La estructura de la semilla está relacionada con esta función de supervivencia del embrión, y por ello es resistente a la desecación, contiene reservas nutritivas almacenadas para la plántula en desarrollo, y es capaz de controlar el momento de la germinación en respuesta a factores endógenos y medioambientales, con el fin de optimizar su supervivencia.

Las semillas representan un componente esencial de la alimentación tanto humana como animal, constituyendo la principal fuente calórica en la dieta mundial. Entre todas las semillas, las de cereales suponen alrededor del 90% de todas las cultivadas (Bewley, 1997). Se estima que en el año 2050 será necesario producir un 70–100% más de alimentos para satisfacer la demanda alimentaria de una creciente población mundial, sin apenas poder aumentar la superficie cultivable y en un escenario de cambio climático que podría afectar de forma negativa la producción de cultivos a escala planetaria (Godfray et al., 2010). Un conocimiento preciso de los mecanismos que controlan el desarrollo y la germinación de las semillas puede contribuir a asegurar la producción de alimentos y productos agrarios necesarios para satisfacer las demandas de la población mundial.

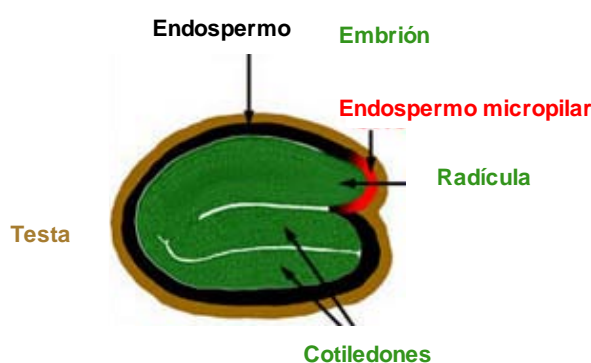


Figura 1. Esquema de la estructura de la semilla de *Arabidopsis thaliana* (adaptado de Müller et al, 2006).

1. La dormición de las semillas es un mecanismo clave para la supervivencia de las especies vegetales.

Las plantas son organismos sésiles, y no tienen la capacidad de desplazarse para evitar la exposición a condiciones ambientales adversas. Por ello, han desarrollado otras estrategias adaptativas para sobrevivir en un ambiente cambiante. Una estrategia esencial para la supervivencia es el desarrollo de la dormición de las semillas, proceso que permite la parada del crecimiento en respuesta tanto a factores endógenos como ambientales. La dormición consiste en la ausencia de germinación de una semilla intacta y viable para completar la germinación, aún en condiciones ambientales favorables (Bewley, 1997). Es una propiedad innata de la semilla, producida por diversos mecanismos de bloqueo intrínsecos que evitan la germinación durante condiciones ambientales favorables temporales en una estación desfavorable. Para que la semilla pueda germinar, deben eliminarse estos mecanismos de bloqueo en un proceso conocido como la rotura de la dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

En plantas silvestres, la dormición es un mecanismo beneficioso, que asegura la supervivencia de las especies impidiendo la germinación fuera de estación o disminuyendo la competencia entre individuos de la misma especie (Finkelstein et al., 2008). Las especies vegetales germinan en el momento óptimo para que la planta pueda establecerse y completar su ciclo vital. En el campo, las semillas pueden presentar emergencia otoñal-invernal o emergencia primaveral (Recasens y Conesa, 2009), según su ciclo vital. La combinación de la dormición/germinación de la semilla y del tiempo de floración de la planta determina su ciclo biológico. Ambas son transiciones importantes para el desarrollo de la planta y requieren una precisa percepción y una correcta respuesta a los cambios ambientales, lo que permite adecuar el desarrollo de la planta a condiciones apropiadas de crecimiento. Por todo ello, la dormición es un carácter adaptativo esencial para la supervivencia de especies vegetales, que optimiza la distribución de la germinación en el tiempo para asegurar un buen establecimiento de las nuevas generaciones de plantas.

En cultivos agrícolas, la dormición de las semillas ha sido tradicionalmente una característica no deseable ya que el retraso de la germinación tras la siembra compromete la supervivencia de la semilla en el suelo y disminuye su capacidad de competir con otras especies presentes en su entorno, lo que tiene consecuencias negativas sobre el rendimiento de los cultivos. Por este motivo, durante la domesticación de las especies agrícolas se han ido seleccionando variedades con

niveles bajos de dormición de la semilla. Por ello, la mayoría de plantas cultivadas germinan de forma rápida y uniforme después de la siembra, a diferencia de lo que ocurre con sus antepasados silvestres (Kilian et al., 2009). Sin embargo, la eliminación total de la dormición no es deseable, ya que entonces se favorecería que la semilla germine cuando aún esté en la planta madre, un fenómeno conocido como viviparismo o “germinación precosecha” (del inglés pre-harvest sprouting) (Gubler et al., 2005), y que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas, particularmente en cultivos de cereales (Bewley, 1997; Gubler et al., 2005). Por tanto, las semillas de los cultivos requieren un nivel adecuado de dormición (Graeber et al., 2012), y tanto la precocidad en la germinación (durante la maduración en la planta o durante el almacenamiento posterior), como la dormición profunda de las semillas después de la cosecha, son serios problemas para el sector agrícola e industrial. Por este motivo, un conocimiento profundo de los mecanismos que modulan el nivel de dormición de la semilla y cómo estos responden a las condiciones medioambientales no sólo tiene una gran relevancia fundamental, sino también un gran potencial biotecnológico. Este conocimiento puede permitir la manipulación de este proceso de desarrollo para optimizar el rendimiento de los cultivos, así como contribuir a desarrollar marcadores con capacidad de predecir el nivel de dormición de las semillas (Gubler et al., 2005).

La adquisición de la dormición de la semilla se inicia durante la maduración de ésta en la planta madre, y su profundidad dependerá de las condiciones ambientales durante su formación (Donohue, 2005; Finkelstein et al., 2008; Holdsworth et al., 2008). La salida de dormición depende de factores genéticos, factores endógenos (como fitohormonas), y factores ambientales (como la luz, la temperatura y el tiempo de almacenamiento) (Finkelstein et al., 2008; Holdsworth et al., 2008; Bentsink y Koornneef, 2008). Ninguno de estos factores ambientales constituye un requerimiento absoluto para la germinación, ya que la necesidad de un factor depende del resto de factores, y la necesidad de cada uno de ellos depende del genotipo (Bentsink y Koornneef, 2008). Cada uno de estos factores elimina mecanismos de bloqueo sucesivos de la germinación, pero generalmente este proceso debe llevarse a cabo en un orden establecido para que funcione adecuadamente (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La exposición a un sólo factor o a una incorrecta combinación de factores resulta en diferentes niveles de dormición.

En el campo, una vez que la semilla está en el suelo, determinados factores ambientales relacionados con cambios estacionales lentos como la temperatura, constituyen señales informativas sobre cuál puede ser el momento del año adecuado para germinar, lo que se ha definido como ventana temporal de la germinación (Footitt

INTRODUCCIÓN

et al., 2011). Estas señales son percibidas por la semilla, alterando la sensibilidad a un segundo grupo de factores ambientales relacionados con cambios estacionales rápidos, como la humedad, la luz, los niveles de nitrato en el medio y la alternancia de temperaturas, que determinan una ventana espacial de la germinación (Footitt et al., 2011). Esta ventana espacial está relacionada con una respuesta rápida a la adecuación de las condiciones locales para la germinación y el establecimiento (Footitt et al., 2013). Si no se produce la ventana espacial de germinación correcta, la ventana temporal de germinación se cierra hasta el siguiente año (Footitt et al., 2011).

1.1 Clasificación de la dormición.

La dormición se ha clasificado según su origen, es decir, si la inhibición de la germinación se produce por causas morfológicas, fisiológicas y/o físicas, en cinco tipos: fisiológica (DF), morfológica (DM), morfofisiológica (DMF), física (DI) y combinatoria (DI+DF) (Nikolaeva, 1967; Baskin y Baskin, 1998, 2004).

La DF es el tipo más abundante en semillas de plantas gimnospermas y de la mayoría de angiospermas, por lo que es el tipo de dormición más estudiado. Estos estudios muestran que los mecanismos moleculares intrínsecos que determinan la dormición pueden tener un componente embrionario y/o de la cubierta (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997; Kucera et al., 2005; Hilhorst, 2007) que determinan la profundidad de la dormición de la semilla (Kucera et al., 2005; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Bentsink y Koornneef, 2008; Holdsworth et al. 2008). La DF se puede clasificar en 3 niveles: profunda, intermedia y no profunda (Baskin y Baskin, 2004). Las semillas con DF profunda tienen dormición impuesta por el embrión, en la que éste es incapaz de germinar aún en presencia de giberelinas (GA), hormonas que promueven la germinación. Estas semillas necesitan varios meses de estratificación en frío o en presencia de calor para germinar. Un ejemplo serían las semillas de la especie *Acer platanoides*. En la DF intermedia, las semillas necesitan periodos más cortos de calor o de frío para romper la dormición. Un ejemplo de semillas con este tipo de dormición serían las de la especie *Acer pseudoplatanus*. Sin embargo, la mayoría de las semillas presentan DF no profunda. En este tipo de semillas, cuando separamos el embrión del resto de la semilla, se desarrollan plántulas con normalidad. Un ejemplo de semillas con este tipo de dormición son las de *Arabidopsis thaliana*, en las que los embriones extirpados de semillas durmientes (por ejemplo del ecotipo Cabo Verde Islands, Cvi) o de mutantes insensibles o deficientes en GAs, son capaces de germinar (Bethke et al.,

INTRODUCCIÓN

La DM se produce en semillas con embriones diferenciados pero todavía no desarrollados. Estos no presentan DF, pero necesitan tiempo para crecer y germinar. Un ejemplo de semillas que presentan este tipo de dormición son las de la especie *Apium graveolens* (apio). La DMF también está presente en embriones poco desarrollados, que además presentan un componente fisiológico de dormición. Requieren un tratamiento para romper la dormición, como la estratificación o la aplicación de GAs. Por su parte, la DI está causada por cubiertas impermeables al agua constituidas por células de empalizada de las semillas, que controlan los movimientos del agua. Se requieren escarificación mecánica o química para romper la dormición. Un ejemplo de este tipo de especies es *Ceratonia siliqua* (algarrobo). La dormición combinada (DI+DF) se encuentra en semillas con cubiertas impermeables al agua, combinadas con dormición fisiológica del embrión, como por ejemplo las de las especies de *Geranium* y *Trifolium*.

En este trabajo de Tesis Doctoral nos hemos centrado en la caracterización de mecanismos que regulan la dormición primaria en *Arabidopsis thaliana*, cuyas semillas presentan DF no profunda. Por ello, a continuación discutiremos este aspecto concreto de la dormición de las semillas.

1.2 Maduración y establecimiento de la dormición de semillas en Arabidopsis.

El desarrollo de la semilla de *Arabidopsis* se inicia tras la fecundación y se prolonga durante 18-21 días, en condiciones normales de invernadero (Parcy et al., 1994; Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005; Le et al., 2010). El embrión atraviesa por diversos estadios, en los que su volumen va aumentando, mientras que el del endospermo va disminuyendo, hasta formar una única capa de células (Raz et al., 2001). Finalmente, se produce una parada del crecimiento del embrión por el cese de la división celular (Raz et al., 2001), y se inicia la maduración de la semilla. Este proceso de maduración se caracteriza por la acumulación de reservas nutricionales, la parada del crecimiento de tejidos y del desarrollo, la inducción de la dormición primaria y, finalmente, el desarrollo de la tolerancia a la desecación y la propia desecación, después de la cual el embrión entra en un estado quiescente que le permite sobrevivir hasta que las condiciones sean adecuadas para la germinación (Koornneef y Karssen, 1994; Raz et al., 2001; Bentsink et al., 2007; Gutierrez et al., 2007; Zhang y Ogas, 2009). El final de la maduración se caracteriza por la disminución de las actividades metabólicas, incluyendo la transcripción de genes (Comai y Harada, 1990), lo que lleva a la semilla a mostrar una insensibilidad temporal a señales que promueven su

desarrollo (Graeber et al., 2012). De esta forma, el embrión puede resistir hasta que las condiciones sean favorables.

La dormición de la semilla es un carácter que depende de una combinación de factores ambientales y endógenos. Además, los distintos tejidos que componen la semilla contribuyen a establecer su nivel final de dormición. La germinación supone la salida de la radícula a través de las dos capas que envuelven al embrión (endospermo y testa). En el caso de *Arabidopsis*, la germinación se produce en dos etapas, la elongación de la radícula, rompiendo la testa, y la rotura del endospermo en el extremo micropilar de la semilla (Middleton et al., 2008) (Figura 3). La rotura del endospermo y de la testa son eventos separados y sólo el primero de ellos es inhibido por la hormona ácido abscísico (ABA) en semillas maduras en *Arabidopsis*. En esta especie, la testa y el endospermo oponen resistencia (mecánica y/o química) a la germinación, que durante la DF no profunda es mayor que el potencial de crecimiento del embrión (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997; Koornneef et al., 2002; Leubner-Metzger, 2003; Kucera et al., 2006; Hilhorst et al., 2010). En la actualidad se desconoce si los genes implicados en dormición afectan sólo al embrión, al endospermo, o a la testa, o si afectan a una combinación de los tres componentes (Hilhorst et al., 2010). La luz y las GAs parecen ser los factores que liberarían a la semilla de la dormición impuesta por las cubiertas (Leubner-Metzger, 2001; Sanchez y Mella, 2004; Kucera et al., 2005).

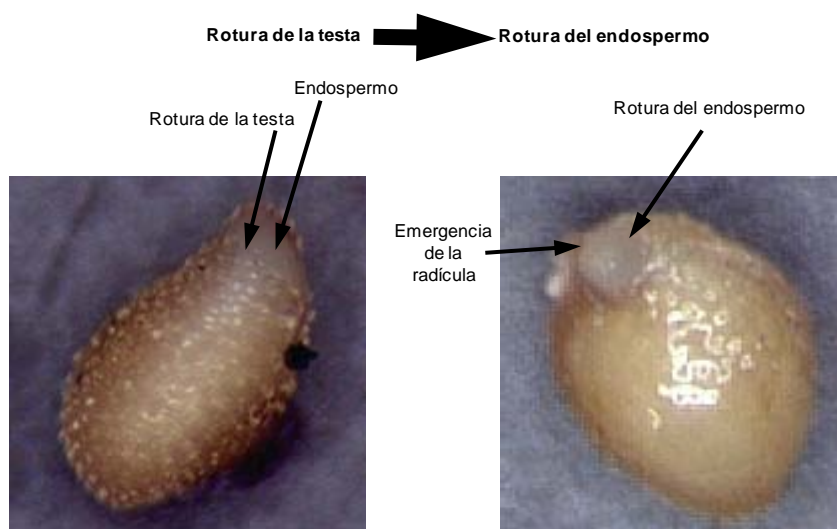


Figura 3. La germinación en *Arabidopsis* se produce en dos pasos consecutivos. Secuencia de eventos en la germinación de una semilla de *Arabidopsis*, mostrando la rotura de la testa y la posterior rotura del endospermo.

1.2.1 Control de la dormición por la testa.

La testa es la cubierta más externa de la semilla y está constituida por tejido materno muerto, que procede de los integumentos del óvulo (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La testa restringe el crecimiento de la radícula y protege al embrión de daños ambientales. Se cree que la rotura de la testa puede producirse de dos formas: mediante la producción de enzimas por el endospermo y/o la radícula, que permitirían debilitar las cubiertas, o por la presencia de puntos de rotura predeterminados en las cubiertas, para facilitar la rasgadura de los tejidos (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Hilhorst et al., 2010). La estructura y la pigmentación de la testa afectan a la dormición y a la longevidad de la semilla en muchas especies, incluida *Arabidopsis* (Debeaujon et al., 2000). Así, la semilla madura presenta una testa marrón, cuyos pigmentos se producen al final del desarrollo de la semilla, y un embrión amarillento (Koornneef y Karssen, 1994). La capa celular interior del integumento interior contiene pigmentos de color marrón (Bouman, 1975). La capa exterior de la testa contiene el mucílago, sustancia pectínica, principalmente compuesta de ramnogalacturonano y celulosa, organizada en una capa exterior soluble al agua y una capa interior unida covalentemente a la testa por microfibrillas de celulosa (Macquet et al., 2007). El mucílago es liberado durante la imbibición de la semilla, cuando la pared celular exterior se rompe (Koornneef y Karssen, 1994). Se ha propuesto que el mucílago podría permitir la adherencia a superficies o animales para su dispersión y contribuye a la germinación en ambientes con estrés osmótico o salino, ya que es hidrofílico y retrasa la pérdida de agua (Weitbrecht et al., 2011). Los pigmentos de la semilla difieren según la especie, pero principalmente son compuestos fenólicos. En *Arabidopsis*, los principales pigmentos son proantocianidinas y flavonoles glicósidos (Debeaujon et al., 2007), presentes en la capa interior de la testa, llamada endotelio (Bentsink y Koornneef, 2008). Las proantocianidinas son polímeros que establecen enlaces con los componentes de la pared durante la maduración de la semilla, lo que provoca un engrosamiento de las capas celulares proporcionando una mayor resistencia mecánica y reduciendo la permeabilidad a agua, gases y hormonas (Finkelstein et al., 2008). Por otro lado, la naturaleza antioxidante de los flavonoides permite inhibir la degradación oxidativa de ABA (Debeaujon et al., 2007), favoreciendo la dormición de la semilla. Además estos pigmentos tienen función antimicrobiana y antiherbívora, y son un filtro para la luz UV que llega al embrión (Winkel-Shirley, 2002). Análisis de mutantes con defectos en la pigmentación o estructura de la testa muestran que estas características son necesarias para el correcto desarrollo de las semillas y para la dormición primaria (Holdsworth et al., 2008), ya que estos mutantes

presentan una reducción de la dormición (Flintham, 2000; McCabe et al., 2006; Debeaujon et al., 2007).

1.2.2 Control de la dormición por el endospermo.

El endospermo es un tejido vivo que actúa como una barrera física y química a la germinación, inhibiendo el crecimiento de la radícula (Middleton et al., 2008). La importancia del endospermo para impedir la germinación ha sido bien establecida en varias especies como tomate, tabaco y lechuga (Hilhorst y Karssen, 1992; Bewley, 1997; Kucera et al., 2005), donde se ha determinado que para que se produzca la germinación es necesaria la rotura del endospermo. En *Arabidopsis*, se ha propuesto que el endospermo es el factor principal que promueve la dormición de las semillas, ya que cuando se elimina la testa en semillas frescas durmientes, el endospermo impide la germinación (Bethke et al., 2007). Se ha observado que el endospermo durmiente produce y libera ABA para inhibir el crecimiento del embrión en la semilla embebida (Lee et al., 2010). Por otra parte, la disminución de la resistencia mecánica en el endospermo micropilar (la capa de endospermo que cubre la punta de la radícula) (Figura 1) parece ser un prerequisite para la salida de la radícula durante la germinación (Bewley, 1997, Kucera et al., 2005). Este debilitamiento puede estar promovido por GAs e inhibido por ABA (Müller et al., 2006; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), favoreciendo la degradación de las células del endospermo por enzimas hidrolíticas inducidas por estas hormonas producidas en el embrión. Este debilitamiento está asociado con la inducción de enzimas remodeladoras de la pared celular, como las expansinas (Kucera et al., 2005). Además se han identificado hidrolasas de polisacáridos de la pared celular y sustancias reactivas a oxígeno (ROS), que estarían implicadas en el debilitamiento del endospermo y en la liberación de la dormición de la semilla (Bailly, 2004; Oracz et al., 2007).

1.2.3 Control de la dormición por el embrión.

La dormición debida al embrión se caracteriza por un bloqueo intrínseco que inhibe el crecimiento de extensión y, por lo tanto, embriones separados del resto de la semilla, no germinan aún en ausencia de la oposición mecánica de las capas externas de la semilla (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Este tipo de control no se produciría en las semillas con DF no profunda.

2. Mecanismos moleculares que participan en la regulación de la dormición de la semilla.

La dormición de la semilla es un proceso del desarrollo vegetal cuya base molecular, a diferencia de lo que ocurre con otras transiciones de fase del desarrollo en plantas como la inducción de la floración o el desarrollo floral, permanece en gran medida desconocida. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un avance significativo en el conocimiento disponible acerca de los mecanismos moleculares implicados en el control de este proceso. El empleo de abordajes genéticos, genómicos y moleculares ha contribuido a desvelar algunos de los mecanismos de regulación de la dormición en *Arabidopsis*. De esa forma se han identificado genes y proteínas que controlan el proceso, así como otras moléculas reguladoras de la dormición. Entre ellos se incluyen moléculas de señalización, reguladores transcripcionales, fosfatasa o quinasas que regulan la actividad de los factores de transcripción modulando su estado de fosforilación, proteínas modificadoras de la actividad, estabilidad o localización de factores de transcripción mediante otras modificaciones, así como enzimas remodeladores de la pared celular que se expresan en el embrión y en el endospermo (Penfield et al., 2006). Asimismo, se han identificado proteínas implicadas en modular la homeostasis de hormonas (fundamentalmente ABA y GAs), en su reconocimiento específico o en la señalización en respuesta a su concentración (Middleton et al., 2008). Algunas de estas moléculas están asociadas a la inducción de la dormición, mientras que otras son necesarias para romper la dormición y facilitar el inicio de la germinación. A continuación discutimos algunos de los mecanismos moleculares más importantes implicados en ambos aspectos de la dormición de la semilla, centrándonos fundamentalmente en estudios realizados con la especie modelo *Arabidopsis*.

2.1 Regulación de la inducción de la dormición de la semilla.

2.1.1 Redes transcripcionales implicadas en la maduración de la semilla.

La semilla adquiere la dormición durante su fase de maduración, al mismo tiempo que se acumulan en ellas los compuestos de reserva, se desarrolla la tolerancia a la desecación y se alcanza el estado quiescente de actividad metabólica. Cuatro reguladores clave de estos procesos que tiene lugar durante la maduración son ABA-INSENSITIVE3 (ABI3), FUSCA3 (FUS3), LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) y LEC2 (Meinke et al., 1994; Raz et al., 2001). De hecho, los genes que codifican estas proteínas interactúan entre sí en una red que controla varios aspectos de la

maduración de la semilla (Bentsink y Koornneef, 2008). *ABI3*, *FUS3* y *LEC2* son factores de transcripción con un dominio B3 de unión a DNA (Giradaut et al.; 1992; Stone et al., 2001), mientras que *LEC1* codifica una subunidad de tipo HAP3 del factor de transcripción de unión a la secuencia CCAAT (CBF, también llamado NF-Y) (Lotan et al., 1998). Los mutantes *abi3*, *fus3*, *lec1* y *lec2* presentan alteraciones comunes entre sí que afectan a la maduración de la semilla, incluyendo una reducción en la dormición (Raz et al., 2001) y menor expresión de proteínas de almacenamiento (Gutiérrez et al., 2007). También presentan alteraciones específicas, como una menor sensibilidad al ABA (en *abi3* y en menor medida en *lec1*) e intolerancia a la desecación (en *abi3*, *fus3* y *lec1*), entre otras (Bentsink y Koornneef, 2008). Las proteínas *LEC2* y *FUS3* suprimen la biosíntesis de GA en el embrión en desarrollo, inhibiendo la expresión de *Ga3ox2* en la epidermis del eje embrionario (Curaba et al., 2004). Entre todos estos reguladores, *ABI3* parece tener un papel central en dormición (Bassel et al., 2006). De hecho, el estudio de ortólogos de los genes *ABI3*-like en dicotiledóneas, cereales y en coníferas, ha puesto de manifiesto la importancia de estos genes en la regulación de la dormición (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Mutantes en el gen *VP1* de maíz, ortólogo a *ABI3*, se caracterizan por presentar una sensibilidad reducida a la presencia de ABA durante la germinación y viviparismo (Graeber et al., 2012).

Recientemente se han identificado genes que actúan regulando a *ABI3*, *FUS3*, *LEC1* y *LEC2*. Por ejemplo, en maíz se ha visto que todos ellos están regulados por *VIVIPAROUS 8 (VP8)* (Suzuki et al., 2008). El mutante *vp8* produce semillas vivíparas, además de otras alteraciones pleiotrópicas del fenotipo (Suzuki et al., 2008). Los mutantes en los homólogos de *VP8* correspondientes en arroz, *PLASTOCHRON3/GOLIATH (PLA3/GO)*, y en *Arabidopsis*, *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)*, también muestran niveles alterados de dormición de las semillas (Kawakatsu et al., 2009; Griffiths et al., 2011), lo que sugiere la existencia de un mecanismo altamente conservado en varias especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. *AMP1* está implicado en el control de la dormición regulando el contenido en ABA de semillas de *Arabidopsis*, aunque su modo de actuación depende de la accesión (Griffiths et al., 2011). *AMP1* y sus ortólogos codifican una posible glutamato carboxipeptidasa, lo que abre la posibilidad de que una señal peptídica esté implicada en la maduración de la semilla y en la inducción de la dormición (Graeber et al., 2012).

2.1.2 Inducción y mantenimiento de la dormición dependiente de hormonas: papel del ABA.

Un gran número de estudios genéticos y fisiológicos han demostrado que el nivel de dormición de las semillas de *Arabidopsis* depende del balance entre la biosíntesis y catabolismo de GAs y de ABA (Karssen y Lacka, 1986; Lee et al., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005; Yamaguchi, 2008; Nambara et al., 2010). Ambas hormonas juegan un papel antagónico en la adquisición y el mantenimiento de la dormición (Oh et al., 2006; Okamoto et al., 2006; Graeber et al., 2012; Kim et al., 2013). Mientras que la biosíntesis de ABA y la degradación de GAs favorecen la adquisición y el mantenimiento del estado durmiente de las semillas, la acumulación de GAs promueve la germinación (Olszewski et al., 2002; Nambara y Marion-Poll, 2005; Kucera et al., 2005; Graeber et al., 2012). La biosíntesis de GAs y ABA, así como la sensibilidad de las semillas a estas fitohormonas y las rutas de transducción de señales de GAs y ABA, están interconectadas y a su vez interaccionan con otras hormonas y factores ambientales y endógenos, de manera que el equilibrio entre la acción de ambas hormonas tiene un papel esencial en la regulación de la germinación y la dormición (Kucera et al., 2005; Finkelstein et al., 2008; Seo et al., 2009; Nambara et al., 2010; Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011; Graeber et al., 2012; Rajjou et al., 2012).

2.1.2.1 Regulación de la inducción de la dormición por ABA.

Numerosos datos experimentales han permitido concluir que la acumulación de ABA está relacionada con el establecimiento de la dormición de la semilla, y que esta hormona es el principal factor intrínseco de la semilla que induce el establecimiento y mantenimiento de la dormición (Lefebvre et al., 2006; Nakashima et al., 2009; Lee et al., 2010; Nambara et al., 2010). El ABA no es solo un regulador positivo de la dormición, sino también es un represor de la germinación, ya que inhibe el potencial de crecimiento del embrión y de debilitamiento de la capa del endospermo durante la germinación (da Silva et al. 2004).

El ABA materno tiene un importante papel en la regulación de muchos aspectos del desarrollo de la semilla y es el responsable de los altos niveles de ABA durante el desarrollo de ésta (Karssen et al., 1983). Sin embargo, diversos estudios muestran que el ABA producido por tejidos maternos o añadido exógenamente no es suficiente para inducir la dormición. De hecho, mutantes deficientes en *ABA* (*aba/aba*) en plantas que producen ABA (*ABA/aba*), no presentan dormición (Bewley et al.,

1997). Ésta se establece en las semillas gracias al ABA producido por los tejidos zigóticos, tanto en el embrión como en el endospermo, en los últimos estadios de la maduración (Karssen et al., 1983; LePage-Degivry y Garello, 1992; Frey et al., 2004; Gutierrez et al., 2007; Lefebvre et al., 2006).

Se ha demostrado que el contenido de ABA de las semillas es bajo en la primera parte de su desarrollo, aumenta progresivamente durante el periodo en el que se acumulan los productos de reserva, y disminuye cuando la semilla se deseca (Bewley, 1997). En el ecotipo Cvi de *Arabidopsis*, que muestra niveles elevados de dormición de las semillas, se han encontrado altos contenidos de ABA (Ali-Rachedi et al, 2004; Cadman et al; 2006). En esta accesión, una vez se han embebido las semillas, se produce biosíntesis de nuevo de ABA, hecho que se ha observado también en otras especies vegetales en las que el ABA está implicado en la inducción y el mantenimiento del estado durmiente (Le Page-Degivry y Garello, 1992; Wang et al., 1995; Kucera et al., 2005; Holdsworth et al., 2008; Hilhorst et al., 2010).

La regulación de la ruta de biosíntesis de ABA permanece en gran medida desconocida, aunque se ha demostrado que la síntesis de esta hormona está finamente regulada, al menos desde el punto de vista transcripcional, tanto temporal como espacialmente (Nambara y Marion-Poll, 2003; Ali-Rachedi et al, 2004; Lefebvre et al., 2006). Los mutantes alterados en la biosíntesis o el metabolismo del ABA presentan defectos en la dormición, y de hecho, la carencia de ABA permite la germinación sin GAs (Bentsink y Koornneef, 2008). Entre los genes claves que participan en la biosíntesis de ABA durante la inducción de la dormición de la semilla se encuentran *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 6* y *9* (*NCED6* y *NCED9*). Mientras que *NCED6* se expresa exclusivamente en el endospermo, *NCED9* se expresa tanto en el endospermo como en el embrión (Lefebvre et al., 2006). La pérdida de función simultánea de ambos genes, pero no la de cada uno de ellos por separado, provoca reducción de la dormición de las semillas (Lefebvre, 2006). *ZEAXANTHIN EPOXIDASE/ABA DEFICIENT 1* (*ZEP/ABA1*), que codifica un enzima importante en la biosíntesis de ABA también es necesario para el mantenimiento de la dormición (Cadman et al., 2006; Finkelstein et al., 2008).

2.1.2.2 Papel de la señalización de ABA en la regulación de la dormición.

En la regulación de la dormición, tan importante como la síntesis de ABA es su señalización. En *Arabidopsis*, determinados mutantes insensibles a ABA (*aba insensitive, abi*) presentan una marcada reducción en la dormición de semillas (Kucera

INTRODUCCIÓN

et al., 2005; Finkelstein et al., 2008; Holdsworth et al., 2008). Estudios recientes han revelado un posible mecanismo molecular que media la percepción de ABA. Así, la familia de proteínas PYRABACTIN RESISTANCE1/PYR1-LIKE (PYR/PYL1/RCAR) constituye un grupo de receptores de ABA que mediarían la respuesta a esta hormona, interaccionando con miembros de la familia de fosfatasas PROTEIN PHOSPHATASE 2C (PP2C) y antagonizando su acción (Nambara et al., 2010; Nishimura et al., 2010; Graeber et al., 2012). Esta familia de genes *PP2C* actúan como reguladores negativos de respuestas inducidas por ABA (Kucera et al., 2005; Nishimura et al., 2007). En ausencia de ABA, estas fosfatasas de tipo 2C actúan sobre determinadas quinasas de tipo SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2), inhibiendo su actividad. Sin embargo, en presencia de ABA, los receptores PYR/PYL1/RCAR forman un complejo tripartito con la hormona y con PP2C, lo que impide la unión de estas fosfatasas con el sustrato, SnRK2, eliminando la inhibición de ésta mediada por PP2C. En esas condiciones, las quinasas SnRK2 son capaces de activar la expresión de genes portadores de dominios ABRE en sus regiones reguladoras (Nakashima et al., 2009) y que median las respuestas celulares dependientes de ABA (Raghavendra et al., 2010) (Figura 4). Diversos estudios han puesto de manifiesto que estos componentes de la cadena de señalización de ABA tienen un papel esencial en la regulación de la dormición de semilla y germinación. Por ejemplo, el aumento de la germinación de semillas de plantas deficientes en 3 a 6 receptores PYR/PYLS indica una regulación cualitativa por esta familia de receptores de ABA (González-Guzmán et al., 2012). Recientemente se ha descrito que *HONSU* (*HOM*), que codifica una proteína de tipo PP2C, es uno de los principales reguladores negativos de la dormición de semillas (Kim et al., 2013). Además, semillas de plantas con mutaciones en *ABI1* y *ABI2*, que también codifican proteínas PP2C, muestran un fenotipo de reducción de la dormición (Koornneef et al., 1984), causado por la incapacidad de estas proteínas mutadas para unirse a los receptores de ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). En consecuencia, en estos mutantes *abi* las fosfatasas permanecen activas en presencia de ABA y reprimen constitutivamente proteínas quinasas SnRK2. Tres quinasas de tipo SnRK2 (SnRK2.2, SnRK2.3 y SnRK2.6) actúan de manera redundante en la transmisión de la señal de ABA durante el desarrollo de la semilla y la inducción de la dormición (Fujii y Zhu, 2009; Nakashima et al., 2009). El triple mutante *snrk2* muestra pérdida de dormición y viviparismo en condiciones de humedad alta (Nakashima et al., 2009). Se ha demostrado que entre las dianas más importantes de estas quinasas se encuentran factores de transcripción de tipo bZIP, incluyendo ABI5 y ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENTS-BINDING PROTEIN 3 (AREB3) (Nakashima et al., 2009).

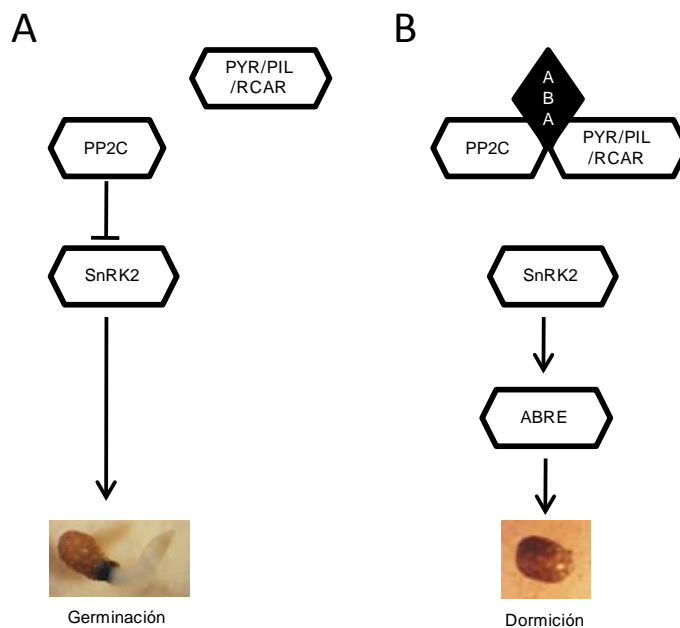


Figura 4. Modelo hipotético del mecanismo de percepción de ABA. A. En ausencia de ABA, las fosfatasas PP2C inhibirían la actividad de las proteínas SnRK2, promoviendo la germinación de las semillas. B. En presencia de ABA, se formaría un complejo ABA-PYR/PIL/RCAR-PP2C, con lo que las proteínas SnRK2 podrían activar la expresión de factores de transcripción con dominio ABRE, promoviendo la dormición.

Además de estas proteínas implicadas en la percepción y señalización de ABA, otros factores como ABI4 participan en la regulación de la dormición de la semilla mediada por ABA. Los mutantes *abi4* muestran dormición reducida de sus semillas (Shu et al., 2013). ABI4 es un factor de transcripción de tipo APETALA 2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF), que se expresa en el embrión (Penfield et al., 2006). ABI4 desempeña un papel especialmente relevante durante el desarrollo de la semilla y la imbibición (Finkelstein et al., 1998), momentos en los que el nivel de transcrito de *ABI4* es alto (Soderman et al., 2000). Los mutantes *abi4* muestran una reducción de la dormición primaria, con un nivel inferior de ABA pero superior de GAs al de semillas de tipo silvestre, es resistente a Paclobutrazol (PAC), un inhibidor de la síntesis de GAs, y presenta alteraciones en la mayoría de genes implicados en el metabolismo de ABA y GA (Shu et al., 2013). Estas observaciones han llevado a la conclusión de que *ABI4* es un regulador negativo de la biogénesis de GA y un regulador positivo de la biosíntesis de ABA durante la germinación de la semilla (Shu et al., 2013). Además, *ABI4* probablemente actúa aguas arriba de *CHOTTO 1* (*CHO1*) en la misma ruta genética, ya que la inducción de *CHO1* después de la imbibición requiere el factor de transcripción ABI4 (Yano et al., 2009; Yamagishi et al., 2009). *CHO1* es un factor de transcripción que se expresa predominantemente en semillas,

INTRODUCCIÓN

sobre todo en semillas embebidas (Yamagishi et al., 2009). *CHO1* promueve la dormición en semillas embebidas de *Arabidopsis*, al inhibir la biosíntesis de GA, mediante la supresión de la síntesis de GA3ox2 (Yano et al., 2009). Además, los mutantes *cho1* muestran una reducción del nivel de ABA, mientras que su ganancia de función tiene el resultado opuesto (Yano et al., 2009). Puesto que la expresión de *CHO1* requiere la señalización de ABA, se ha propuesto que este factor de transcripción podría integrar la regulación de la biosíntesis de GA y la señalización de ABA (Hedden y Thomas., 2012).

ABI5 también se ha identificado como un represor central de la germinación que integra señales procedentes tanto de ABA como de GAs (Piskurewicz et al., 2008). La acumulación de *ABI5* está promovida por ABA al final de la maduración (Piskurewicz et al., 2008). *ABI5* funciona aguas abajo de *ABI3*, y es esencial para la parada del crecimiento inducida por ABA que se produce después de la salida de la dormición de la semilla, pero antes del crecimiento autotrófico (Lopez-Molina et al., 2001, 2002). Bajo condiciones normales de germinación, la expresión de *ABI5* (tanto a nivel de mRNA como de proteína) refleja los niveles de ABA y desciende rápidamente, siendo indetectable dentro de las 12 a 24 h después de la imbibición (Piskurewicz et al., 2008). El transcrito de *ABI5* se ha detectado en el embrión y en el endospermo micropilar en semillas embebidas, lo que sugiere un papel de esta proteína en la inhibición del crecimiento del embrión así como de la rotura del endospermo (Penfield et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento no se han descrito defectos en la dormición de la semilla de los mutantes *abi5* por lo que el papel de este locus en el control de dicho proceso no está claro.

2.1.3 Papel de la señalización de GAs mediada por las proteínas DELLA en la dormición de semillas.

Las proteínas DELLA son reguladores negativos de diversas respuestas dependientes de GA. Estas hormonas regulan positivamente la germinación promoviendo la degradación de las proteínas DELLA (Tyler et al., 2004; Finkelstein et al., 2008). La familia de proteínas DELLA en *Arabidopsis* está formada por 5 miembros: *GAI* (*GA-INSENSITIVE*), *RGA* (*REPRESSOR OF GA1-3*) y *RGL1-3* (*RGA-LIKE1-3*). Las proteínas de esta familia se caracterizan todas ellas por la presencia del dominio DELLA, necesario para la regulación dependiente de GAs, y de un dominio GRAS (*GAI*, *RGA* y *SCARECROW*) también necesario para su función (Peng y Harberd et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Pysh et al., 1999; Dill et al., 2001). Entre

las cinco DELLA de Arabidopsis, RGL2 tiene un papel único y central para promover la síntesis de ABA en las semillas (Lee et al., 2010), aunque también se ha descrito un papel de las proteínas RGA y GAI en el control de la dormición de semillas (Penfield et al., 2006). Se ha comprobado en ensayos de germinación de embriones aislados sobre lechos de cubiertas seminales (del inglés “seed coat bedding assay”), que las cubiertas de mutantes *rgl2* no promueven la dormición de embriones extraídos de semillas durmientes, mientras que las cubiertas de mutantes *rga gai* no promueven la germinación de los embriones aislados (Lee et al., 2010). Sin embargo, endospermos durmientes con embriones *rga gai* no son capaces de bloquear la germinación (Lee et al., 2012). Así el papel principal de *RGL2* se produciría específicamente en las cubiertas mientras que el de *RGA* y *GAI* se ejercería en el embrión (Lee et al., 2010, 2012). La presencia de altos niveles de proteínas DELLA en semillas durmientes (Piskurewicz et al., 2008) corrobora el papel de estas en la dormición de las semillas.

El ABA promueve la acumulación del mRNA de *RGL2* en el endospermo, pero no el de las otras DELLA, y este a su vez promueve la síntesis de ABA en semillas durmientes durante la imbibición (Piskurewicz et al., 2008, 2009; Lee et al., 2010). *GAI* y *RGA* también promueven un mayor nivel de ABA en la semilla para ejercer la represión de la germinación en condiciones de luz roja lejana (Piskurewicz et al., 2009; Lee et al., 2010).

Análisis de micrordenamientos han mostrado que *RGL2* promueve la expresión de varios genes asociados con la dormición. Además se ha visto que *RGL2* inhibe la transcripción de *ALPHA EXPANSIN3 (EXPA3)* y *EXPA8*, genes que modulan la pared celular, uniéndose directamente a sus promotores, y promoviendo la dormición (Stamm et al., 2012). Por otra parte, el principal mecanismo molecular de actuación de las proteínas DELLA es su interacción con factores de transcripción, conduciendo a la formación de complejos inactivos (Davière et al., 2008), aunque también pueden actuar activando la transcripción mediante el secuestro de inhibidores transcripcionales (Stamm et al., 2012). Se ha observado que las proteínas DELLA interaccionan con otras proteínas entre las que se incluyen PIF3-like 5 (PIL5), PIL2 y SPATULA (SPT), factores de la subfamilia basic helix-loop-helix (bHLH) (Hou et al., 2010).

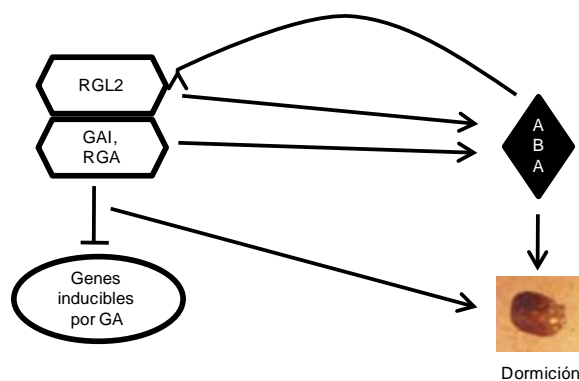


Figura 5. Participación de las proteínas DELLA en la promoción de la dormición. En las semillas, las GAs regulan positivamente la germinación promoviendo la degradación de las proteínas DELLA. Por su parte, las proteínas DELLA promueven la dormición de las semillas a diferentes niveles, siendo uno de los más importantes la inhibición de la expresión de genes que responden a GA. Además, promueven la síntesis de ABA, hormona que a su vez estabiliza al menos alguna de las proteínas DELLA, RGL2.

2.2. Mecanismos moleculares que median la salida de dormición de la semilla.

Una vez separada de la planta madre, el periodo durante el cual la semilla se mantiene en estado durmiente depende de diversos factores, tanto ambientales como endógenos (Bentsink y Koornneef, 2008; Graeber et al., 2012). En *Arabidopsis* se ha descrito una gran variación natural para la dormición de semillas (Alonso-Blanco et al., 2003; Bentsink et al., 2010; Nguyen et al., 2012). Mientras que determinados ecotipos como *Ler* tienen escasos requerimientos de post-maduración (PM) (en pocos días de PM se elimina totalmente la dormición), otros ecotipos como *Cvi* requieren periodos prolongados de almacenaje para salir de la dormición (Alonso-Blanco et al., 2003). Por tanto, determinantes genéticos condicionan el nivel de dormición de semillas de *Arabidopsis*. Asimismo, factores ambientales como la temperatura también tienen un efecto relevante sobre la duración del periodo de dormición de la semilla.

En *Arabidopsis*, la salida rápida de la dormición requiere generalmente de un periodo de estratificación, condición que como hemos discutido anteriormente favorece la germinación (Koornneef y Karssen, 1994; Baskin y Baskin, 2004). El proceso de PM se produce en periodos más largos de tiempo y acaba relajando progresivamente el bloqueo de la germinación presente en la semilla fresca (Koornneef y Karssen, 1994; Baskin y Baskin, 2004). La eliminación de la restricción física impuesta por las capas que rodean al embrión (escarificación), también favorece la eliminación de la dormición. Además, condiciones ambientales favorables tales como disponibilidad de agua, temperatura adecuada y/o luz promueven la germinación (Koornneef y Karssen, 1994; Hilhorst et al., 1995; Penfield et al., 2005; Bentsink y Koornneef, 2008). Todos

estos factores modulan la salida de dormición de la semilla interaccionando con complejos circuitos reguladores que responden también a hormonas y a otras moléculas para controlar con precisión el momento en el que la semilla está lista para germinar, y asegurar así la adaptación óptima de la nueva planta a su entorno. En los apartados siguientes discutiremos algunos de los datos obtenidos recientemente en relación con la rotura de la dormición de las semillas de *Arabidopsis*, empleando diversas aproximaciones experimentales. Estos estudios han desvelado que la interacción entre estímulos medioambientales y procesos de síntesis, degradación y señalización de hormonas, desempeñan un papel central en la modulación de este proceso.

2.2.1 Cambios de expresión génica median la salida de dormición de la semilla.

El metabolismo de semillas durmientes permanece solo parcialmente inactivo, como lo indica la transcripción continuada de genes regulados por el desarrollo en los embriones presentes en dichas semillas (Bewley, 1997). Por tanto, la dormición es un estado celular activo, con redes reguladoras complejas que continuamente integran señales ambientales y responden a ellas, manteniendo la dormición o regulándola negativamente (Cadman et al., 2006; Carrera et al., 2007, 2008; Finch-Savage et al., 2007). Diferentes análisis transcripcionales globales llevados a cabo con semillas durmientes han puesto de manifiesto que los sucesivos mecanismos de bloqueo de la germinación están asociados con cambios en programas de expresión génica (Cadman et al., 2006). Muchos de los genes más representados en los estados de dormición están relacionados con respuestas de estrés, mientras que los genes que se expresan después de la maduración están relacionados con el establecimiento de la maquinaria de traducción, el potencial para la remodelación de la pared celular y la movilización de reservas para completar la germinación (Cadman et al., 2006; Müller et al., 2010). Se ha propuesto que un regulador de estos efectos podría ser el reloj circadiano, ya que se ha observado que es necesario para la respuesta a señales que eliminan la dormición de la semilla (Penfield y Hall., 2009).

Durante el almacenamiento de semillas secas se producen importantes cambios en la expresión de transcritos y proteínas, y algunos de ellos podrían ser responsables de eliminar la dormición de las semillas (Bove et al., 2005; Leubner-Metzger, 2005; Chibani et al., 2006). Además se ha propuesto que determinados procesos no enzimáticos tienen lugar para mitigar la dormición, como lo demuestra el papel de especies reactivas a oxígeno (ROS) (del inglés reactive oxygen species) en

INTRODUCCIÓN

la liberación de la dormición por almacenamiento en semillas de girasol (Oracz et al., 2007; Bazin et al., 2011).

Estudios de transcriptómica y proteómica realizados con semillas secas han permitido obtener información adicional para comprender los mecanismos que regulan la dormición/germinación de la semilla. Se ha descrito que en semillas durmientes existe una acumulación de mRNAs, producidos en la maduración, que son usados para la traducción de proteínas en la semilla embebida (Rajjou et al., 2004; Bentsink y Koornneef, 2008). Además, se ha demostrado que durante el almacenamiento de semillas durmientes se producen cambios significativos en los niveles de diferentes transcritos y proteínas, y estos cambios podrían mediar la eliminación de la dormición en semillas PM (Bove et al., 2005, Leubner-Metzger, 2005; Chibani et al., 2006). Análisis de semillas PM en varias especies han mostrado que el número de transcritos cuya expresión disminuye es mucho mayor que el de los que aumentan (Bove et al., 2005; Leymarie et al., 2007). Además, análisis de expresión globales en *Arabidopsis* han mostrado que el nivel de expresión de al menos 30 genes, incluyendo *DELAY OF GERMINATION 1 (DOG1)*, disminuye significativamente durante la PM (Finch-Savage et al., 2007). Por otra parte, análisis proteómicos en *Arabidopsis* han identificado varias proteínas que se acumulan durante la PM (Chibani et al., 2006). La mayoría de ellas corresponde a proteínas de almacenamiento con funciones metabólicas que pueden preparar a la semilla para la germinación, pero que no tienen ningún efecto en la liberación de la dormición. Estos resultados sugieren la existencia de transcripción y traducción activa bajo condiciones de baja humedad en las semillas (Holdworth et al., 2008), que podrían conducir a la eliminación de la dormición en estas condiciones ambientales. En condiciones normales, la transcripción y la traducción probablemente no tienen lugar en toda la semilla, sino que podría estar localizada en áreas específicas de ésta, donde el un contenido de humedad es más alto (Leubner-Metzger, 2005; Bentsink y Koornneef, 2008).

Estas aproximaciones transcriptómicas y proteómicas han permitido identificar genes candidatos relacionados con la dormición, como *DESPIERTO (DEP)*, que codifica una proteína con un dedo de zinc C3HC4 tipo RING (Really Interesting New Gene), y *ATHB20*, un gen que codifica un factor de transcripción de tipo Homeodomain-Zip (HDZip) (Barrero et al., 2010). Los mutantes *dep* muestran ausencia de dormición, mientras que los mutantes *athb20* muestran un aumento en la dormición respecto a las semillas de tipo silvestre.. Se ha demostrado que ambos genes modulan la sensibilidad a ABA y que la expresión de los genes *DEP* y *DOG1* es

máxima durante la última parte del desarrollo de la semilla y baja durante la imbibición (Barrero et al., 2010).

Por otro lado, el desarrollo de herramientas bioinformáticas también ha contribuido a desvelar circuitos reguladores implicados en la regulación de este proceso de desarrollo. Así, la utilización de bases de datos públicas de expresión de genes en la semilla ha permitido elaborar un modelo representativo de la red transcripcional de genes expresados durante la etapa de dormición-germinación (Bassel et al., 2011). Este modelo describe las interacciones transcripcionales globales que median el mantenimiento de la dormición y la transición entre ésta y la germinación de las semillas. Este estudio permitió la identificación de varios genes relacionados con la dormición, entre ellos *AGAMOUS-LIKE67* (*AGL67*), que codifica un factor de transcripción de tipo MADS box. El alto número de genes coordinados con *AGL67*, la falta de dormición observada en los mutantes *agl67*, y el hecho de que la expresión de su transcrito disminuya antes de la germinación, llevaron a proponer a *AGL67* como regulador central de la dormición de semillas (Bassel et al., 2011).

2.2.2 Función de diferentes hormonas en la salida de la dormición.

El papel de las hormonas, y en particular de ABA y GAs, no está limitado al proceso de adquisición de la dormición, sino que también tienen una función esencial en la salida de la dormición. Determinadas señales ambientales eliminan la dormición y promueven la germinación, regulando los niveles de hormonas, fundamentalmente promoviendo la degradación de ABA y aumentando la biosíntesis de GA (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), al tiempo que disminuyen la sensibilidad a ABA y aumentan la sensibilidad a GAs (Le Page-Degivry et al., 1996; Koornneef et al., 2002; Leubner-Metzger, 2002; Ali-Rachedi et al., 2004). Además, resultados recientes han contribuido a desvelar el papel de otras hormonas en la regulación de la dormición (Arc et al., 2013).

2.2.2.1 Degradación de ABA.

Durante la imbibición de la semilla, los niveles de ABA disminuyen tanto en semillas durmientes como no durmientes (Ali-Rachedi et al., 2004). Sin embargo, después de 3 días de imbibición los niveles de ABA aumentan solo en las semillas durmientes (Ali-Rachedi et al., 2004). Los niveles de ABA disminuyen al final de la maduración y durante la imbibición debido a la acción de genes de la familia CYTOCHROME *P450*, FAMILY 707, SUBFAMILY A, POLYPEPTIDE 1 y 2 (*CYP707A1*

INTRODUCCIÓN

y *CYP707A2*), que codifican ABA 8' hidroxilasas, implicadas en el catabolismo de ABA en semillas (Okamoto et al., 2006; Matakias et al., 2009). Los patrones de expresión espaciales y temporales de estos dos genes durante el desarrollo de la semilla y la germinación son distintos, lo que sugiere diferentes papeles para *CYP707A1* y *CYP707A2* en la salida de dormición (Okamoto et al., 2006). *CYP707A1* se expresa en el embrión y tiene un máximo de expresión en silicuas durante la maduración (Kushiro et al., 2004; Okamoto et al., 2006). Sin embargo, *CYP707A2* se expresa en el embrión y en el endospermo (Okamoto et al., 2006). La expresión de *CYP707A2* es inducida en la radícula poco después de la imbibición (6 h), y participa en la degradación de ABA de manera dependiente de fitocromo y de PM (su mRNAs se acumula a niveles altos en las semillas secas) (Okamoto et al., 2006).

La expresión de estos genes *CYP707* está controlada por proteínas que participan en las rutas de señalización de ABA, como ABI4. Esta proteína se une directamente a los promotores de los genes *CYP707A1* y *CYP707A2*, inhibiendo su transcripción. Se ha propuesto que el fenotipo de reducción de la dormición del mutante *abi4* es debido a la acumulación de las enzimas *CYP707A1* y *CYP707A2*, que degradan ABA, promoviendo así la germinación (Shu et al., 2013).

2.2.2.2 Biosíntesis y señalización de GAs.

Las GAs estimulan la germinación en un amplio rango de especies de plantas y tienen un papel esencial y antagónico al del ABA en la regulación de la dormición. El balance entre los niveles de estas dos hormonas y sus respectivos mecanismos de señalización son importantes en la regulación tanto de la inducción como del mantenimiento de la dormición (Finkelstein et al., 2008). Sin embargo, su papel en la liberación de la dormición es controvertido. La acumulación de esta hormona está asociada a la disminución de la dormición y a la germinación, pero la adición de GAs a semillas durmientes de muchas especies, incluidos ecotipos muy durmientes de *Arabidopsis*, no es suficiente para estimular la germinación (Derkx et al., 1994; Bewley, 1997; Ali-Rachedi, 2004). Se ha propuesto que es necesaria una disminución de los niveles de ABA antes de que las semillas adquieran la capacidad de responder a GA (Jacobsen et al., 2002; Ali-Rachedi, 2004). A pesar de ello, diversas observaciones sustentan la idea que niveles altos de GAs median la disminución de la dormición de semillas de *Arabidopsis* en respuesta a la imbibición en frío (Yamauchi et al., 2004). Por ejemplo, la estratificación de semillas de *Arabidopsis* conduce a un aumento de la expresión de enzimas de la biosíntesis de GAs como *GA20ox1*, *GA20ox2* y *GA3ox1*, y

a una disminución de los niveles de genes del catabolismo de esta hormona como *GA2ox2*, lo que sugiere que las GAs podrían no ser responsables de disparar el proceso de PM, pero sí ser necesarias para la salida de la dormición y la germinación (Yamauchi et al., 2004; Finch-Savage et al., 2007; Finkelstein, 2008).

Durante la imbibición de la semilla se requiere biosíntesis de GAs *de novo*, y mutantes deficientes en GAs son incapaces de germinar sin la adición exógena de dicha hormona (Koornneef y Van der Veen, 1980). Además, se ha comprobado que determinados factores ambientales pueden inducir la biosíntesis de GAs durante el periodo inicial de la germinación, incrementando el potencial de germinación de la semilla (Bentsink y Koornneef, 2008). Se han propuesto dos papeles para las GAs en la germinación: aumentar el potencial de crecimiento del embrión y debilitar los tejidos que rodean la radícula antes de su emergencia (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). El aumento del potencial de crecimiento se consigue con la acumulación de GAs bioactivas, promovida por factores ambientales, sobre todo la luz y el frío (Yamaguchi y Kamiya, 2000; Oh et al., 2004; Liu et al., 2005; Penfield et al., 2005; Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006), justo antes de la salida de la radícula. Esta acumulación tiene lugar en dos localizaciones separadas dentro del embrión ya que las etapas iniciales de la ruta de biosíntesis de GAs tienen lugar en el tejido provascular, mientras que las etapas finales ocurren en el córtex y la endodermis de la raíz, donde se acumulan los transcritos de *GA3ox1* y *GA3ox2* (Ogawa et al., 2003; Finkelstein et al., 2008). Esta biosíntesis de GAs en la radícula estimula la germinación, induciendo enzimas hidrolíticas que debilitan las capas que cubren la semilla, endospermo y testa, provocando la movilización de reservas almacenadas y estimulando la expansión del embrión (Bewley y Black, 1994; Yamaguchi et al. 2001).

Por otra parte, la proteína BLUE MICROPILAR END 3 (BME3) promueve la expresión de *GA3ox1* y *GA20ox3* en el extremo micropilar de la semilla, lo que estimula la rotura de las barreras que rodean al embrión antes de la germinación. De acuerdo con estas observaciones, los mutantes *bme3* presentan un fenotipo de aumento de la dormición (Liu et al., 2005).

La señalización de GAs también es importante para la regulación del potencial de germinación de las semillas de *Arabidopsis*, como muestran los mutantes afectados en los receptores de GA, GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (*GID1*), *gid1a*, *gid1b* y *gid1c* (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007) y también en los mutantes *sleepy1* (*sly1*), afectados en una subunidad de un complejo E3 ligasa de ubiquitina que reconoce a las proteínas DELLA para su degradación y que, por tanto, tiene un papel

INTRODUCCIÓN

central en la señalización dependiente de GAs (Stebber et al., 1998). La implicación de los receptores de GAs en este proceso solo se aprecia en el triple mutante *gid1*, incapaz de germinar, ya que los tres genes *GID1* tienen funciones redundantes (Griffith et al., 2006; Willige et al., 2007). Las semillas frescas de *sly1* también son altamente durmientes (Ariizumi y Steber, 2007). Las GAs se unen a los receptores GID1 para formar complejos GA-GID1 que se unen posteriormente a las proteínas DELLA (Dill et al., 2001; Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006; Willige et al., 2007; Ariizumi et al., 2008; Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). Esta interacción favorece el reconocimiento de las proteínas DELLA por la subunidad F-box SLY1/GID2, que promueve la ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas DELLA por el proteasoma 26S (Sun y Gubler, 2004; Thomas y Sun, 2004; Dill et al., 2004; Ariizumi y Steber, 2007; Finkelstein et al., 2008). Como consecuencia se activa la señalización de GA y se impide la síntesis de ABA a través de XERICO (Zentella et al., 2007; Piskurewicz et al., 2008) (Figura 6). Recientemente se ha descrito otro mecanismo de inactivación de las proteínas DELLA en semillas PM. En estas condiciones, es posible la formación del complejo GA-GID-DELLA, sin proteólisis de las DELLA mediada por SLY, bloqueando la transcripción de *XERICO* y disminuyendo así la acumulación de ABA, además de promoviendo la señalización de GA (Ariizumi et al., 2013).

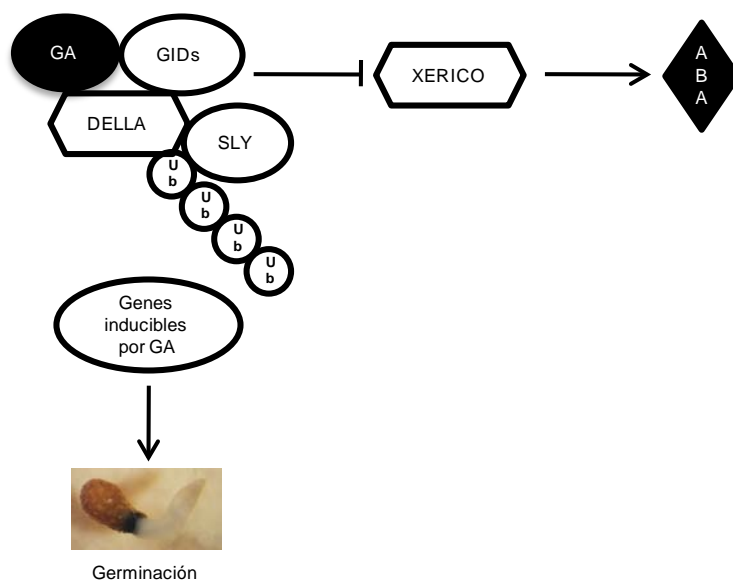


Figura 6. Modelo hipotético para la degradación de las proteínas DELLA y la promoción de germinación. En presencia de GAs, se forma el complejo GA-GIDs-DELLA, que es reconocido por la proteína F-box SLEEPY (SLY), que media la degradación de las proteínas DELLA. De esta manera se impide la síntesis de ABA por XERICO, y se inducen los genes de respuesta a GA para promover la germinación.

Como hemos mencionado anteriormente, entre las cinco proteínas DELLA de *Arabidopsis*, RGL2 desempeña un papel fundamental en mediar las respuestas a GAs en la semilla, y está implicada en la represión de la germinación (Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008; Lee et al., 2010; Stamm et al., 2012). Los niveles de mRNA y de proteína de RGL2 aumentan durante la imbibición, llegando a un pico a las 12h después de la imbibición, y disminuyen rápidamente durante el proceso de la germinación (Lee et al., 2002). Se ha observado que la disminución de la expresión del mRNA de *RGL2* ocurre después de la emergencia de la radícula (Bassel et al., 2004), lo que indica la complejidad del control de la germinación mediado por las proteínas DELLA. RGL2 lleva a cabo la represión de la germinación, al menos en parte, estimulando la biosíntesis de ABA, así como la actividad de *ABI5* y *ABI3*; a su vez, la expresión del mRNA de *RGL2* es regulada positivamente por ABA (Ko et al., 2006; Zentella et al., 2007; Piskurewicz et al., 2008, 2009), lo que indica que RGL2 tiene un papel en mediar la interacción entre GAs y ABA durante la germinación (Xi et al., 2010). Además se ha observado que RGL2 interacciona directamente con los factores PIL5 (Oh et al., 2009) y PIL2 (Gallego-Bartolomé et al., 2010), lo que sugiere que RGL2 podría estar implicado en la regulación de la germinación mediada por el fitocromo (Stamm et al., 2010).

2.2.2.3 Auxinas.

Las auxinas regulan muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta a través del sistema de señalización TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)/ADDITIONAL F BOX PROTEIN (AFB)-AUX/INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA) – AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Vanneste y Friml, 2009; Chapman y Estelle, 2009). Recientemente se ha demostrado que las auxinas son necesarias para la dormición de las semillas y para la inhibición de la germinación de las semillas por ABA (Liu et al., 2013). Este papel en el mantenimiento de la dormición de las auxinas se lleva a cabo modulando la expresión de *ABI3*, a través del reclutamiento de los genes *ARF10* y *ARF16* (Liu et al., 2013).

2.2.2.4 Etileno.

La producción de etileno en la semilla comienza desde el inicio de la fase de imbibición. De hecho, la salida de la radícula se ha asociado con la liberación de un pico de etileno (Arc et al., 2013). El etileno promueve la germinación de semillas y regula negativamente la dormición de semillas, antagonizando la acción del ABA

INTRODUCCIÓN

(Beaudoin et al., 2000; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008; Linkies y Leubner-Metzger, 2012). Semillas del mutante insensible a etileno *ethylene response1 (etr1)* muestran un aumento de la dormición e hipersensibilidad a ABA. Este fenotipo está parcialmente causado por niveles más altos de ABA en las semillas de este mutante (Beaudoin et al., 2000; Chiwocha et al., 2005). Mutaciones en los genes *ENHANCED RESPONSE TO ABA3 (ERA3)/ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)* conducen a una sobreacumulación de ABA y a un aumento de la dormición de semillas, sugiriendo que ERA3/EIN2 es un regulador negativo de la síntesis de ABA (Ghassemian et al., 2000). La regulación del antagonismo etileno-ABA durante la dormición y la germinación es poco conocida (Wang et al., 2013). Entre las funciones que el etileno podría desarrollar se encuentran las de promover la expansión radial celular en el hipocotilo embrionario, disminuir el potencial hídrico de las semillas y favorecer la respiración de la semilla o la actividad de las hidrolasas de la pared celular en el endospermo (Kucera et al., 2005; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008, Linkies et al., 2009).

2.2.3 El óxido nítrico (NO) funciona como molécula señalizadora en la liberación de la dormición de semillas.

El óxido nítrico (NO) es un compuesto gaseoso que desempeña diversas funciones en el desarrollo de plantas. Entre ellas, está implicado en la liberación de la dormición de semillas de diversas especies, incluida *Arabidopsis*, y se ha propuesto que el NO sería un regulador endógeno de este proceso (Bewley y Black, 1994; Beligni y Lamattina, 2000; Sarath et al., 2006; Bethke et al., 2007). De acuerdo con estas observaciones, el cPTIO (carboxy-2-phenyl-4,4,5-tetramethylimidazole-1-oxyl 3-oxide), un secuestrador de NO, impide la eliminación de la dormición (Bethke et al., 2006), lo que es consistente con un papel de esta molécula en la modulación de la dormición (Bethke et al., 2004; Sírová et al., 2011).

Se ha observado que el NO promueve la expresión de *CYP707A2*, un gen que como hemos descrito, participa en la degradación de ABA (Liu et al., 2009; Arc et al., 2013). En semillas embebidas de *Arabidopsis*, el principal tejido diana del NO es el endospermo (Sarath et al., 2006; Bethke et al., 2007), donde se acumularía durante la primera etapa de la imbibición de la semilla, para romper la dormición mediante el catabolismo de ABA (Liu et al., 2009; Arc et al., 2013). Asimismo, el NO podría actuar disminuyendo la sensibilidad a ABA de semillas embebidas (Bethke et al., 2006).

2.2.4. Papel regulador de ROS en la germinación y dormición de semillas.

Las ROS también han sido propuestas como elementos con un papel regulador en la germinación y dormición de semillas (Bailly, 2004; Oracz et al., 2007; Bailly et al., 2008; El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; El-Maarouf-Bouteau et al., 2013). Recientemente se ha propuesto que ROS podría coordinar la reducción de la dormición impuesta por ABA con la activación de la germinación estimulada por GA (Liu et al., 2010). Más concretamente, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) exógeno parece promover el catabolismo de ABA y la biosíntesis de GA durante la imbibición de la semilla. Como en el caso del NO, el H_2O_2 media la expresión de genes *CYP707A*, pero el primero no tiene ningún efecto sobre la estimulación de la biosíntesis de GAs, por lo que se ha propuesto que el NO puede actuar aguas abajo de H_2O_2 para aumentar el catabolismo ABA (Arc et al., 2013) (Figura 7). *In vivo*, tanto H_2O_2 como NO se acumulan rápidamente en la imbibición y preceden a la inducción de catabolismo de ABA / biosíntesis de GAs (Liu et al., 2010; Arc et al., 2013).

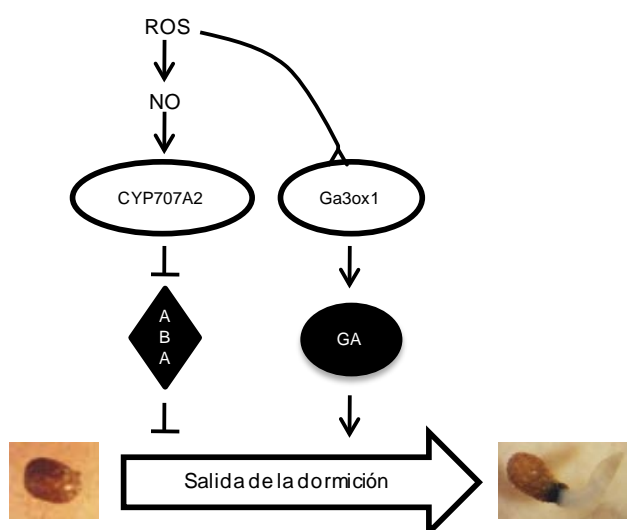


Figura 7. Modelo hipotético del efecto de ROS y de NO en la salida de la dormición de semillas de *Arabidopsis*. La salida de la dormición está favorecida por el efecto de ROS y NO. Ambos promueven el catabolismo de ABA, mientras que ROS además promueve la síntesis de GA.

3. Regulación de la dormición por factores ambientales y el reloj circadiano.

Como se ha mencionado con anterioridad, determinadas señales ambientales contribuyen a eliminar la dormición y promueven la germinación regulando los niveles de hormonas, fundamentalmente ABA y GAs (Oh et al., 2004; Penfield et al., 2005; Nambara et al., 2010; Cho et al., 2012; Park et al., 2012; Lim et al., 2013). Las condiciones medioambientales de luz, temperatura, humedad, nitrato, etc. en las que

INTRODUCCIÓN

se encuentran las plantas durante el proceso de maduración de las semillas influyen de manera decisiva en el nivel de dormición que estas alcanzan (Donohue, 2008; Chiang, 2009). Asimismo, una vez que la semilla se libera de la planta madre, el nivel de dormición de las semillas se ve afectado por factores medioambientales tales como la temperatura del suelo, la luz y la humedad (Footitt et al., 2011; Graeber et al., 2012; Footitt et al., 2013). Esta capacidad de las semillas para modular el nivel de dormición en respuesta a factores ambientales permite inducir la germinación en condiciones ambientales óptimas para el establecimiento de la plántula y el éxito reproductivo.

3.1 Efecto de la temperatura en la dormición de la semilla.

La temperatura es uno de las principales factores ambientales que regulan la dormición primaria, modulando los niveles de ABA y GAs en las semillas. Como se ha mencionado anteriormente, los tratamientos de frío estimulan la biosíntesis de GA en la semilla de *Arabidopsis* (Yamauchi et al., 2004), induciendo la expresión de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2*, y por tanto, la germinación. Las bajas temperaturas inducen un cambio espacial en el patrón de expresión de *Ga3ox1*, ya que además de encontrarse en la radícula, pasa a acumularse en el endospermo micropilar (Yamauchi et al., 2004). Además la estratificación por frío induce la bajada de los niveles de ABA, y afecta la expresión transcripcional de varios componentes de la señalización de esta hormona, incluyendo *PYL6*, *ABI4*, *ABI5*, así como varias *PP2C* y *SnRK2s* (Graeber et al., 2012).

Además de los niveles de hormonas, la temperatura actúa modulando la expresión de *DOG1* (Chiang et al. 2011; Footitt et al. 2011; Kendall et al. 2011; Graeber et al., 2012). *DOG1* codifica una proteína de función desconocida y fue identificado como el primer Quantitative Trait Loci (QTL) de dormición de semillas clonado en *Arabidopsis* (Bentsink et al., 2006). El mutante *dog1* de *Arabidopsis* muestra una reducción de la dormición sin otros defectos pleiotrópicos, lo que sugiere que *DOG1* es un regulador clave específico para la inducción de la dormición (Sugimoto et al., 2010; Graeber et al., 2010). Además, *DOG1* está conservado en otras especies de plantas (Graeber et al., 2013). Este gen se expresa principalmente en el tejido vascular del embrión y los niveles de su transcrito disminuyen rápidamente durante la imbibición (Nakabayashi et al., 2012, Graeber et al., 2013). La proteína *DOG1* se acumula durante la maduración de la semilla (Nakabayashi et al., 2012; Footitt et al., 2013), y está implicada en el establecimiento de la dormición primaria (Vaistij et al., 2013). Se ha propuesto que *DOG1* tiene un papel importante en

transmitir la señal de temperatura de maduración de las semillas a niveles de dormición (Chiang et al., 2011; Footitt et al., 2011; Kendall et al., 2011; Nakabayashi et al., 2012). Así, cuanto más baja es la temperatura de maduración, mayores niveles de dormición alcanza la semilla, lo que además está correlacionado con un aumento de los niveles de la proteína DOG1 (Nakabayashi et al., 2012).

Además, la expresión de *DOG1* está correlacionada negativamente con la temperatura del suelo, por lo que este gen podría actuar como parte de un mecanismo de detección térmica para influenciar el nivel de dormición, alterando la sensibilidad a ABA, y podría mediar las respuestas lentas estacionales (Footitt et al., 2011, 2013). Así, *DOG1* podría actuar como un temporizador, ya que la cantidad de proteína *DOG1* en semillas frescas está altamente correlacionada con el tiempo de PM necesario para romper la dormición (Nakabayashi et al., 2012; Footitt et al., 2013). Se ha demostrado que la dormición en respuesta a bajas temperaturas está asociada con aumentos en la expresión de *AtGA2ox6*, un proceso mediado por *DOG1* (Kendall et al., 2011). Este aumento de *GA2ox6*, que reduce el nivel de GA bioactivo, ya se había descrito por su papel en la inhibición mediada por ABA de la biosíntesis de GAs en semillas en desarrollo (Gutiérrez et al., 2007). Los genes *C-REPEAT BINDING FACTOR* (CBF) son necesarios para la regulación de la dormición causada por bajas temperaturas de maduración de la semilla y el control de la expresión de *DOG1* y *GA2OX6* en respuesta a bajas temperaturas (Kendall et al., 2011). Por otra parte, diferentes trabajos publicados han propuesto que la expresión de *DOG1* está regulada por ABA o factores de señalización de ABA (Graeber et al., 2010), y por GAs (Gutiérrez et al., 2007; Zheng et al., 2011). Sin embargo, datos genéticos muestran que *DOG1* funciona de manera independiente de ABA, aunque la presencia de *DOG1* y de ABA sea necesaria para la dormición de la semilla (Nakabayashi et al., 2012; Vaistij et al., 2013). Niveles altos de ABA no conducen a la dormición en ausencia de *DOG1*, como muestran semillas del doble mutante *dog1-2 cyp707a2-1*. Asimismo, los altos niveles de *DOG1* no pueden compensar la ausencia de dormición en el mutante *aba1* (Nakabayashi et al., 2012). Además el aumento de la dormición debido a temperaturas frías en la maduración no solo está correlacionado con el aumento de expresión de *DOG1*, sino también con la disminución de *CYP707A2* (Kendall et al., 2011; Arc et al., 2013). Por tanto, es posible que *DOG1* actúe en paralelo a la señalización de ABA, de manera independiente, aunque indirectamente regule el nivel de ABA (Footitt et al., 2011; Nakabayashi et al., 2012).

Al igual que ocurre con *DOG1*, la expresión de *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT*) está altamente correlacionada con el ciclo de dormición en ecotipos durmientes

INTRODUCCIÓN

de *Arabidopsis* en respuesta a la temperatura (Footitt et al., 2013). En el caso del homólogo de *MFT* de trigo, su expresión aumenta durante el invierno, por lo que podría actuar como parte de un mecanismo de detección térmica para influenciar el nivel de dormición, alterando la sensibilidad a ABA (Nakamura et al., 2011). Por lo tanto, *MFT* podría transmitir las señales de la temperatura a una cascada de señalización para regular la profundidad de la dormición de la semilla (Nakamura et al., 2011). *MFT* pertenece a la familia de proteínas PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN (PEBP), junto a FT y TFL1, los cuales tienen papeles antagónicos en el control de la floración (Kobayashi et al., 1999). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que *MFT* promueve la dormición primaria en semillas frescas de *Arabidopsis* y la germinación en semillas PM (Vaistij et al., 2013). Los mutantes *mft-2* muestran menor dormición que las semillas de tipo silvestre, y sus semillas, después de un tiempo de almacenamiento, son hipersensibles a ABA, por lo que *MFT* promueve la dormición durante el desarrollo de las semillas y la germinación en semillas almacenadas con ABA exógeno (Vaistij et al., 2013).

Otra de las proteínas que media la respuesta de dormición a las bajas temperaturas es SPATULA (*SPT*), que media la represión de la germinación de semillas frescas en respuesta al frío (Penfield et al., 2005). El mutante *spt-10*, descrito inicialmente como un alelo de pérdida de función de *SPT*, muestra una reducción de la dormición en condiciones de luz sin estratificación. En base a estas observaciones se propuso que *SPT* reprimiría la germinación de semillas frescas en respuesta a luz y frío, y actuaría inhibiendo la expresión de *GA3ox1* y *GA3ox2* durante la imbibición (Penfield et al., 2005). Sin embargo, estudios recientes sobre la función de *SPT* en diferentes ecotipos de *Arabidopsis* han revelado que este factor de transcripción tiene efectos opuestos en la germinación de distintas accesiones. En fondo genético Ler, *SPT* funciona como un represor de la dormición, mientras que en fondo Col, la promueve (Vaistij et al., 2013). Estos datos contrastan con las observaciones previas descritas en Penfield et al., 2005, donde se muestra un fenotipo de reducción de la dormición en mutantes *spt-10* en fondo Ler. Resultados recientes muestran que este comportamiento del mutante *spt-10* es debido a un aumento de la expresión de *SPT* en este alelo mutante (Vaistij et al., 2013), lo que confirma que *spt-10* no sería un alelo de pérdida de función. Se ha descrito que *SPT* regula rutas antagónicas en el control de la dormición primaria, y que ambas funcionarían en ambas accesiones, aunque con resultados opuestos sobre este proceso de desarrollo. Así, *SPT* promueve la expresión de *ABI5* y *RGL3* pero también reprime la expresión de *ABI4*, *RGA* y *MFT*, aunque solo *RGA*, *ABI5* y *RGL3* serían dianas directas de *SPT*.

Según el modelo propuesto, en fondo genético *Ler*, los altos niveles de expresión de *ABI4*, *RGA* y *MFT* en el mutante *spt* anularían el efecto de la disminución en la expresión de *ABI5* y *RGL3*. Por el contrario, en fondo *Col*, la baja expresión de estos últimos genes en los mutantes *spt* dominaría sobre la sobreexpresión de *MFT* y *ABI4* (Vaistij et al., 2013). Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de las interacciones génicas que controlan la dormición de la semilla.

3. 2 Efecto de la luz en la regulación de la dormición.

La luz es otro factor medioambiental que modula la dormición de las semillas (Hennig et al., 2002; Penfield et al., 2005; Oh et al., 2004, 2006, 2009; Donohue et al., 2008; Piskurewicz et al., 2009), y de hecho se ha propuesto que los mecanismos moleculares que median la respuesta de dormición a temperatura y luz están íntimamente relacionados (Penfield et al., 2005). Las longitudes de onda más efectivas para promover la salida de dormición de semillas son las que se encuentran en la zona del espectro de luz roja, percibida a través de la acción de los fitocromos, principalmente PHYB (Shinomura et al., 1994). La activación de PHYB por la luz durante la germinación hace disminuir el nivel de ABA en las semillas, debido a que se reprimen genes de biosíntesis de esta hormona (*ABA1*, *NCED6* y *NCED9*), mientras que se inducen los de catabolismo de ABA (*CYP707s*) (Kim et al., 2008; Oh et al., 2008). Además, la activación de PHYB por la luz afecta al nivel de GAs y de la capacidad de respuesta a esta hormona en la semilla (Seo et al., 2009; Toyomasu et al., 1998). Genes de biosíntesis de GAs como *Ga3ox1* y *Ga3ox2* se activan en la semilla en respuesta a la luz, mientras que se reprimen genes de degradación de formas activas de GAs, como *Ga2ox2* (Yamauchi et al., 2007). Además de este efecto sobre la germinación, la luz parece influir también sobre la inducción de la dormición de semillas. La proporción de luz roja/luz roja lejana (R/FR) experimentada por la planta madre durante la maduración afecta al comportamiento de germinación de las semillas maduras (Bentsink y Koornneef, 2008). Además, se ha propuesto que las rutas mediadas por fitocromo se requieren para la salida de la dormición inducida por frío en la planta madre (Donohue et al., 2007).

Un componente de la señalización de la luz en semillas es PIL5, una proteína de tipo bHLH que inhibe la germinación, reprimiendo la expresión de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2*, e induciendo la expresión de *GA2ox2* durante la imbibición en oscuridad (Oh et al., 2006). Asimismo, PIL5 está también implicado en la regulación de la dormición reprimiendo la germinación de semillas frescas de *Arabidopsis* en

INTRODUCCIÓN

oscuridad, así como la expresión de los enzimas de biosíntesis de GAs GA3ox1 y 2 (Penfield et al, 2005). Durante el proceso de germinación, cuando el fitocromo es activado por la luz, la forma activa de PHYB interacciona en el núcleo con PIL5 y favorece la degradación de esta proteína fosforilada mediante el proteosoma 26S (Oh et al., 2006). Además, PIL5 actúa activando también la expresión de los genes que codifican las proteínas DELLA, GAI y RGA (Oh et al., 2007), por lo que este factor de transcripción modula a varios niveles las rutas de biosíntesis y degradación, así como las de señalización de GAs en la semilla. PIL5, junto con ABI3, activa la expresión de *SOMNUS* (*SOM*), otro represor de la germinación, uniéndose directamente a su promotor (Kim et al., 2008). Los mutantes *som* son capaces de germinar en oscuridad, y se ha propuesto que PIL5 regula los genes de metabolismo de GA y ABA, en parte a través de *SOM* (Cho et al., 2012). Se ha propuesto que la ruta regulada por el nodo PHYB-PIL5-SOM, que actúa modulando la organización de cromatina en los genes GA3ox, podría ser el principal controlador de la germinación dependiente de la luz (Cho et al., 2012).

La represión de *GA3ox1* por PIL5 está también mediada por la proteína DOF AFFECTING GERMINATION 1 (*DAG1*), que actúa aguas abajo de PIL5 y se une directamente al promotor de *GA3ox1* (Gabriele et al., 2010). Los factores de transcripción de tipo DOF (DNA-BINDING WITH ONE ZINC FINGER) *DAG1* y *DAG2*, que contienen un dedo de Zinc, se expresan exclusivamente en el tejido vascular de la planta madre, y tienen efectos contrapuestos sobre el potencial de germinación (Papi et al., 2000; Gualberti et al., 2002). El análisis de dobles mutantes muestra que *DAG1* activa genes maternos que promueven la dormición, mientras que *DAG2* reprime esta acción. Se ha propuesto que sus dianas podrían modificar características del embrión y de los tejidos que lo rodean, y que su expresión podría estar regulada por el ambiente, regulando la sensibilidad de la semilla a señales que inducen la germinación, como la luz o las GAs (Finkelstein et al, 2008) (Figura 8).

Otro miembro de la familia de factores de transcripción bHLH que se ha implicado en la regulación de la dormición de la semilla es *PIF6*. El gen *PIF6* se expresa a niveles altos durante el desarrollo de la semilla y su mensajero está sometido a maduración alternativa. La pérdida de función de *PIF6* ocasiona un aumento de la dormición primaria y la sobreexpresión de una de las variantes del mensajero produce una reducción de la dormición, lo que sugiere que este factor de transcripción está implicado en la regulación de este proceso (Penfield et al., 2010).

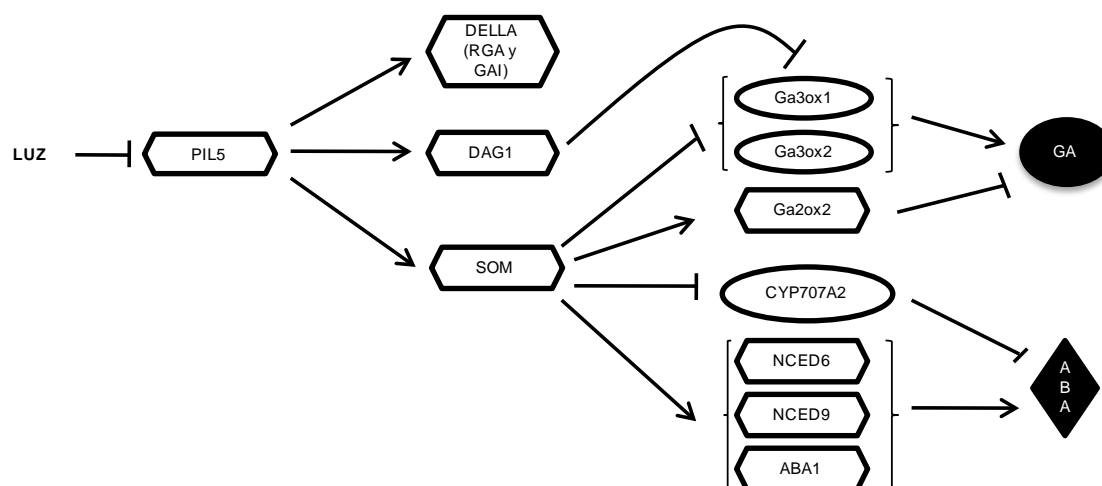


Figura 8. Regulación de los niveles de ABA y GA en semilla a través de PIL5. La proteína PIL5 se une al promotor de *SOM*, a las proteínas DELLA RGA y GAI y regula la expresión de DAG1. SOM activa la síntesis y señalización de ABA a través de *NCED6*, *NCED9* y *ABA1*, la degradación de GA a través de *Ga2ox2*, y además reprime la síntesis de GA e inhibe el catabolismo de ABA a través de *CYP707A2*. Por su parte, DAG1 reprime la síntesis de GA a través de *Ga3ox1*. Por último, PIL5 reprime la señalización de las GA y promueve la síntesis de ABA a través de RGA y GAI, tal y como se indica en la Figura 5.

3.3 Efecto de los compuestos nitrogenados en la inducción de la dormición.

Los compuestos nitrogenados, como nitrato o nitrito, también promueven la eliminación de la dormición en semillas embebidas, y se ha propuesto que probablemente este efecto se produzca a través de la producción de NO (Bethke et al., 2004, 2006; Arc et al., 2013). Se ha comprobado que el nitrato puede modificar los niveles de ABA en la semilla, tanto por nitrato exógeno, aportado en la imbibición, como endógeno, aportado por la planta madre (Ali-Rachedi et al., 2004; Matakias et al., 2009). De acuerdo con esto, se ha demostrado una relación positiva entre el nitrato y la expresión de enzimas que catalizan la degradación de ABA, como *CYP707A2* (Matakias et al., 2009). Además del efecto del nitrato en el metabolismo de ABA, el nitrato parece actuar disminuyendo la sensibilidad a ABA, y aumentando la biosíntesis de GA (*GA3ox1*), o incrementando su señalización (Bethke et al., 2006; Finkelstein et al., 2008; Matakias et al., 2009).

3.4 La participación del reloj circadiano en mediar el efecto de factores ambientales en el control de la dormición.

El reloj circadiano es un mecanismo celular endógeno de medida del tiempo que proporciona una ventaja adaptativa a los organismos, ya que les permite anticipar cambios diarios o estacionales y sincronizar con ellos determinados procesos

INTRODUCCIÓN

biológicos. Por tanto, la función del reloj circadiano es esencial para modular la respuesta de las plantas al ambiente (Dodd et al., 2005). De hecho, determinados factores ambientales como la luz y la temperatura afectan al sistema circadiano para “poner en hora” el mecanismo del oscilador central. El modelo actual del reloj circadiano comprende una serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa entre proteínas que se expresan a distintas horas del día (Penfield y Hall., 2009).

Se ha demostrado que la capacidad de promover la germinación por un pulso de luz roja lejana varía durante un periodo de 24h, sugiriendo la participación del reloj circadiano en el programa de germinación (Oliverio et al., 2007). Además, mutantes que afectan a genes que codifican componentes centrales del reloj como *GIGANTEA (GI)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* y *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* muestran alteraciones en la dormición de las semillas (Penfield y Hall., 2009). También se ha demostrado que los genes del reloj son esenciales para la regulación de la transcripción de enzimas necesarios para el metabolismo de GAs y ABA en semillas (Penfield y Hall., 2009). Puesto que el mecanismo del oscilador circadiano se sincroniza con factores ambientales como la luz, la temperatura, o la accesibilidad de compuestos de nitrato (McClung, 2006; Gutierrez et al., 2008), y tiene un papel en la regulación transcripcional del metabolismo de hormonas y de respuesta a éstas (Covington et al., 2008; Michael et al., 2008), es posible que el reloj circadiano sea responsable de transmitir las señales que regulan los mecanismos que controlan la dormición (Penfield y Hall., 2009).

4. Control de la dormición por la modificación de la cromatina.

El desarrollo de las plantas, al igual que el de otros organismos multicelulares, está controlado por patrones de expresión génica finamente regulados tanto espacial como temporalmente. Sin embargo, a diferencia de los organismos animales en los que la formación de órganos tiene lugar durante el desarrollo embrionario, en las plantas los procesos de organogénesis y diferenciación continúan a lo largo de todo su ciclo de vida, durante el cual atraviesan diversas fases de desarrollo. Cada una de estas etapas se caracteriza por presentar patrones de diferenciación celular específicos. Además, las plantas son capaces de modular su desarrollo en respuesta a condiciones medioambientales, y esta plasticidad les proporciona una gran ventaja adaptativa. Diferentes trabajos han puesto de manifiesto el papel central que desempeñan los procesos de remodelación de la cromatina en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión génica que gobiernan el desarrollo de las

plantas y además, que la organización de la cromatina proporciona un mecanismo que asegura la estabilidad de patrones de expresión a lo largo de las divisiones mitóticas que tienen lugar en una línea celular.

La cromatina es una estructura extremadamente dinámica y heterogénea, y la modulación de su funcionamiento implica diferentes procesos bioquímicos que modifican su organización, cambiando su accesibilidad a enzimas y factores de transcripción (Aalfs y Kingston, 2000). Estas modificaciones resultan en cambios en los niveles de expresión de genes subyacentes en respuesta a señales del desarrollo o a factores ambientales que acaban modulando procesos biológicos de diversa índole. Se han descrito diversos tipos de factores implicados en la reorganización de la cromatina y que participan en la regulación de procesos de desarrollo en plantas (Goodrich y Tweedie, 2002). Entre ellos se incluyen: 1) chaperonas de histonas, asociadas frecuentemente a la maquinaria de replicación del DNA y que participan en el ensamblaje de histonas impidiendo su agregación y facilitando la interacción de nucleosomas con otros factores; 2) enzimas remodeladoras de cromatina dependientes de hidrólisis de ATP, que modifican la interacción del octámero de histonas con el DNA facilitando el desplazamiento de nucleosomas con respecto al DNA; 3) enzimas que modifican el DNA metilando residuos de citosina, fenómeno que se ha asociado al silenciamiento génico y a procesos de imprinting; 4) complejos proteicos que modifican covalentemente los extremos de las histonas, añadiendo o eliminando grupos acetilo, metilo o fosfato, o péptidos como ubiquitina o SUMO, y que conjuntamente establecen un código (el llamado código de histonas) que refleja el estado transcripcional en el que se encuentra un locus determinado o una región del genoma. Diferentes modificaciones de histonas pueden a su vez depender de otras, si bien estas interacciones permanecen aún poco conocidas (Liu et al., 2011).

La naturaleza y la posición de las modificaciones de las histonas son cruciales para determinar el estado transcripcional de los genes, y mientras que algunas de ellas están típicamente asociadas con conformaciones transcripcionalmente activas, otras en cambio están asociadas con la represión de la expresión génica (Schmitz y Amasino, 2007). Generalmente, la hiperacetilación de las colas de histonas H3 y H4 está relacionada con la activación de la expresión de genes, mientras que la hipoacetilación de las mismas está asociada con la represión y el silenciamiento (Courey y Jia, 2001; Iizuka y Smith, 2003; He y Lehming, 2003). Sin embargo, la metilación de histonas puede estar asociada a ambos estados (Loidl, 2004; Tariq y Paszkowski, 2004): la trimetilación de H3 en los residuos de lisina 4 (K4), K36 y K79 está correlacionada con transcripción activa, mientras que la metilación de K9 y K27

INTRODUCCIÓN

de la histona H3, así como de K20 en H4 son marcas asociadas a cromatina silenciada (Fischle et al., 2003). La presencia de estas modificaciones en las histonas no es suficiente para provocar cambios en los niveles de expresión génica, sino que es necesaria la participación de proteínas efectoras que son capaces de reconocer específicamente dichas modificaciones y reclutar otros complejos para traducir el código de histonas de una región discreta de cromatina en patrones de expresión génica (Thorstensen et al., 2011). Desvelar el papel de estas proteínas efectoras será esencial para comprender cómo los mecanismos de modulación de la estructura de la cromatina controlan el desarrollo en plantas. Todos los mecanismos descritos anteriormente pueden interactuar y actuar de forma orquestada para definir el estado de actividad transcripcional de la cromatina.

En *Arabidopsis* se han identificado un gran número de proteínas implicadas en distintas actividades relacionadas con procesos de reorganización de la cromatina, muchas de las cuales están relacionadas con la regulación de procesos de desarrollo (Farrona et al., 2008; Jarillo et al., 2009; Graeber et al., 2012). En esta sección se discuten aquellas que tienen un impacto sobre la regulación de la dormición de semillas.

Las semillas secas representan un estado en el que la transcripción activa es muy baja o está ausente, aunque se ha demostrado que varios genes específicos de la maduración permanecen transcripcionalmente competentes en semillas secas (Comai y Harada, 1990; Zanten et al., 2011). Se ha propuesto que el nivel de compactación de la cromatina en el núcleo celular podría contribuir a la regulación de la expresión génica al modificar la accesibilidad del DNA para la maquinaria de transcripción (Tessadori et al., 2004; Fransz y Jong, 2011). Además del aumento de la condensación de la cromatina, se ha comprobado que durante la maduración de la semilla en *Arabidopsis* se produce una reducción en el tamaño del núcleo de los cotiledones embrionarios (Zanten et al., 2011). Sin embargo, la inducción de la dormición es independiente de la compactación de la cromatina y de la reducción del tamaño del núcleo durante la maduración, y se ha propuesto que esta reducción podría formar parte del mecanismo que establece la tolerancia a la desecación en la semilla (Zanten et al., 2011). Estas características se revierten durante la germinación (Zanten et al., 2011), que puede ocurrir sin transcripción activa, aunque requiere traducción probablemente a partir de mRNAs almacenados en la semilla (Rajjou et al., 2004).

4.1 Efecto de modificaciones de la cromatina que facilitan la transcripción sobre la dormición de la semilla.

Diversos estudios genéticos y bioquímicos han revelado factores de remodelación de la cromatina que son necesarios para una correcta regulación de la dormición y de la germinación. Un ejemplo es el factor HISTONE MONOUBIQUITINATION 1/REDUCED DORMANCY 4 (HUB1/RDO4), que fue identificado inicialmente por la reducción de la dormición que mostraron los mutantes *hub1/rdo4* (Liu et al., 2007). *HUB1* codifica una proteína nuclear necesaria para la monoubiquitinación de la histona H2B (H2Bub1), una marca de la cromatina asociada con transcripción activa (Sun y Allis, 2002; Kim et al., 2005; Zhu et al., 2005; Weake y Workman, 2008). En levaduras, RAD6, un enzima E2 ligasa de ubiquitina, y Bre1, un enzima tipo E3 ligasa de ubiquitina, son responsables de la monoubiquitinación de H2B. En *Arabidopsis* existen dos homólogos de Bre1: HUB1 y HUB2 (Liu et al., 2007), y tres homólogos de Rad6: UBC1, UBC2 y UBC3 (Kraft et al., 2005; Xu et al., 2009). La monoubiquitinación de H2B se produce en el residuo K146 de su extremo C terminal (Cao et al., 2008).

Para llevar a cabo la monoubiquitinación de la histona H2B, las proteínas HUB1 y HUB2 forman un heterotetrámero formado por dos moléculas de HUB1 y dos moléculas de HUB2. Este complejo recluta a las proteínas UBC1/UBC2, con funciones redundantes, hacia la cromatina de los genes diana para transferir la ubiquitina de UBC1/UBC2 a H2B (Zhu et al., 2005; Cao et al., 2008). La monoubiquitinación de H2B se ha descrito como un prerrequisito para que tenga lugar la metilación de la histona H3 en los residuos K4, K36 y K79 (Dover et al., 2002; Sun y Allis, 2002; Wood et al., 2003; Zhu et al., 2005; Liu et al., 2007; Cao et al., 2008). H2Bub1 es una marca necesaria para la iniciación y los primeros pasos de la transcripción, mientras que la deubiquitinación de H2B es importante para la elongación transcripcional (Liu et al., 2011). Se ha propuesto que podrían producirse muchas rondas de monoubiquitinación y deubiquitinación durante la elongación transcripcional (Cao et al., 2008). La deubiquitinación de H2B es llevada a cabo por UBP26/SUP32, una proteasa específica de ubiquitina (Sridhar et al., 2007). Se ha descrito que los mutantes *ubp26* muestran un incremento considerable de la monoubiquitinación de H2B (Sridhar et al., 2007), así como un aumento en la dormición de semillas (Zheng et al., 2011). Al igual que el mutante *hub1*, el triple mutante *ubc1 ubc2 ubc3* también muestra un fenotipo de dormición reducida (Liu et al., 2007). La pérdida de función de *HUB1* causa una disminución de la expresión de genes relacionados con el metabolismo y la respuesta a ABA como *NCED9*, *ABI4* y *CYP707A2* en semillas, así como una disminución en los

INTRODUCCIÓN

niveles de ABA (Liu et al., 2007), lo cual podría explicar, al menos parcialmente, el fenotipo de reducción de dormición observado en estos mutantes (Wang et al., 2013). Además, los mutantes *hub1* también muestran una reducción en la expresión de otros genes relacionados con la dormición como *DOG1*, *ATS2* y *PER1* (Liu et al., 2007). Si bien HUB1 y HUB2 participan en los mismos procesos en la planta, no tienen funciones redundantes (Liu et al., 2007). En Arabidopsis, se ha descrito también un papel para las proteínas HUB en la regulación de la cromatina de *FLC* y en el control de la floración (Cao et al., 2008). Así, los mutantes *hub1* y *hub2* presentan floración temprana, al inhibir la expresión de *FLC*, que actúa como un represor del inicio de la floración (Cao et al., 2008).

Recientemente, la caracterización molecular de otro mutante con dormición reducida, *rdo2*, permitió la identificación de otro gen implicado en la regulación de la dormición en Arabidopsis. *RDO2* codifica el factor de elongación de la transcripción S-II (TFIIS) (Liu et al., 2011). En levaduras, los homólogos tanto de HUB como de TFIIS interactúan con el RNA POLYMERASE II-ASSOCIATED FACTOR 1 COMPLEX (PAF1-C), para estimular la elongación transcripcional (Pavri et al., 2006; Lee et al., 2007; Weake y Workman, 2008). En Arabidopsis también se ha descrito la interacción entre HUB1/HUB2 con miembros del complejo PAF1 en el control de la floración (Cao et al., 2008). De hecho, se ha observado que varios mutantes de subunidades de PAF1-C como *vernalization independence 4 (vip4)*, *vip5*, *early flowering 7 (elf7)* y *elf8* muestran también reducción de la dormición así como alteraciones en la expresión de genes como *DOG1* y genes relacionados con el metabolismo de ABA, que podrían mediar el defecto en dormición observado en estos mutantes (Liu et al., 2011). Además, estudios recientes muestran que la reducción de la dormición de *rdo2* está causada por la disminución de la expresión de *DOG1* (Liu et al., 2011; Mortensen y Grasser, 2013). Estas observaciones sugieren que *DOG1* es una diana de estos tres remodeladores de la cromatina, que podrían ser necesarios para el mantenimiento de la dormición por *DOG1*. El PAF1-C por sí mismo no posee capacidad de modificar histonas, pero es posible que actúe de plataforma para el acoplamiento de enzimas modificadoras de histonas durante la activación transcripcional y la elongación (He, 2012). En el caso de la monoubiquitinación de H2B, se ha propuesto que PAF1-C reclutaría a UBC1/2 y a HUB1/HUB2 (Berr et al., 2011; Thorstensen et al., 2011). La dormición reducida observada en los mutantes del complejo PAF1 y el aumento de la expresión de sus componentes que tiene lugar al final de la maduración de la semilla han llevado a proponer que podrían ser importantes en esta fase, posiblemente contrarrestando los efectos negativos de la desecación de la semilla sobre la

expresión de genes (Liu et al., 2011). Es posible que factores asociados con el PAF1-C representen un mecanismo general para mantener la expresión de genes en núcleos deshidratados, con tamaño reducido y cromatina altamente compactada (Zanten et al., 2011).

4.2 Papel de la Metilación/Demetilación de histonas en la dormición de semillas.

Los niveles de metilación de residuos de K específicos de la histona H3 mediada por histonas metiltransferasas (HMTs) también parecen tener un papel central en modular los niveles de dormición de la semilla en *Arabidopsis*. En concreto, se ha demostrado que mutantes del gen *ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED 7 (ATXR7)/SET DOMAIN GROUP 25 (SDG25)* muestran una reducción de la dormición de sus semillas (Liu et al., 2011), además de otras alteraciones del desarrollo. ATXR7 forma parte del grupo de proteínas de la familia Trithorax (TrxG), que actúan antagonizando la función de proteínas del Grupo Polycomb (PcG). La familia Trx está constituida en *Arabidopsis* por doce miembros, siete de los cuales, ATX1/SDG27, ATX2/SDG30, ATXR3, ATXR7, SDG4/ASHR3, SDG8/ASHH2/EFS/CCR1 y SDG26/ASHH1, se han implicado en una o más funciones biológicas, metilando uno o más residuos de K de la histona H3, aunque solo algunas de ellas parecen tener un papel en el control de la dormición de semillas. La proteína ATXR7 media principalmente la mono-, di- y tri- metilación de H3K4 (Tamada et al., 2009). Se ha propuesto que ATXR7 podría ser un ortólogo de la HMT de levadura Set1 en *Arabidopsis* (Tamada et al., 2009).

ATX1/SDG27 también está implicado en la deposición de mono-, di- y trimetilación de H3K4 (Alvarez-Venegas et al., 2003; Tamada et al., 2009), y los mutantes *atx1* presentan alteraciones pleiotrópicas del fenotipo, entre las que se encuentra una reducción en el tiempo de floración (Alvarez-Venegas et al., 2003, Tamada et al., 2009). ATX2/SDG30 media la dimetilación de H3K4, pero sus mutantes no presentan defectos fenotípicos visibles (Saleh et al., 2008). Sin embargo el doble mutante *atx1 atx2* muestra mayor reducción en el tiempo de floración que *atx1*, indicando que sus actividades podrían ser redundantes, al menos en el control de la floración (Saleh et al., 2008; Pien et al., 2008).

El complejo PAF1 podría estar relacionado con la función de estas HMT ya que recluta a UBC1/2 y a HUB1/HUB2 para la deposición de H2Bub1, y posteriormente a ATX1 y a ATXR7 para la deposición de la H3K4me3 y el inicio de la transcripción de sus genes diana (Berr et al., 2011; Thorstensen et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

SDG8/ASHH2/EFS/CCR1 (SET DOMAIN GROUP8/ASH1 HOMOLOG 2/EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS/CAROTENOID CHLOROPLAST REGULATORY 1) se ha propuesto como la principal metiltransferasa de H3K36, y es necesaria para la deposición de las marcas H3K36me2 y H3K36me3 en la cromatina (Kim et al., 2005; Zhao et al., 2005; Xu et al., 2008). El dominio SET de SDG8 tiene una estructura similar a Set2, la HMT que metila H3K36 en levaduras (Baumbusch et al., 2001), por lo que podría ser su homólogo en Arabidopsis. Los mutantes *sdg8* de Arabidopsis muestran una reducción en los niveles de H3K36me2 y H3K36me3 en sus genes diana. Igualmente se ha propuesto que SDG8 podría mediar la deposición de H3K4me1, H3K4me2 y H3K4me3 (Ko et al., 2010; Hoppmann et al., 2011). Se ha descrito que los mutantes *sdg8* muestran un fenotipo de reducción en la dormición de las semillas, además de una aceleración de la floración (Zhao et al., 2005; Berr et al., 2010; Bassel et al., 2011). SDG8 se identificó como un regulador de transición del estado durmiente de la semilla a la germinación (Bassel et al., 2011). No se conocen las dianas de SDG8 en dormición, pero se ha especulado que un gen candidato podría ser *FLC*, ya que SDG8 regula la expresión de *FLC*, al menos en el control del tiempo de floración, y *FLC* participa en la regulación de la germinación (Kim et al., 2005; Chiang et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado defectos en los niveles de dormición en las semillas de mutantes *flc* (Liu et al., 2011, este trabajo).

KRYPTONITE/SU(VAR)3-9 HOMOLOG4 (KYP/SUVH4) es la principal HMT que lleva a cabo la dimetilación de H3K9 en Arabidopsis (Jackson et al., 2002) y también participa en el control de la dormición, regulando este proceso negativamente (Zheng et al., 2011). KYP/SUVH4 pertenece a la clase SU(VAR)3-9 de HMTs (Baumbusch et al., 2001). En general estas proteínas están implicadas en el silenciamiento de secuencias transponibles en la heterocromatina centromérica y pericentromérica. Sin embargo, la represión genética de transposones situados por ejemplo en promotores, puede indirectamente regular la actividad de genes importantes para el desarrollo (Thorstensen et al. 2011). *KYP/SUVH4* se expresa en todos los tejidos, pero los niveles más altos se observan en semillas embebidas (Zheng et al., 2011). Los mutantes *suvh4* muestran un aumento de la dormición de semillas, sensibilidad alterada a ABA, reducción en los niveles de metilación de H3K9 y un aumento de la expresión de varios genes que participan en el control de dormición como *ABI3*, *ABI4* y *DOG1* (Zheng et al., 2012). Por otro lado, la sobreexpresión de *KYP/SUVH4* en plantas de Arabidopsis provoca una disminución de la dormición de semillas (Zheng et al., 2011). La expresión de *KYP/SUVH4* está

reprimida por ABA e inducida por GA, por lo que podría mediar, al menos en parte, la señalización del balance ABA/GA en la dormición (Zheng et al., 2011; Graeber et al., 2012; Wang et al., 2013). Análisis genéticos han mostrado que *HUB1* es epistático sobre *KYP/SUVH4* (Zheng et al., 2011), lo que sugiere una posible relación funcional entre las marcas dependientes de estas proteínas.

Otro grupo de metiltransferas de histonas son las proteínas Enhancer of Zeste (E(z)), que están implicadas en la trimetilación de H3K27 y forman parte de los complejos Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), que median el silenciamiento transcripcional de genes (Bouyer et al., 2011; Müller et al., 2012). Existen datos experimentales que apoyan la implicación de H3K27me3 en la inducción de la dormición. Así, los alelos mutantes de *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)*, que codifica un componente del complejo PRC2, muestran un aumento en la dormición de semillas y defectos en la germinación (Bouyer et al., 2011). La deposición de H3K27me3 es esencial para la transición de la dormición a la germinación (Müller et al., 2012). Estudios transcriptómicos globales han mostrado que los mutantes *fie* presentan sobreexpresión de genes de la fase final de la maduración de la semilla, entre los que aparecen reguladores de la maduración (*ABI3*, *FUS3* y *LEC2*), moduladores más específicos (*FLC*) y factores de la señalización de ABA y GAs como *ABI4*, *DOG1*, *CHO1*, *SOM*, que están reprimidos por PRC2 (Bouyer et al., 2011; Graeber et al., 2012). El papel de PRC2 en las semillas en maduración parece contribuir a la acción antagónica de las dos hormonas ABA y GA sobre la germinación, inhibiendo reguladores positivos de ABA y negativos de la señalización de GA. En floración, PRC2 actúa en la represión estable del represor floral *FLC* tras la exposición prolongada al frío, por lo que se especula que un mecanismo parecido pudiera percibir este estímulo ambiental también en semillas (Bouyer et al., 2011).

PICKLE (PKL) codifica un factor remodelador de la cromatina de tipo CHD3, necesario también para la represión de genes regulados por proteínas de PRC2 como *LEC1*, *LEC2*, *ABI3* y *FUS3* en la germinación. Los mutantes *pk1* muestran caracteres embrionarios en plántulas, por lo que se ha propuesto que este factor remodelador de la cromatina es necesario para la correcta represión de los caracteres embrionarios durante la germinación (Dean Rider et al., 2003).

Los niveles de metilación de residuos específicos de las histonas no dependen únicamente de la actividad de HMTs, ya que esta modificación covalente puede ser eliminada por la acción de enzimas demetiladas de histonas. Hasta el momento se conocen dos grupos de demetiladas: LSD1 (Lysine-Specific Demethylase 1) y

INTRODUCCIÓN

proteínas con dominio Jumonji (JMJ) (Pedersen y Helin, 2010). El genoma de *Arabidopsis* contiene genes que codifican proteínas pertenecientes a ambos tipos de enzimas. Entre las proteínas portadoras de un dominio JMJ se encuentran algunas implicadas en la regulación de diversos procesos de desarrollo. Por ejemplo, EARLY FLOWERING 6 (ELF6/JMJ11) reprime la expresión de *FT*, y mutantes en *ELF6* muestran fenotipo de floración temprana y un aumento de la marca H3K4me3 en *FT* (Jeong et al., 2009). Otra demetilasa del residuo H3K4 mono- di- y tri- metilado es JMJ14/JMJ4. Mutaciones en *JMJ14/JMJ4* conllevan aumentos de los niveles de la expresión del integrador floral *FT*, así como de los niveles de H3K4me3 en la cromatina de este gen (Lu et al., 2010). Además, JMJ4 se une directamente a la región de inicio de la transcripción de *FT*, donde se observaron los mayores niveles de trimetilación de H3K4 (Jeong et al., 2009). Sin embargo, hasta el momento se desconoce el papel de estas proteínas con actividad demetilasa de H3K4me en los procesos de dormición y germinación.

Igualmente, se han identificado dos demetilasas de argininas (R), JMJ20 y JMJ22, que actúan como reguladores positivos de la germinación en la ruta PHYB-PIL5-SOM (Cho et al., 2012). Estas demetilasas reducen el nivel de H4R3me2, una marca asociada a la represión transcripcional, en la cromatina de *GA3OX1* y *GA3OX2* después de la activación de PHYB por la luz. En condiciones de oscuridad o con luz roja lejana, PHYB se localiza en el citosol en su forma inactiva (Pr), lo que permite la acumulación de la proteína PIL5. PIL5 actúa junto a ABI3 reprimiendo la expresión de *SOM*, el cual reprime directamente a *JMJ20/JMJ22*. Esto permite el mantenimiento de la marca represiva H4R3me2 en *GA3OX1* y *GA3OX2*, y contribuye a mantener la dormición de semillas de *Arabidopsis*. Como hemos dicho anteriormente, cuando se activa el PHYB por luz roja, la forma activa de este fitocromo (Pfr) se transloca al núcleo causando la degradación de PIL5. Así la transcripción de *SOM* no ocurriría y se desreprimiría la expresión de *JMJ20* y *JMJ22*, y las demetilasas codificadas por ambos genes pueden así demetilar H4R3, induciendo la expresión de *GA3OX1* y *GA3OX2* y la síntesis de GA, para promover la germinación de la semilla (Cho et al., 2012).

4.3 La acetilación de histonas en el control de la dormición de la semilla.

La acetilación de histonas, como la que se produce en los residuos H3K9, H3K14, H4K5 y H4K12, relaja la estructura de la cromatina y está asociada con la activación transcripcional (Kim et al., 2010; Jang et al., 2011). En cambio, niveles bajos de acetilación de histonas induce la compactación de la cromatina y por tanto, la

represión de genes (Marmorstein y Roth, 2001; Berger, 2007). La acetilación de histonas está catalizada por acetiltransferasas de histonas (HATs) y la deacetilación por deacetilasas de histonas (HDACs) (Tian et al., 2005; Hollender et al., 2008). La acetilación y deacetilación reversible de las colas de histonas es muy dinámica y puede sufrir ciclos rápidos de acetilación y deacetilación para facilitar la movilización y el restablecimiento de nucleosomas durante el tránsito de la polimerasa (Waterborg, 2002). También hay evidencias experimentales que implican a esta modificación de histonas en modular los niveles de dormición y la germinación de las semillas de *Arabidopsis*. Por ejemplo, HDA6 y HDA9 son deacetilasas de histonas que modulan la germinación de semillas, afectando la expresión de genes inducidos por ABA (Tanaka et al., 2008; Chen y Wu, 2010; Chen et al., 2010). Igualmente, HDA19 reprime genes específicos de la maduración durante la germinación (Tanaka et al., 2008; Zhou et al., 2013).

SNL1 y SNL2 pertenecen a la familia de proteínas SWI-INDEPENDENT3 (SIN3)-LIKE y son miembros del complejo HDAC-SNL en *Arabidopsis* (Bowen et al., 2010). En levaduras y mamíferos, SIN3 recluta a proteínas de unión a histonas RbAp46/RbAp48 y a HDAC1/HDAC2, que deacetilan histonas, resultando en un estado transcripcionalmente reprimido de la cromatina (Grzenda et al., 2009). En *Arabidopsis*, SNL1 también posee capacidad de reprimir la transcripción de manera dependiente de la actividad de HDAC *in vitro* (Bowen et al., 2010). Mutantes de pérdida de función de *SNL1* y *SNL2* muestran un aumento en los niveles de acetilación de K9/18 de la H3 (H3K9/18) y H3K14 (Wang et al., 2013). Existen datos genéticos que sugieren la redundancia funcional entre *SNL1* y *SNL2* en la regulación de la dormición de semillas en *Arabidopsis*, ya que los mutantes sencillos así como el doble mutante *snl1 snl2* muestran dormición reducida (Wang et al., 2013). SNL1 y SNL2 podrían actuar como componentes del complejo HDAC-SNL para modular la transcripción de genes implicados en las rutas del etileno y del ABA, modificando la abundancia de acetilación en sus histonas (Wang et al., 2013). Además, la expresión de los genes *SNL1* y *SNL2* puede ser inducida por ABA. El aumento de los niveles de *SNL1* y *SNL2* inhibe la hidrólisis de ABA y promueve la síntesis de ABA por la deacetilación de histonas de genes diana específicos (Wang et al., 2013). Por lo tanto, este mecanismo podría reforzar la señalización de ABA. Además, SNL1 y SNL2 reducen la acumulación de etileno, alterando la transcripción de genes de la síntesis de etileno o relacionados con su señalización (Wang et al., 2013). La dormición reducida de los mutantes *snl1*, *snl2* y *snl1 snl2* se corresponde con una disminución de la señal de ABA y un aumento de la señal de etileno (Wang et al., 2013). Por lo tanto,

INTRODUCCIÓN

SNL1 y SNL2 podrían representar un punto de convergencia antagónico entre el ABA y el etileno en la regulación de la dormición de semillas (Wang et al., 2013). Además, SNL1 puede interactuar con HDA19 *in vivo* (Wang et al., 2013). HDA19 es una de las HDACs mejor estudiadas en *Arabidopsis* y está implicada en un amplio rango de procesos del desarrollo y respuestas ambientales (Tian y Chen, 2001; Tian et al., 2003; Zhou et al., 2005; Long et al., 2006; Chen y Wu, 2010). HDA19 media la deacetilación de H3K9/14, H3K9, H4K12, y de H4 (Tian et al., 2005; Chen y Wu, 2010; Jang et al., 2011), solapando con el papel de SNL1 y SNL2 en la deacetilación de H3K9/18 y H3K14. Además, los mutantes *hda19* también muestran disminución de la dormición de semillas (Wang et al., 2013). Sin embargo, la reducción de la expresión de *HDA19* resulta en varios defectos fenotípicos pleiotrópicos (Wu et al., 2000; Tian y Chen, 2001; Tian et al., 2003; Zhou et al., 2005) que no se observan en los mutantes *snl*. Por ello, se ha propuesto que el complejo proteico SNL-HDA19 podría ser especialmente importante para deacetilar histonas de genes relacionados con la dormición de semillas durante la maduración.

Por último, el análisis de mutaciones en genes que codifican proteínas de la familia de deacetilasas de histonas HD2 revelan que estas HDACs también están implicadas en dormición y germinación (Wang et al., 2013). HD2B es una HD2 específica de plantas relacionada con la dormición, cuya expresión aumenta con frío y en semillas PM. El aumento de la expresión de HD2B se asocia con la reducción de la dormición de semillas y el aumento de la acumulación de GA en semillas durmientes *Cvi* (Yano et al., 2013).

En conclusión, todos estos datos indican un importante papel de las modificaciones de histonas en la regulación de la dormición y de la germinación (Tabla 1), probablemente actuando a nivel de la regulación de genes que participan en las rutas del metabolismo y de la respuesta a fitohormonas.

Gen	Función
<i>HUB1, HUB2</i>	Monoubiquitinación de H2B
<i>RDO2</i>	Elongación transcripcional
<i>VIP4, VIP5, ELF7, ELF8</i>	Transcripción
<i>ATXR7</i>	Metilación de H3K4 (me1, me2 y me3)
<i>SDG8</i>	Metilación de H3K36 (me2 y me3)
<i>KYP/SUVH4, SUVH5</i>	Metilación de H3K9 (me2)
<i>FIE (PRC2)</i>	Metilación de H3K27 (me3)
<i>PICKLE</i>	Necesario para represión por PRC2
<i>JMJ20 y JMJ22</i>	Demetilación de H4R3 (me2)
<i>HDA6 y HDA9</i>	Deacetilación de H3 y H4
<i>HDA19</i>	Deacetilación de H3K9/14, H3K9, H4K12 y H4
<i>SNL1 y SNL2</i>	Deacetilación H3K9/18 y H3K14
<i>HD2B</i>	Deacetilación de H3 y H4

Tabla 1. Proteínas remodeladoras de cromatina implicadas en el control de la dormición y de la germinación de semillas de Arabidopsis.

5. Antecedentes

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han demostrado que el locus *EBS* de Arabidopsis codifica una proteína nuclear que contiene un dominio BAH y un dominio dedo de Zn de tipo PHD (Piñeiro et al., 2003). Ambos tipos de motivos están presentes frecuentemente en proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica a través de cambios en la organización de la cromatina. De hecho, en nuestro laboratorio hemos demostrado que EBS se une a través de su dominio PHD a la marca H3K4me_{2/3}, y que es necesario para mantener niveles reducidos de acetilación de la histona H3 en la cromatina de *FT*, un regulador central del tiempo de floración en Arabidopsis que es diana directa de EBS (López-González, Tesis Doctoral 2010). Se han encontrado homólogos de EBS en todas las especies vegetales analizadas pero no en el resto de organismos eucarióticos, lo que sugiere que esta proteína podría ser parte de una familia de reguladores transcripcionales específicos de plantas. En Arabidopsis existe al menos un homólogo de EBS, SHORT LIFE (SHL) también implicado en la represión de la floración. SHL tiene funciones independientes de EBS en el control de la transición floral, y resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que SHL es necesario para la represión de otro integrador floral, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*. SHL regula directamente a *SOC1*, y al igual que EBS, es necesario para mantener bajos niveles de acetilación de la histona H3 en dicho locus (López-González, Tesis Doctoral 2010). Además del tiempo de floración, EBS está implicado en la regulación de otros aspectos del

INTRODUCCIÓN

desarrollo de plantas de *Arabidopsis*, puesto que los mutantes *ebs* muestran alteraciones pleiotrópicas del desarrollo, incluyendo defectos en la arquitectura de la inflorescencia, el desarrollo floral y también la dormición de la semilla (Gómez-Mena et al., 2001; Piñeiro et al., 2003). En concreto, los mutantes *ebs* presentan una reducción de la dormición de la semilla en comparación con plantas de tipo silvestre, lo que sugiere que *EBS* es necesario para reprimir la germinación de semillas de *Arabidopsis* durante el periodo de dormición (Gómez-Mena et al., 2001). Además, la germinación prematura de semillas frescas del mutante *ebs* requiere síntesis de GAs, ya que los dobles mutantes *ebs ga1-3* muestran la misma dependencia de la adición exógena de GAs para germinar que los mutantes *ga1-3* (Gómez-Mena et al., 2001). Sin embargo, el papel de *EBS* en los circuitos génicos que regulan este proceso de desarrollo en *Arabidopsis* permanecen desconocidos. Por ello, en esta tesis Doctoral decidimos analizar la contribución de este locus al control de la dormición de la semilla, y caracterizar en profundidad el papel de *EBS* en la regulación de este proceso.

OBJETIVOS



En el presente trabajo nos hemos planteado como objetivo general el estudio del papel de *EBS* y *SHL* en el control de la dormición de semillas de *Arabidopsis*. Ambos genes codifican proteínas que se han descrito previamente como reguladores de procesos de remodelación de cromatina relacionados con el control de la expresión génica, y que son necesarios para el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Con el fin de profundizar en el papel de *EBS* y *SHL* en el control de la dormición de semillas, nos propusimos abordar los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización del papel del gen *EBS* en el control de la dormición de semillas en *Arabidopsis*.
2. Estudio del posible papel del gen *SHL*, un homólogo de *EBS*, en el control de la dormición de semillas en *Arabidopsis* y de interacción con *EBS* en la regulación de dicho proceso.
3. Análisis molecular de la función desempeñada por *EBS* en el control de la dormición de la semilla.
4. Análisis de la posible interacción de *EBS* con otros factores remodeladores de cromatina en la regulación de la dormición de la semilla.
5. Identificación de otros reguladores transcripcionales que podrían participar en la regulación de la dormición.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Material vegetal.

En este trabajo se han utilizado las accesiones de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Landsberg *erecta* (Ler), Columbia (Col), C24 y Cape Verde Island (Cvi). Además, se han usado líneas mutantes obtenidas tanto en los bancos de semillas del Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASc, UK) y del banco de semillas Cold Spring Harbor Genetrap Database, como líneas facilitadas por distintos grupos de investigación (Tabla 2).

Los mutantes *ebs*, *shl* y los dobles mutantes *ebs shl*, así como las líneas sobreexpresoras 35::*EBS* en fondo Col, 35S::*EBS* en fondo Cvi, *pEBS::GUS*, y *pSHL::GUS*, fueron generadas en el laboratorio antes del inicio de este trabajo. Asimismo, las líneas mutantes *esd1*, *swc6* o el doble mutante *ebs sdg8*, proceden de nuestro laboratorio.

AGI	Nombre del gen	Línea mutante	Fondo Genético
At1g77950	<i>AGL67</i>	SALK_55989 (<i>agl67-1</i>) SALK_013790 (<i>agl67-2</i>)	Col Col
At1g28290	<i>AGP31</i>	SAIL_1178_A10 (<i>agp31</i>)	Col
At4g26740	<i>ATS1</i>	SAIL_191_B12 (<i>ats1</i>)	Col
At2g31650	<i>ATX1/SDG27</i>	SALK_149002.50.05.X (<i>atx1-2</i>) SALK_119016.30.60.x (<i>atx1-3</i>)	Col Col
At1g05830	<i>ATX2/SDG30</i>	SALK_074806.34.05.x (<i>atx2-1</i>)	Col
At5g42400	<i>ATXR7/SDG25</i>	SALK_149692 (<i>atxr7-1</i>) SAIL_446_F12 (<i>atxr7-2</i>)	Col Col
At1g02070	<i>At1g02070</i>	SALK_091010 (<i>At1g02070-1</i>) GT_5_99000 (<i>At1g02070-2</i>)	Col Ler
At3g60520	<i>At3g60520</i>	SALK_139810.47.15.x (<i>At3g60520-1</i>) SALK_126470.19.10.x (<i>At3g60520-2</i>)	Col
At3g07650	<i>COL9</i>	SALK_137167 (<i>col9</i>)	Col
At2g44950	<i>HUB1</i>	SALK_122512.55.75.x (<i>hub 1-4</i>)	Col
At1g55250	<i>HUB2</i>	SALK_071289.51.25.x (<i>hub 2-2</i>)	Col
At5g59450	<i>SCL11</i>	GK-791H08 (<i>scl11-2</i>)	Col
At3g46600	<i>SCL30</i>	SALK_139541C (<i>scl30-1</i>)	Col
At4g36390	<i>SPT</i>	ET7451 (<i>spt-10</i>)	Ler
At2g47260	<i>WRKY23</i>	SALK_003943 (<i>wrky23</i>)	Col

Tabla 2. Líneas mutantes obtenidas del NASC.

Además, para la realización de esta Tesis, diferentes laboratorios cedieron las semillas mutantes indicadas en la Tabla 3.

AGI	Gen	Alelo	Fondo Genético	Laboratorio de procedencia
At4g26080	<i>ABI1</i>	<i>abi1-3</i>	Ler	Medina, J.
At5g04240	<i>ELF6</i>	<i>elf6-4</i>	Col	Noh, Y.
At1g79730	<i>ELF7</i>	<i>elf7-2</i>	Col	Amasino, R.
At2g06210	<i>ELF8</i>	<i>elf8-1</i>	Col	Amasino, R.
At1g65480	<i>FT</i>	<i>ft-1</i>	Ler	Koornneef et al., 1980
At5g10140	<i>FLC</i>	<i>flc-3</i>	Col	Michaels y Amasino, 2001
At4g20440	<i>JMJ4</i>	<i>jmj4.1</i>	Col	Noh, Y.
At1g18100	<i>MFT</i>	<i>mft-2</i> <i>mft-3</i>	Col	Hao Yu
At3g12810	<i>PIE1</i>	<i>pie1-1</i>	Col	Amasino, R.
At3g03450	<i>RGL2</i>	<i>rgl2-5</i>	Ler	Lopez-Molina, L.
At1g07530	<i>SCL14</i>	<i>scl14-1</i>	Col	Gatz, C.
At1g77300	<i>SDG8</i>	<i>sdg8-1</i>	Col	Zhao et al., 2005

Tabla 3. Líneas mutantes cedidas por otros grupos para la realización de este trabajo.

1.1 Generación de líneas dobles mutantes.

Los dobles mutantes analizados en este trabajo se obtuvieron mediante el cruzamiento de mutantes simples y posterior selección de los mismos en la generación F2, usando marcadores moleculares para cada mutación. Para confirmar que las plantas seleccionadas eran dobles mutantes, se comprobó que en la generación F3 no se producía segregación alguna de los parentales.

2. Condiciones de cultivo.

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en sustrato universal con vermiculita (proporción 3:1), o en medio de cultivo MS o GM (medio MS suplementado con sacarosa al 2%) y plant-agar al 0,7% (Murashige y Skoog, 1962) para cultivo *in vitro*.

En el caso de semillas en sustrato universal, las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución acuosa con 70% de lejía comercial, 0,1% de Tritón X-100, y se aclararon hasta tres veces con agua estéril (Feinbaum et al., 1991; Shi et al., 2013). Alternativamente, las semillas se esterilizaron superficialmente mediante la exposición a una solución con 3% (v/v) de HCl en lejía

comercial, en un recipiente herméticamente cerrado durante 4 horas (Clough y Bent, 2000).

En el caso de cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron previamente durante diez minutos en una solución lejía comercial al 70%, Tritón X-100 al 0.1%, y se aclararon hasta tres veces con agua estéril. A continuación, las semillas se sembraron en placas Petri con medio MS suplementado con sacarosa al 2% y plant-agar al 0,7% (medio GM).

Una vez sembradas, las semillas se estratificaron durante tres días a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se transfirieron a cámaras de cultivo con las siguientes condiciones: 22°C de temperatura, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca fría de $\sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cuanto al fotoperiodo, se usaron tanto condiciones de día largo (DL, 16h luz/8h oscuridad) como de día corto (DC, 8h luz/16h oscuridad).

En el caso de la selección de líneas transgénicas, el procedimiento fue similar, pero las semillas de la generación T1, una vez esterilizadas, se sembraron a una densidad 50 semillas/cm², en medio GM sólido suplementado con el antibiótico correspondiente (higromicina a concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$). Una vez obtenidas las semillas de las generaciones T2, se sembraron en las mismas condiciones 200 semillas de cada línea de forma independiente, y las líneas transgénicas portadoras de una sola inserción de T-DNA se seleccionaron atendiendo a la tasa de supervivencia en medio selectivo en una proporción 3:1 de supervivientes a sensibles.

3. Análisis fenotípicos.

3.1 Ensayos de dormición de semillas.

Para realizar los ensayos de dormición se utilizaron semillas frescas, recogiénolas en el estadio 18 de la silicua (Smyth et al., 1990; Roeder et al., 2006), silicua a silicua, directamente de la planta, mediante unas pinzas. Las silicuas así recogidas, se limpiaron, se separaron las semillas y se sembraron inmediatamente en placas con 0,8% de Agar en agua. Las silicuas de cada línea procedían de un mínimo de 10 plantas diferentes. Las semillas no se esterilizaron con el fin de no alterar su estado de dormición.

Las placas conteniendo las semillas, sin estratificar y por triplicado, se cultivaron directamente en distintas condiciones experimentales de crecimiento. En los

MATIALES Y MÉTODOS

ensayos de crecimiento con luz blanca (LB), las placas de semillas se introdujeron en la cámara de cultivo in vitro en condiciones de fotoperiodo de 16h de luz/8 de oscuridad, 22°C de temperatura, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca fría de $\sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En los ensayos de cultivo en condiciones de oscuridad (OSC), las plantas se envolvieron en papel de aluminio, se cerraron en una caja, y se metieron en la misma cámara de cultivo in vitro, para que tuvieran condiciones de crecimiento similares a las anteriores. Las placas del ensayo de crecimiento a 16°C de temperatura se cultivaron en una cámara en condiciones de fotoperiodo de 16h de luz/8h de oscuridad, 65% de humedad relativa e iluminación con luz fluorescente blanca fría de $\sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Para los experimentos de luz roja se empleó una cámara de luces monocromáticas modelo E-30LEDL3 de la marca Percival Scientific Inc. (IA, USA), donde se expusieron las semillas durante 4 días a condiciones de luz continua monocromática (roja) (aproximadamente $10 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

El cálculo del nivel de dormición se realizó mediante la cuantificación del número de semillas germinadas. Se consideró que una semilla había germinado cuando se observaba la aparición de la radícula (Penfield et al., 2005). Para determinar el nivel de dormición de una línea concreta se contaron las semillas germinadas el día 5 después de la recogida y siembra, cuando el ensayo era en condiciones de luz blanca; el día 7, cuando el ensayo era en condiciones de oscuridad; y el día 15, cuando el ensayo era en condiciones de luz blanca y 16°C de temperatura. En cada uno de los experimentos se sembraron 3 repeticiones, con al menos 50 semillas de cada línea en cada repetición. Todos los experimentos de cuantificación de la dormición de semillas frescas se repitieron un mínimo de tres veces.

Con el fin de comprobar que las semillas que no germinaban en los ensayos de dormición se encontraban en un estado durmiente, pero eran viables, para cada ensayo se cuantificó la viabilidad de las semillas empleadas. Para ello, además de las placas de los diferentes ensayos, se sembró otra placa, que se estratificó durante 3 días a 4°C, antes de situarla en la cámara de cultivo durante 20 días. A continuación se determinó el porcentaje de semillas que germinaban, lo que permitió cuantificar la viabilidad de las semillas empleadas. Los datos de dormición obtenidos se expresan como porcentaje de germinación de semillas frescas relativo al porcentaje de semillas viables. En todos los experimentos llevados a cabo, las semillas empleadas presentaron al menos el 80% de viabilidad.

El conteo de las semillas germinadas se realizó de forma visual con ayuda de una lupa binocular (Leica S6E).

Las fotografías de la testa de las semillas se realizó con un microscopio Electrónico T-3000 (HITACHI).

3.2 Medida del tiempo de floración.

El tiempo de floración está directamente relacionado con el número de hojas predeterminadas en el momento de la aparición del primer botón floral (Koorneef et al., 1991). De acuerdo con esta premisa, se contabilizó el número total de hojas excepto los cotiledones, es decir, las hojas de la roseta y las hojas caulinares de la inflorescencia principal. Los datos se presentan como la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar. El tamaño de la muestra fue de al menos 20 plantas en condiciones de DC y de entre 30 y 50 plantas en DL. Todos los experimentos de cuantificación del tiempo de floración se repitieron al menos tres veces.

3.3 Ensayos relacionados con la respuesta a hormonas.

3.3.1 Ensayos de respuesta de la expresión de *EBS* a hormonas.

Los ensayos del efecto de hormonas en la expresión de *EBS* se realizaron con semillas de Col. Para ello, se colocaron 3 círculos de papel Whatman en cada una de las placas Petri, humedeciéndolos previamente con soluciones de concentraciones de 0,5 μ M para ABA y 100 μ M para GAs, respectivamente. Las placas se introdujeron en la cámara de cultivo *in vitro* en condiciones de 16 horas de luz/8 de oscuridad y se mantuvieron durante 1 día o 2 días, dependiendo del tratamiento de la muestra. Pasado este tiempo, se recogieron en nitrógeno líquido, y se congelaron a -80°C , hasta su procesado. La extracción de RNA y síntesis de cDNA se realizó siguiendo protocolos descritos (ver sección 8.1 y 8.2). La determinación de la expresión de *EBS* se realizó por técnicas de qRT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos.

3.3.2 Ensayos de dormición en respuesta a hormonas y a PAC.

Los ensayos de curvas de dormición se realizaron con GA, ABA y PAC. Para los ensayos con GA preparamos una solución madre a una concentración de 10 mM en etanol. A partir de esta, se prepararon soluciones seriadas a una concentración final en las placas de 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M.

Además se preparó una placa sin giberelinas como control. En el caso del PAC, inhibidor de la síntesis de GAs, preparamos una solución madre a una concentración de 1 mM, en etanol. A partir de esta se prepararon soluciones seriadas a una concentración final de 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M en el medio de cultivo. Igualmente, se preparó una placa sin PAC como control. En el caso del ABA, se preparó una solución madre a una concentración de 1 mM en metanol. A partir de esta solución se prepararon soluciones seriadas a una concentración final, en las placas de medio de cultivo, de 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M. Igualmente, se preparó una placa sin ABA como control. Para estos ensayos de dormición, en cada una de las placas de agar al 0,8% conteniendo diferentes concentraciones de GA, PAC o ABA, se sembraron las semillas frescas, de la manera descrita anteriormente.

3.4 Ensayos fenotípicos y de expresión con líneas de sobreexpresión inducibles mediante tratamientos con β -estradiol.

Para la generación de las plantas transgénicas de Arabidopsis de sobreexpresión inducible empleamos vectores portadores del casete XVE, que codifica un factor de transcripción quimérico capaz de activar la expresión génica en respuesta a tratamientos con β -estradiol. Los componentes moleculares de este sistema de inducción se encuentran descritos en detalle en la sección 5.2. Hemos empleado dos tipos de vectores XVE, el vector pMDC7 (Curtis y Grossniklaus, 2003), para la sobreexpresión inducible de *EBS*, y el vector pER8GW, que se utilizó en la colección de plantas del proyecto TRANSPLANTA (Coego et al., 2014).

Para los ensayos de dormición, se utilizaron placas de agar al 0,8% con las concentraciones de β -estradiol descritas en los ensayos correspondientes y semillas frescas sembradas de la manera que se ha descrito anteriormente. Para los ensayos de expresión en plantas inducidas por β -estradiol, el material vegetal se congeló con nitrógeno líquido en el momento de la recolección y se utilizó para extraer RNA total según el procedimiento que se describe en la sección 8.1.

4. Métodos de manipulación y análisis de DNA genómico vegetal.

Para el genotipado de plantas de Arabidopsis se obtuvo DNA genómico de una hoja de material fresco, que fue procesada en tubos eppendorf conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro, después de haber depositado el tejido y haber congelado su contenido en nitrógeno líquido. Para la homogenización del material vegetal el tejido

congelado se agitó en un molino agitador SILAMAT durante 5s (Schaan, Principality of Liechtenstein). El DNA genómico se purificó siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986). Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de PCR con las muestras de DNA genómico aislado, usando marcadores moleculares específicos de cada alelo mutante (Tabla 4).

La determinación de las concentraciones de las soluciones de DNA genómico, se realizó en geles de agarosa al 0,8% en tampón TBE (p/v), mediante la comparación con muestras de DNA de concentración conocida, o bien determinando la absorción a 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, ThermoScientific, USA).

Alelo	Directo	Reverso
<i>agl67-1</i>	TACAGTCCAGAAGCCACCAAC	AAGCCTCTAGCTAGTCAAACAGG
<i>agl67-2</i>	TACAGTCCAGAAGCCACCAAC	ATTCTCGTGGCAACGTTATG
<i>agp31</i>	ATTGACCCGAAATGTAGAGGC	TTTTATGGGTTTGTGCAGGTG
<i>ats1</i>	CACTTCTCCCCACTACCCTTC	TTAAAAATTTTGAGGGTTCGGC
<i>atx1-2</i>	CATCTCTTTTGTGGACTTGCTG	AACAATTTGTTCTGCAATGTG
<i>atx1-3</i>	ACCGGAGAACTTGTTAGACCG	TGCAGTTTTTGGTACCAAAGG
<i>atx2-1</i>	TTCCTCACCATGAAATAACGC	TTCATGGTTTTGGGATCTTTG
<i>atxr7-1</i>	TCTTGTGACAGGTGCAACTTG	AAACAAAGCTAGGCACAAGGC
<i>atxr7-2</i>	CATCTCTTCAGGGTTCCTTCC	GGTTTCCTCAGATTCTCAGC
<i>at1g02070-1</i>	CTCTTTTTGATGCCCGTTATG	TGAGCAACGTTGCTAGACATG
<i>at1g02070-2</i>	ATATGTTTTTCCCACCGTTC	GAGAGAGTGTGTTGCATGTGC
<i>at3g60520-1</i>	TGCATCCCACAAGTTTCTCTC	AGCTTGTACCTACGAGTGGCC
<i>at3g60520-2</i>	ATTGTGTCAAGATCATCGTGC	TCATGGTCATGAATTGATGATG
<i>col9</i>	ATTGGATCTTTTGAATTTGGGG	AGTGCCATGTCAACTTCATCC
<i>hub1-4</i>	TGGGAAAACATGGTATTGAGG	AGCTCCGACAAGAACTCAGTG
<i>hub2-2</i>	CATGGTACCACATCCAAGGTC	CCTCTTTAGGCCGATCAAAAC
<i>mft-2</i>	TCTAACCGAAAGCACCATGTC	CCGATGAGCTTTACTCTCTCG
<i>mft-3</i>	TACCTCTTGAGGGATTGTGC	TCTGTTGATCCTTTGGTGGTC
<i>rgl2-5</i>	GTAACCAAATCACAACAAAGA	GCTGCTAGCTTCCTCGTCAAA
<i>scl11-2</i>	GCAAGCCAATATACATCCACC	TCTTGGTTCGTTTTGCATACC
<i>scl14-1</i>	GGTCTCACCACACAAAAATAATG	TTTCTCAGCAGCTTGAAGAGC
<i>scl30-1</i>	ACAAGGTTACCGTGGGGTAAG	AGCTTCCTCAGTCAGGTTTCC
<i>sdg8-1</i>	CCTTCATCGCAATCGTAAATC	TTTTGCGCTAACTAGTTGGG
<i>spt-10</i>	TTTCATCCGTAGCAGATTTCC	AAAAATTGCGGATTTTAAGGG
<i>wrky23</i>	CGGTGGGTTTATCAACAAATG	ATTCTTGATCACGATTCACGG

Tabla 4. Marcadores moleculares de alelos mutantes empleados a lo largo de este trabajo.

MATIALES Y MÉTODOS

Las electroforesis de DNA se realizaron en geles de agarosa de concentración variable entre 0,8 y 4 % en TBE (p/v), en función del tamaño esperado de los fragmentos a resolver. El patrón de bandas se visualizó con el sistema de documentación de geles *Gel-Doc-XR* (Biorad). Para comprobar que las bandas amplificadas correspondían al gen de interés, se cortó la banda correspondiente, se purificó el DNA contenido en la misma y se llevó a cabo su secuenciación. La purificación de los fragmentos de DNA de las bandas de agarosa se realizó en columnas de separación (QIAquick GEL Extraction kit QIAGEN, Alemania; GeneClean Q-BIOgene, MP Biomedicals USA), y fue secuenciado por el servicio de secuenciación de la “Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid” de la UCM o por el Servicio de secuenciación de Secugen, S.L. Las secuencias así obtenidas, se analizaron con los programas informáticos Chromas 1.45, GENE RUNNER 3.02, y con las aplicaciones de comparación de secuencias *Blast 2 sequences* de la página web del servidor del NCBI, (www.ncbi.nlm.nih.gov), y de la aplicación *Blast* de la página web www.arabidopsis.org.

5. Técnicas de clonación y manipulación de ácidos nucleicos.

5.1 Clonación por Tecnología Gateway (GW).

Para la realización de clonación de DNA, se utilizó la tecnología Gateway (GW) (Invitrogen). Este método permite la recombinación de fragmentos de DNA entre plásmidos compatibles con el sistema GW, usando las secuencias de recombinación *att* presentes en dichos vectores, y dos enzimas denominadas LR clonasa y BP clonasa. Para utilizar este sistema se requiere que inicialmente se inserte, mediante el enzima clonasa BP, el fragmento de DNA de interés, flanqueado por dos secuencias de recombinación *att* B, en un plásmido pDONOR, con sitios de recombinación *att* P. Este enzima clonasa BP cataliza la recombinación e inserción del DNA de interés en el plásmido de entrada, obteniendo como resultado el clon pENTRY, con sitios de recombinación *att* L. A continuación se requiere otra reacción enzimática con la clonasa LR, en la que se produce la recombinación entre el plásmido pENTRY conteniendo el DNA de interés, con el vector de destino pDESTINY. Este vector contiene sitios de recombinación *att* R, así como los promotores, TAGS o motivos de interés. La introducción del gen empleado en el vector pDESTINY da lugar a un plásmido que contiene la construcción de interés fusionada al DNA introducido, flanqueado por sitios de recombinación *att*B.

5.2 Obtención de las construcciones plasmídicas utilizadas.

Para generar las construcciones necesarias para obtener líneas de sobreexpresión de EBS mediante inducción por β -estradiol, se utilizó el vector pMDC7 (Curtis y Grossniklaus, 2003), derivado del plásmido pER8, compatible con el sistema Gateway (Invitrogen), en el que se introdujo el cDNA de *EBS* (Piñeiro et al., 2003) procedente de un vector pDONOR201. El vector pMDC7 contiene un sistema inducible llamado XVE (Zuo et al., 2000), que codifica el factor de transcripción quimérico XVE bajo el control del promotor sintético constitutivo G10-90. XVE contiene el dominio de unión a DNA de LexA (residuos 1-87), el dominio de activación transcripcional de VP16 (residuos 403-479), y la región reguladora del receptor de estrógenos humano, ER, (residuos 282-595); además, esta construcción lleva el terminador E9 en el extremo 3' de XVE, el cual corresponde a las secuencias de poliadenilación del gen *rbcS E9*. Por su parte el gen de la higromicina fosfotransferasa está bajo el control del promotor y del terminador de la nopalina sintetasa (NOS). En presencia de β -estradiol, la hormona inductora, el factor XVE es activo y es capaz de inducir la expresión de *EBS*, clonado aguas debajo de un promotor que responde a XVE (*lexA -46*). En la Figura 1 se muestra el esquema gráfico del plásmido donde se ha insertado el cDNA de *EBS*.



Figura 1. Esquema del vector inducible por β -estradiol pMDC7. Esquema de la estructura del vector de clonación inducible por estrógeno pMDC7, derivado del plásmido PER8, compatible con el sistema Gateway.

Para generar los plásmidos de sobreexpresión de *SCL11* y *SCL30*, los cDNAs completos correspondientes a ambos genes se clonaron mediante el sistema Gateway (Invitrogen) en el vector de expresión pEarleyGate201, que porta un epítipo HA, y en el vector de expresión pEarleyGate202, con un epítipo flag, respectivamente. Ambos vectores además contienen un promotor 35S. Para ello se partió de clones de *SCL11* y *SCL30* en el vector pER8GW generados en el proyecto Transplanta. Mediante una reacción de recombinación, BP, con el enzima BP clonasa I (Invitrogen), se clonó el cDNA de *SCL11* y *SCL30* en el vector pDONOR 207. Una vez comprobado que el clon estaba correcto, mediante una reacción de recombinación LR con el enzima clonasa LR I (Invitrogen), se movilizaron los cDNAs de *SCL11* y *SCL30*, a los vectores de expresión pEarleyGate201 y pEarleyGate202, respectivamente.

5.3 Transformación genética de plásmidos de interés en cepas bacterianas.

A partir de las construcciones plasmídicas con nuestra secuencia de interés, se transformaron células de *Escherichia coli* y de *Agrobacterium tumefaciens*. Las cepas bacterianas empleadas se cultivaron en medio LB en presencia del correspondiente agente selectivo (Sambrook et al., 1989). Los cultivos de la cepa de *E. coli*, DH5 α se mantuvieron en agitación a 37°C durante 14–16 horas, mientras que la cepa *A. tumefaciens* AGL0, se cultivó a 28°C durante 48 horas.

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se utilizó el kit comercial *Z-Competent E.coli transformation buffer set* (ZymoResearch), y la transformación de las células se efectuó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* AGL0 se prepararon según el protocolo descrito por Mersereau et al., 1990, y las transformaciones se llevaron a cabo según el protocolo de Höfgen y Willmitzer (1998), mediante electroporación, utilizando el equipo Micro Pulser (Biorad). La obtención de DNA bacteriano se realizó siguiendo protocolos estándar (Sambrook et al., 1989).

5.4 Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

Las digestiones de DNA con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo mediante los métodos usuales (Sambrook et al., 1989), siguiendo en cada caso las recomendaciones específicas del fabricante.

6. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación genética de plantas de *Arabidopsis* se llevó a cabo mediante el método de infiltración descrito por Clough y Bent (1998). Para ello las plantas T0 se cultivaron tal y como se describió anteriormente, en condiciones de DL, hasta la aparición de la inflorescencia principal. Estas plantas T0 fueron sumergidas durante 5 minutos, en medio de infiltración, con una suspensión de células de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 portadoras de la construcción de interés. Posteriormente, las plantas infiltradas fueron llevadas de nuevo a la cámara de cultivo *in vitro*, con el fin de que se desarrollaran y se pudieran obtener las semillas T1. Estas semillas se esterilizaron y sembraron en condiciones de alta densidad en placas Petri con medio GM selectivo, para así obtener las plantas transgénicas resistentes, que posteriormente fueron trasplantadas a tierra. Para obtener líneas T3 homocigotas con

una sola inserción, se seleccionaron sólo aquellas plantas T2 que presentaban una segregación 3:1 de plantas resistentes a sensibles al antibiótico, y se llevaron a la siguiente generación las plantas que eran resistentes. De acuerdo con los datos de la segregación en la generación T3, se obtuvieron plantas homocigotas para la inserción en aquellas placas en las que había líneas que no segregaban plantas sensibles.

7. Métodos histoquímicos.

7.1 Ensayos histoquímicos para la visualización de β -glucuronidasa.

La actividad del gen *GUS*, que codifica para la actividad β -glucuronidasa, se reveló mediante incubación a 37°C de tejidos o plántulas transgénicas en solución GUS (100mM de NaPO₄ (pH 7.2), 2,5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-glucuronidasa, 0,5 mM K₃Fe (CN)₆, 0,5mM K₄Fe(CN)₆ y 0,25% de Triton X-100) durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución y se realizaron lavados sucesivos con etanol 70% (v/v). Para la observación de estas plantas se utilizó una lupa binocular (Leica S6E).

7.2 Tinción con rojo de rutenio.

El rojo de rutenio es un compuesto que tiñe el mucílago de las semillas. Para observar la tinción del mucílago, las semillas se sumergieron en una solución acuosa de rojo de rutenio al 0,03% (p/v), y posteriormente estas se observaron en una lupa binocular (Leica S6E).

8. Análisis de expresión.

El análisis de expresión de genes se realizó mediante experimentos de northern blot, de transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR semicuantitativa) e hibridación de los fragmentos amplificados con sondas radiactivas específicas, o de RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR o qPCR).

8.1 Extracción de RNA.

8.1.1 Extracción de RNA de semillas de Arabidopsis.

Para los análisis transcripcionales mediante RT-PCR o qRT-PCR a partir de RNA preparado de semillas de Arabidopsis, se recogieron semillas frescas de la manera descrita anteriormente. Después de limpiarlas, se sembraron inmediatamente

a una densidad de 25 semillas/cm², en placas Petri cubiertas de 3 capas papel Whatman humedecido con agua, y se mantuvieron en condiciones de cultivo *in vitro* con 16h de luz y 8 de oscuridad, durante 1 o 2 días, según el ensayo. Pasado este tiempo, se recogieron las semillas y se congelaron a -80°C, hasta su procesado. Para las muestras a 0 días (0d), las semillas fueron congeladas justo después de cosecharlas.

Para la extracción de RNA total de semillas se utilizó el kit de extracción de RNA con columnas *RNAqueous* junto con el reactivo *Plant RNA Isolation Aid* (Ambion, Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del recomendado por el fabricante, a partir de material vegetal congelado y posteriormente pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido. Además, se realizó un tratamiento en columna durante 15 minutos a 37°C con DNAsa libre de RNAsa, para eliminar cualquier rastro de DNA genómico en cada una de las muestras.

8.1.2 Extracción de RNA de plántulas de Arabidopsis.

Para la extracción de RNA se utilizó el kit de extracción de RNA con columnas microspin Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante tras homogeneizar el material como se ha descrito anteriormente. El tejido vegetal se obtuvo de plántulas cultivadas *in vitro* durante 10 días en condiciones de DL o 21 días en condiciones de DC.

8.2 Cuantificación y análisis de RNA.

La concentración de RNA total obtenido se cuantificó mediante técnicas de espectrofotometría (Sambrook et al., 1989), usando un NanoDrop ND-1000 (Termo Scientific, USA) o mediante electroforesis en gel donde se compararon las muestras de RNA a cuantificar con RNAs de concentración conocida.

Para la cuantificación por Northern blot del RNA mensajero de genes específicos, el RNA total se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1%, en presencia de formaldehído/formamida (Sambrook et al., 1989), lo que permitió comprobar la integridad de las muestras de RNA empleadas. El tampón empleado como electrolito fue MOPS 1X (Sambrook et al., 1989). Las muestras se desnaturalizaron 10 minutos a 65°C antes de cargarse en el gel de agarosa, diluidas en un tampón de carga compuesto por MOPS 10X, formaldehído, formamida y

bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989). A continuación el RNA total se transfirió a membranas Hybond–N+ (Amersham-Pharmacia) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Dichas membranas fueron hibridadas con sondas radiactivas que reconocían los mensajeros de interés, permitiendo su cuantificación.

8.2.1 Reacción de la transcriptasa reversa seguida de amplificación del cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT–PCR).

8.2.1.1 Cuantificación por RT-PCR e hibridación con sondas específicas.

Para la síntesis de cDNA total se utilizó el kit *Super-Script™First-Strand synthesis for RT–PCR* (Invitrogen, California USA), usando entre 1 y 3 µg de RNA total. Para los ensayos de RT-PCR, el cDNA resultante se diluyó 1:10 y se tomaron 2 µL para cada reacción de PCR de 20 µL de volumen final. Las condiciones de amplificación se ajustaron en cada caso con el fin de no saturar el resultado de la reacción. Para los genes analizados se realizaron reacciones de RT–PCRs con los cebadores que se describen en la Tabla 5. Se utilizó la expresión del gen *UBIQUITINA 10 (UBQ10)*, como control de carga de los experimentos.

Los fragmentos de DNA obtenidos tras la amplificación se separaron en electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a membranas Hybond–N+ (Amersham–Pharmacia), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Dichas membranas fueron hibridadas con sondas radiactivas específicas, que reconocían los productos de amplificación para los genes de interés, permitiendo la cuantificación de los niveles de expresión.

Sonda	Directo	Reverso
UBQ10	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGG ATGGT	CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAA CAGG
EBS	ATTGAAGAAGCAAAGAAGCTT	ACTGATTCTGCCAACATAG
CYP707A1	TCCATCGCTCAAGACTCTCTCC	ACCTCGTCTTTCCGAAGATCG
CYP707A2	CAATTCCTTCTTCGCCACTCG	GCCTCTGGTCCAATCATACGC
NCED9	ATCGACCGGAGAGATTTCGAAAG	TCACCTTCTCCTCGTCGTGAAC
ATS2	TTACTCGCGTCGCTTATCTTGG	TTAGAGTCGCTTCCGTGCTTTG

Tabla 5. Cebadores utilizados en los análisis de expresión de cada uno de los genes descritos.

8.2.1.2 Cuantificación por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

En los ensayos de qRT-PCR, el cDNA resultante de la reacción de RT se diluyó 1:10. Los ensayos de qRT-PCR se llevaron a cabo con el kit *FastStart Universal SYBR*

MATIALES Y MÉTODOS

Green Master (Rox), según el protocolo descrito por Roche, usando 1 o 2 ul de muestra de cDNA. Los cebadores utilizados para el análisis de expresión por qRT-PCR se describen en la Tabla 6. Los niveles de expresión relativa se normalizaron mediante la expresión de los genes constitutivos *UBQ10*, *ACTINA2* o *UBC21*. Dichos cebadores fueron diseñados mediante el programa primer3plus. Las secuencias diseñadas por este programa se comprobaron con el programa GENE RUNNER 3.02, con la aplicación Primer-BLAST de la página <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, y con la aplicación BLAST de la página www.arabidopsis.org, para asegurar su especificidad. Posteriormente también se comprobó la especificidad de los cebadores experimentalmente usándolos con diferentes concentraciones de cDNA molde, en la reacción de qRT-PCR.

Gen	Directo	Reverso
<i>UBQ10</i>	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGA TGGT	CGACTTGTTCATTAGAAAAGAAAGAGATAA CACG
<i>ACT2</i>	TGTCGCCATCCAAGCTGTTCTCT	GTGAGACACCATCACCAGAAAT
<i>UBC21</i>	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	TTGTGCCATTGAATTGAACCC
<i>EBS</i>	TGGTATCATCCTGCGTGTGT	CGCTTCGTTTCCACCTTAAC
<i>ABI5</i>	CAGTGGAATTGGAAGCTGAA	CTCGGGTTCCTCATCAATGT
<i>AGL44</i>	TTTTGGCAAAGAGAGGTTGC	TCCTTTTTGAGACGAACACCTT
<i>AGL67-1</i>	TGTCGTCCAGAGAAGGGAAC	ATGGGCCGAATTAGCTATCA
<i>AGL67-2</i>	TCGAGTTCGAACCAAATCC	TTTATTGAGCAAGCAGAGTTTTT
<i>AGP31</i>	GACGAAGCCACCTGTTACAC	TTCACCGTAGCACCTTCGAT
<i>ATS1</i>	AGGAAGTTTTATGCCGGTGA	CTCTATTTTGCCTGCGATCC
<i>ATS3</i>	CAAGGTGTATGCACCGAAAC	GAGAGCAGATAGGGTCATTCAAA
<i>At3g60520</i>	CAAAGAGCAAGCTGATCCAA	CCGACCGGTACGATCTCTT
<i>COL9</i>	AGACGATGATGGTCCTACCG	TCCATACCAAGGTTCCCCTA
<i>DREB19</i>	TGGCCATGACAAGACTCAGA	CCTCCCTGGTGATAACTGGA
<i>FLC</i>	AGCCAAGAAGACCGAACTCA	TTTGTCCAGCAGGTGACATC
<i>GASA2</i>	CCACTTATGAGCTTCACGTCC	TACCAGGTGGCACACAGTTG
<i>GASA4</i>	CCTCTTGACCCTCATTGTCC	TGCAAGCCTTGTGGTACTGT
<i>LEA</i>	CAATGCTATGGATGGGGAAC	TGGAAATTTTGTGGAAACC
<i>MFT</i>	ATCACTAACGGCTGCGAGAT	TCCAGTGGACCCATTCTCTC
<i>RGL2</i>	GAGGCGATTACCCAGGAG	CGCCGTGTAATCACGGTAA
<i>RING1A</i>	TGGAGACCAATCAGAGTTTATGG	GGCACAGAACTGTGGAGACA
<i>SCL11</i>	CCGGTGACCAAGATTTCTGT	TTGGTTCGTTTTGCATACCA
<i>SCL14</i>	TACATGTCGGTCTGCCCTTT	GAACCTCCTCCGCTGGTCTA
<i>SCL30</i>	TCGGGTGATCTAGAGGATGG	AGGGAGCAGGGAGCTTCGATTTCTTC TTCGATTTCTTC
<i>SOM</i>	AGCAATCAGCGTCTCCATCT	CCGTGAAATCGTTCATCTGT
<i>TSO2</i>	TGAAAACATCCACTCGGAGA	GAGAAGAAGATACCTTCGACGC
<i>WRKY23</i>	GACAGAGAGAGGCAAGAGTCG	CGTTACATGAAGCCGTTGTG

Tabla 6. Cebadores utilizados en los análisis de expresión por qRT-PCR de cada uno de los genes descritos.

8.3 Marcaje radiactivo de sondas e hibridación de ácidos nucleicos.

Tanto las membranas conteniendo RNA transferido tras la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Northern blots) como membranas portadoras de DNA procedente de aproximaciones de RT-PCR, se hibridaron con sondas marcadas radiactivamente. Los fragmentos de DNA utilizados como sonda para analizar la expresión del mensajero correspondiente se obtuvieron por amplificación mediante técnicas de PCR. Estos fragmentos de DNA fueron purificados mediante columnas de *QIAquick* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las sondas de DNA se marcaron con 40 μ Ci de α - 32 P-dCTP (Amersham-Pharmacia) mediante el método de extensión a partir de cebadores aleatorios desarrollado por Feinberg y Vogelstein (1983). Para ello se utilizó el sistema *Rediprime II DNA Random Prime Labelling system* (Amersham-Pharmacia). Después del marcaje, los nucleótidos no incorporados al DNA se eliminaron mediante el paso por columnas Microspin S200 HR (Amersham-Pharmacia). Las hibridaciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en tubos de vidrio conteniendo de 10 a 15 ml de solución de hibridación (Sambrook et al., 1989). Las membranas se prehibridaron a 65°C durante 2 horas y posteriormente se les añadió la sonda desnaturalizada, incubándose en agitación suave durante toda la noche. Tras la hibridación, las membranas se lavaron en condiciones cada vez más astringentes, comenzando con SSC 2X y 0,1% SDS hasta llegar a 0,2X SSC y 0,1% SDS. Todas las incubaciones de lavado se realizaron a la misma temperatura a la que se realizó la hibridación, durante 20 minutos. Finalmente las membranas fueron expuestas a películas radiográficas Hyperfilm (Amersham) entre pantallas intensificadoras a -80° C, durante el tiempo necesario para la visualización de la señal.

8.4 Análisis transcriptómico global de semillas de mutantes *ebs* y *spt-10*.

Para evaluar a nivel global los genes cuya expresión se encuentra desregulada en los mutantes *ebs* y *spt-10*, se utilizaron cristales con microordenamientos de DNA del tipo ATH1 de Affymetrix. El RNA para estos ensayos se extrajo de semillas frescas embebidas durante 1 día, utilizando para ello el kit de extracción de RNA con columnas *RNAqueous*, junto con el reactivo *Plant RNA Isolation Aid* (Ambion, Applied Biosystems). El diseño experimental se basó en 3 repeticiones independientes de cada uno de los genotipos analizados. Todo el protocolo de síntesis de cDNA, del marcaje de las sondas y de las hibridaciones fue realizado por la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid). La intensidad resultante de cada sonda

(CEL) tras la hibridación se procesó mediante el software Affymetrix Gene ChIP. Tras la normalización de los datos obtenidos, la estimación de la intensidad de la señal se realizó por el método “robust multi-chip average” (Bolstad et al, 2003), que determina un modelo lineal de tratamiento de datos tipo ANOVA, de dos vías. Los valores medios p -value y la probabilidades (log odds), de expresión diferencial, se calcularon con el modelo LIMMA (modelo lineal para datos de microordenamientos), utilizando para ello la base de datos affyImGUI (Irizarry et al., 2003).

El análisis de la ontología de genes (GO) de los genes más expresados diferencialmente (regulados positiva o negativamente), se llevó a cabo en el Centro de Análisis NetAffx: <https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/indx.affx>.

Por su parte, los diagramas de Venn se elaboraron utilizando la aplicación http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_venn_selector.cgi.

Para la clasificación funcional se utilizaron la base de datos MIPS con la aplicación http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html y la clasificación BAR con la herramienta http://bar.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_classification_superviewer.cgi.

9. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Para los ensayos de ChIP, se utilizaron aproximadamente 300 mg de semillas de plantas transgénicas expresando el cDNA de EBS fusionado a un epítipo MYC. Estas semillas se embebieron durante 1 día, siguiendo el protocolo explicado anteriormente. El protocolo de ChIP se adaptó de otros descritos previamente (Johnson et al, 2002; Tai et al., 2005; Oh et al, 2007; Xi et al., 2010).

Las semillas se fijaron con una solución de formaldehído 1% durante 45 minutos en vacío. Seguidamente se añadió glicina hasta una concentración final de 100 mM, y el tejido en suspensión se incubó durante 5 minutos más, también aplicando vacío. Posteriormente las semillas se homogenizaron en nitrógeno líquido y se añadió a cada muestra solución de reacción (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Tritón X-100 y 0,1% SDS), suplementada con pastillas de inhibidor de proteasas (“Protease Inhibitor Cocktail” de Sigma). La mezcla se sonicó para producir fragmentos de DNA de 200 pb a 1 kb. El 5% de las muestras de la cromatina solubilizada se guardó como control de input. El resto de las muestras se incubaron con bolas magnéticas acopladas a proteína G, (Dynabeads Protein G. Life

Technologies) durante toda la noche a 4°C. La mitad de estas bolas previamente habían sido incubadas con anticuerpo anti-MYC, que reconoce de forma específica dicho epítipo. Posteriormente, se lavaron las bolas 2 veces con solución de lavado con baja sal (150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Tritón X-100; 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH8) , 2 veces con solución de lavado con alta sal (500 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Tritón X-100; 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH8), 1 vez con solución de lavado con LiCl (0,25 M LiCl; 1% NP-40; 1% deoxycholato sódico, 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH8), 1 vez con solución de lavado con baja sal y 2 veces con TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1mM EDTA). Eluimos posteriormente las muestras, y la muestra control de input, en resina Chelex 10%, e incubamos 10 minutos a 95°C. Incubamos con proteína K durante 30' a 45°C, calentamos durante 10' a 95°C y transferimos el sobrenadante con el DNA inmunoprecipitado a un nuevo tubo.

Por último, se diseñaron parejas de oligonucleótidos de diferentes zonas genómicas del locus *AGL67*, para utilizarlas como sondas identificativas de la unión de EBS a la cromatina de *AGL67* (Tabla 7). El enriquecimiento en DNA de cada fragmento precipitado se determinó por qRT-PCR.

Región genómica	Directo	Reverso
AGL67 I	GCTTGTTTTGTTGGGTTACCA	GTGCGTATGCGTATGGATAAT
AGL67 II	TAGGCAAGTGCCAAGAAACC	CAAATGGTGAGCGGATAGAA
AGL67 III	TCCGCTCACCATTTGTA ACTC	CCGATGGTCACTGCAAATA
AGL67 IV	TTTGCAGTGACCATCGGATA	AGAACATGAGGAGGGCAAGA
AGL67 V	TCTTTTCCGGTCAAACAAGG	GTGGCTTCCACCAACAATTT
AGL67 VI	GACGTTTTGGCGAGGTACA	GGAAACTATGGCGCTGAAA

Tabla 7. Cebadores utilizados en los análisis de la presencia de *AGL67* en la región genómica de *EBS*.

RESULTADOS



1. Caracterización de la función del gen *EBS* en el control de la dormición de semillas en *Arabidopsis*.

1.1 Análisis de la expresión de *EBS* en semillas de *Arabidopsis*.

Estudios previos han demostrado que *EBS* muestra un patrón de expresión ubícuo en distintos tejidos y órganos de la planta de *Arabidopsis* tales como hojas, raíces, flores o tallo (Piñeiro et al., 2003). Puesto que *EBS* desempeña un papel en la represión de la germinación de la semilla durante el periodo de dormición, decidimos analizar si el mensajero de este gen se expresa también en la semilla. Para ello realizamos experimentos de qRT-PCR durante el proceso de germinación, empleando RNA extraído de semillas post-maduras, que son aquellas que han sido almacenadas durante el tiempo necesario para eliminar totalmente la dormición, o recién cosechadas, que mantienen altos niveles de dormición, y a las que nos referiremos como semillas frescas, tal y como se describió en la introducción. En la Figura 10A se puede observar que la expresión de *EBS* es detectable en semillas post-maduras de *Arabidopsis*, y que los niveles del RNA mensajero de *EBS* son significativamente superiores en semillas sin embeber (0d) que en semillas embebidas en agua durante un día (1d). Estos resultados indican que *EBS* se expresa también en la semilla y que su expresión disminuye durante el proceso de germinación.

Las giberelinas (GA) son fitohormonas que juegan un papel central en la regulación de la germinación de la semilla (Yamauchi et al. 2004). Por ese motivo quisimos determinar si estas hormonas modulan la expresión de *EBS* durante dicho proceso. Para ello, cuantificamos los niveles de expresión de *EBS* en semillas post-maduras embebidas en presencia de 100 μ M de GA, una concentración activa en la inducción de la germinación de semillas de *Arabidopsis*, durante diferentes periodos de tiempo (0, 1 y 2 días). Observamos que, al igual que en ausencia de GA, la expresión de *EBS* disminuye durante la germinación en presencia de esta hormona (Figura 10B). Con el fin de determinar si la aplicación de GA modula esta disminución de la expresión de *EBS*, comparamos los niveles de su mensajero en semillas embebidas durante un día en presencia y ausencia de GA. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con esta hormona no altera los niveles de expresión de *EBS* ni en semillas post-maduras (Figura 10C) ni en semillas frescas (Figura 10D). Por tanto, se puede concluir que la expresión de *EBS* disminuye progresivamente durante la germinación, y que esto es independiente de la adición de GA exógena. Puesto que el ácido abscísico (ABA) también desempeña un papel esencial en la regulación de la germinación y la dormición de la semilla (Parcy et al., 1994; Piskurewicz et al., 2009;

RESULTADOS

Linkies y Leubner-Metzger, 2012; Arc et al., 2013), quisimos averiguar también si la expresión de *EBS* está modulada por esta hormona. En ensayos similares a los descritos anteriormente para las GAs, pudimos comprobar que el nivel de expresión de *EBS* tampoco cambia como consecuencia del tratamiento con una concentración de 0,5 μ M de ABA, que es suficiente para inhibir la germinación (Figura 10E). Por tanto, la expresión de *EBS* también es independiente a la aplicación de ABA exógeno, lo que sugiere que estas hormonas no median la regulación transcripcional de este gen. En el gráfico 10F se muestra la media del porcentaje de germinación de las semillas utilizadas para estos ensayos. Estos datos nos permiten concluir que el comportamiento de dormición y germinación de las semillas utilizadas en estos ensayos se encuentra en valores normales, con un porcentaje de germinación de semillas frescas inferior al 20% del total, mientras que las semillas post-maduras completan el proceso de germinación en su totalidad.

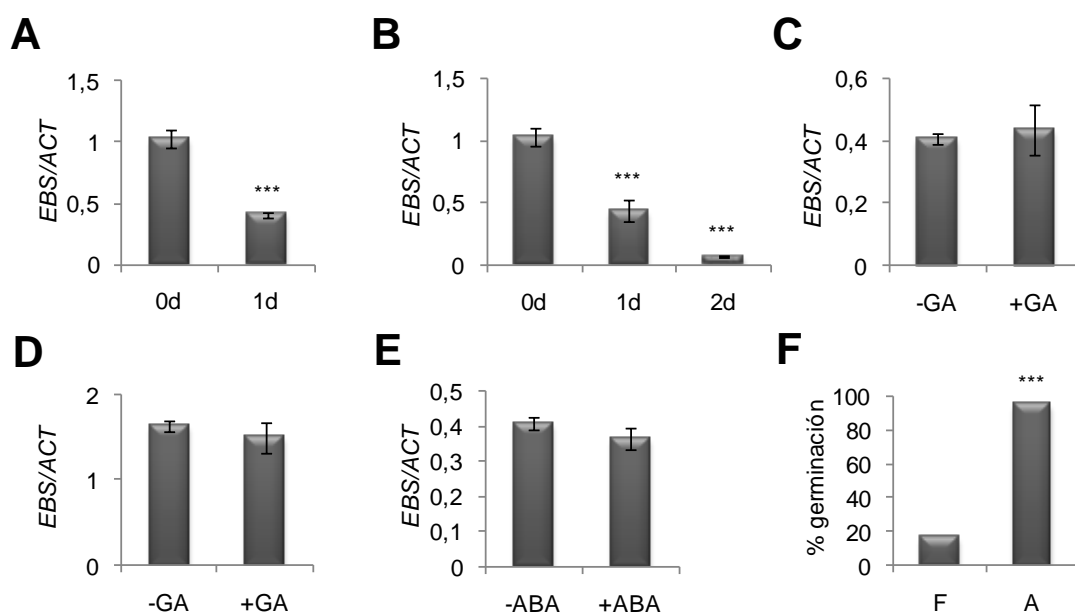


Figura 10. Expresión de *EBS* en semillas de *Arabidopsis* y su respuesta a ABA y GAs. A. Expresión de *EBS* en semillas post-maduras del tipo silvestre Col en el momento de la imbibición (0d representa tiempo 0 de imbibición), y embebidas durante 1 día (1d). B. Expresión de *EBS* en semillas post-maduras embebidas en presencia de GA 100 μ M durante 0, 1 o 2 días. En C y D se muestra la expresión de *EBS* en semillas post-maduras (C) o frescas (D) embebidas durante 1 día en presencia (+GA) o ausencia (-GA) de GA 100 μ M. E. Niveles de expresión determinados en semillas post-maduras embebidas durante 1 día en presencia de ABA a una concentración de 0,5 μ M (+ABA) o en ausencia (-ABA) de la hormona. F. Dormición media, medida como germinación a los 5d de las semillas utilizadas en los ensayos: semillas frescas (F) y semillas post-maduras (A). En A-E los datos de qRT-PCR para la expresión de *EBS* se han relativizado con respecto a los del gen constitutivo *ACTINA 2* (*ACT2*). Significación: *** = $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%.


```

EBS      1 MAKTRPGVASK- IK--TGRKEL-DSY-TIK--GTNK-VVR-AGD-CVLMR---PSDAGKP
SHL      1 M---P---KQ-KAP--RKQLK-SYK-LKHI--NKS I-QE-GDA-VLMRSSEP---GKP
          *   *   *   *   * * * * *   *   * *   * * * * *   *   * *
EBS      48 -PYVARVE-KIE-ADAR-NN--VKVHCRWYRPEESLGRRQFHGAKELFLSDHFD-VQS
SHL      40 S-YVARVEA-IET-DARGSHAKVRV--RWYRPEESI GRRQFHGAKEVFLSDHFDV-QS
          * * * * * * * * * *   * *   * * * * * * * * * *   * *
EBS      101 A-HTIEGKC-IVHTFKN-YTRLENVG-AEDYYCRFEY-KAAT-GAF-TPDRV-AVYCKCE
SHL      94 AD-TIEGKCK-VHSF-SSYTKLDSVGN-DDFFCRFEYN-S-TTGAFD-PDRV-TVFCKCE
          *   * * * * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * *
EBS      153 MPYNPDDL MVQCE-GC-KDWYHPACVGMT-IEEAKK-LDHF-VCAE-CS-SDDVVKKSQN
SHL      146 MPYNPDDL MVQCEE-CS-EWFHPS CIG-TTIEEAKKP-DNFY-C-EECSP---QQ-QN
          * * * * * * * * * *   * * * * *   * * * * *   * * * *
EBS      206 -----GFTSSPAD-D-V--K--VE-TK-R-R--KR
SHL      194 LHNSNS--TSN--NRDAKVNGRSLEVTKSKNKHTKR
          * *   * * * * *   * *   * *

```

Figura 11. Homología existente entre las proteínas EBS y SHL de Arabidopsis. Alineamiento de secuencia entre la proteína EBS y su homólogo SHL. Las estrellas indican aminoácidos idénticos en las dos proteínas.

Con el fin de determinar los tejidos de la semilla donde se expresa *EBS*, realizamos tinciones para la actividad GUS en semillas de líneas transgénicas portadoras de un gen reportador *GUS* que se expresa bajo el control del promotor de *EBS* (*pEBS*) (*pEBS::GUS*). Además, analizamos también mediante tinciones de GUS la expresión de *SHL* en plantas *pSHL::GUS*. *SHL* es un homólogo de *EBS* que desempeña funciones parcialmente redundantes con este último en el control de la transición floral en Arabidopsis (López-González, Tesis Doctoral 2010). La proteína SHL pertenece a la misma familia de reguladores transcripcionales de Arabidopsis que *EBS*, y contiene los mismos dominios funcionales que ésta (Müssig et al., 2000). Ambas proteínas presentan un alto nivel de homología, siendo idénticas en el 58% de sus residuos (Figura 11). Estas fusiones transcripcionales del gen reportador *GUS* a los promotores de ambos genes homólogos nos permitieron analizar la expresión de *EBS* y *SHL* en distintos estadios del desarrollo de la semilla y durante su germinación. Las muestras se tomaron tras diferentes días después de la polinización (DDP), y después de la imbibición (DDI) de semillas frescas. La Figura 12A muestra el patrón de expresión obtenido con las líneas *pEBS::GUS* y *pSHL::GUS*, en diferentes momentos del desarrollo de la semilla y de la fase inicial de la germinación. Como se observa, al analizar las líneas *pEBS::GUS* se detecta la expresión del gen reportador en los distintos estadios de desarrollo del embrión analizados durante la formación de la semilla, a los 4, 12, 16 y 20 días DDP, así como a 0 y 1d DDI. Al igual que en el caso de *EBS*, se observa la expresión del gen reportador *GUS* bajo el control del promotor de *SHL* en los distintos estadios analizados, si bien los niveles detectados de expresión del reportador *GUS* en semillas *pSHL::GUS* son ligeramente inferiores.

RESULTADOS

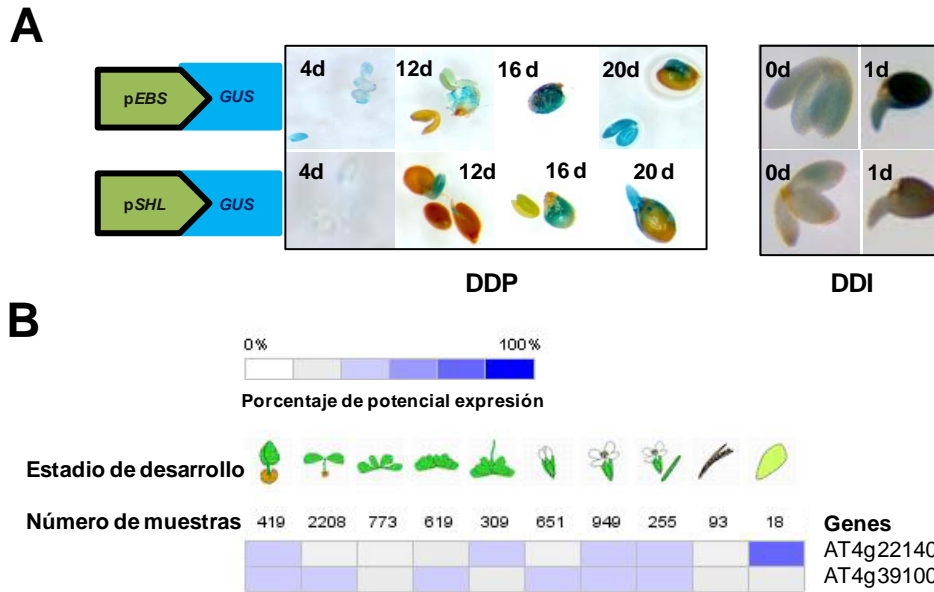


Figura 12. Los genes *EBS* y *SHL* se expresan a lo largo del desarrollo de la semilla y en los estadios iniciales de la germinación. A. Expresión del gen *GUS* bajo el control de los promotores de los genes *EBS* y *SHL* en distintos estadios del desarrollo de la semilla y la germinación. Muestras de semillas en desarrollo recogidas tras diferentes días después de la polinización (DDP) (4, 12, 16 y 20 días) y de semillas frescas después de imbibición (DDI) (0 y 1 día). B. Gráficos representativos de la expresión de *EBS* (At4g22140) y *SHL* (At4g39100) en diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis*, obtenidos de la base de datos GENEVESTIGATOR.

Además utilizamos información disponible en bancos de datos públicos que contienen atlas de expresión de genes de *Arabidopsis* y otros organismos. Tal como se observa en la Figura 12B, según GENEVESTIGATOR (www.genevestigator.com), *EBS* y *SHL* se expresan en todos los tejidos analizados de *Arabidopsis*, aunque a diferentes niveles. En semillas, *EBS* tiene unos altos niveles de expresión mientras que *SHL* se expresa a niveles mucho más bajos. Todas estas observaciones confirman que tanto *EBS* como *SHL* se expresan en la semilla, lo que es consistente con un posible papel de estos genes en la regulación de los procesos de dormición y/o germinación.

1.2 Interacción entre *EBS* y factores ambientales en el control de la dormición de la semilla.

La dormición de la semilla es un proceso de desarrollo modulado por condiciones ambientales (Graeber et al., 2012). Las semillas durmientes de *Arabidopsis* y de otras muchas especies, requieren tanto luz como frío (estratificación) para germinar. Las longitudes de onda más activas para romper la dormición son las

correspondientes al espectro del rojo, captadas por los fitocromos. La luz y las bajas temperaturas promueven la biosíntesis de GA, hormona que promueve la germinación de la semilla (Yamauchi et al. 2004). Con el fin de comprender el papel de *EBS* en la regulación de la dormición, hemos analizado la influencia que tienen sobre este aspecto del fenotipo del mutante *ebs* factores ambientales como la luz y la temperatura. Para ello, hemos determinado la capacidad de germinación de semillas frescas del mutante *ebs* en condiciones de luz y de oscuridad, y en combinación con tratamientos de estratificación o en ausencia de dichos tratamientos. En todos los casos, los niveles de germinación se han relativizado al número de semillas viables en los lotes de semillas empleados en estos ensayos que se estableció cuantificando el número de semillas que germinan tras un tratamiento saturante de estratificación.

La dormición de la semilla se rompe después de un almacenamiento prolongado (semanas o meses), tras el cual las semillas han salido de dormición (semillas post-maduras), y pueden germinar de forma eficiente en todas las condiciones ensayadas. Sin embargo, al contrario que las semillas post-maduras, las semillas frescas del tipo silvestre *Ler* requieren tanto luz como estratificación para germinar (Figura 13). Por el contrario, las semillas del mutante *ebs* muestran una reducción considerable de la dormición en ausencia de estratificación y en condiciones de luz blanca, ya que una proporción elevada de dichas semillas es capaz de germinar en estas condiciones. Estas observaciones son consistentes con datos previos que sugerían la implicación de *EBS* en el control del proceso de dormición de la semilla de *Arabidopsis* (Gómez-Mena et al., 2001). En condiciones de oscuridad, las semillas frescas del mutante *ebs* muestran niveles bajos de germinación, aunque superiores a las semillas del tipo silvestre. Además, si las semillas frescas del mutante *ebs* se someten a un tratamiento de estratificación de 3 días de duración, se elimina la dormición de la semilla en oscuridad (Figura 13B). Este tratamiento, sin embargo, no es suficiente para eliminar totalmente la dormición de las semillas de tipo silvestre (Figura 13B). Por lo tanto, y de acuerdo con nuestras observaciones previas (Gómez-Mena et al., 2001), *EBS* participa en el mantenimiento de la dormición, y además media la respuesta a la luz y la temperatura en la germinación de las semillas durante el periodo de dormición.

RESULTADOS

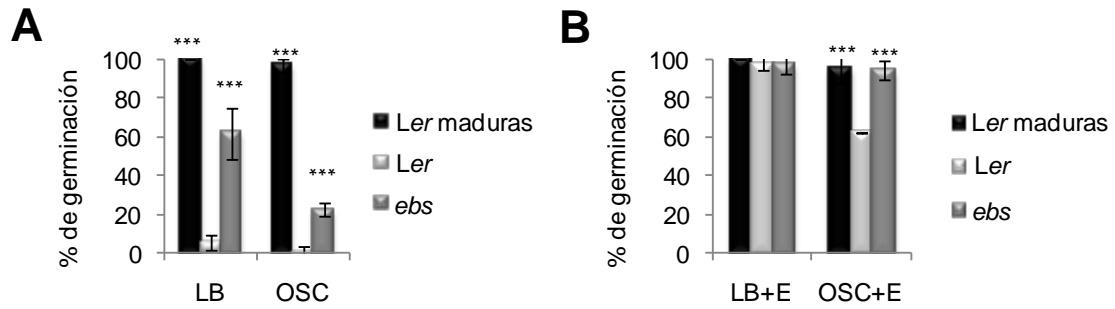


Figura 13. Fenotipo de dormición de semillas del mutante *ebs* en distintas condiciones ambientales que modulan la germinación. A. Dormición de semillas de *Ler* post-maduras y de semillas frescas de *Ler* y *ebs*, 5 días después de la imbibición (DDI), en condiciones de luz blanca (LB) y oscuridad (OSC). B. Dormición de semillas de *Ler* post-maduras, y de *Ler* y *ebs* frescas en condiciones de luz blanca (LB) y en oscuridad (OSC), tras un período de estratificación (E). La dormición se cuantificó como porcentaje de germinación de semillas relativizado al número total de semillas viables en cada lote empleado. La viabilidad de cada lote se determinó midiendo la proporción de semillas que son capaces de germinar tras un tratamiento saturante de estratificación. En general, la viabilidad de los lotes empleados fue siempre superior al 80 %. Significación: *** = $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%.

La respuesta de germinación de la semilla está mediada fundamentalmente por la luz roja (Hennig et al., 2002; Oh et al., 2004; Franklin et al., 2010). Puesto que *EBS* es necesario para la represión de la germinación de la semilla durmiente en luz blanca, nos propusimos determinar si esta represión era dependiente también de luz roja. Para ello, comparamos la germinación de semillas frescas de *Ler* y *ebs*, y semillas de *Ler* post-maduras en condiciones de luz blanca y de luz monocromática roja. Como se observa en la Figura 14, la germinación de las semillas del mutante *ebs* se comporta de forma muy similar en ambas condiciones de luz, lo que sugiere que *EBS* también participa en la represión de germinación bajo condiciones de luz roja.

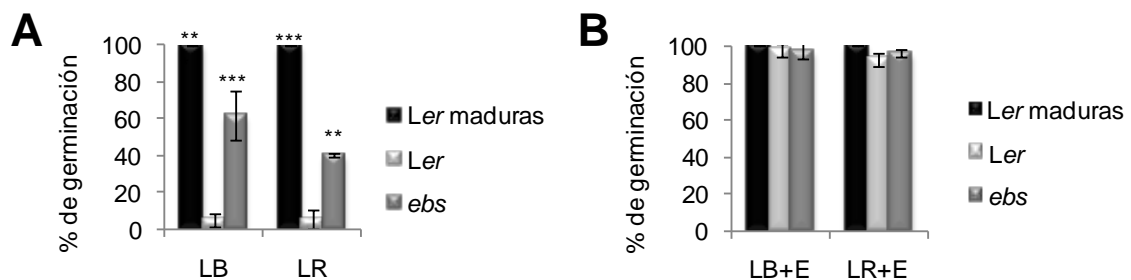


Figura 14. Fenotipo de dormición de semillas del mutante *ebs* en distintas condiciones lumínicas. A. Dormición cuantificada como germinación de semillas de *Ler* post-maduras y de semillas frescas de *Ler* y *ebs* a los 5 DDI, en condiciones de luz blanca (LB) y luz roja (LR). B. Dormición cuantificada como germinación de semillas de *Ler* post-maduras, y de *Ler* y *ebs* frescas en condiciones de luz blanca (LB) y luz roja (LR), tras un período de estratificación (E). Significación: ***= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y del 99%, respectivamente.

1.3 Efecto de la sobreexpresión de *EBS* sobre la dormición de la semilla.

1.3.1 Sobreexpresión constitutiva de *EBS*.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que la sobreexpresión de *EBS* en líneas transgénicas de *Arabidopsis* produce una aceleración del tiempo de floración, un fenotipo similar al que originan las mutaciones de pérdida de función (Piñeiro et al., 2003). Igual que con *EBS*, este efecto se ha observado al sobreexpresar otros represores de floración que participan en procesos de remodelación de cromatina (Berr et al., 2011), y es probablemente debido a que estas proteínas forman parte de complejos proteicos que modulan la conformación de la cromatina para controlar la expresión de sus genes diana. Es posible que la sobreacumulación de uno de los miembros del complejo pueda alterar la estequiometría entre las diferentes subunidades del mismo, afectando a su composición, estabilidad o funcionamiento. Para comprobar si la sobreexpresión de *EBS* produce el mismo efecto sobre la dormición de las semillas que su pérdida de función, analizamos el comportamiento de dormición de semillas de la línea Tn13.3, que expresa *EBS* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S (35S::*EBS*) y provoca un aumento significativo en los niveles de RNA mensajero de *EBS* (Piñeiro et al., 2003; López-González, Tesis Doctoral 2010). En la Figura 15A observamos que en semillas frescas que sobreexpresan *EBS*, se produce una reducción significativa de la dormición, similar a la que se produce en el mutante *eps*, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. En la figura 15B se muestra el porcentaje de germinación de estas mismas semillas tras una exposición a frío durante 3 días, donde las semillas analizadas germinan totalmente. Los resultados obtenidos indican que al igual que en el caso de la floración, la sobreexpresión de *EBS* produce una desregulación de la dormición de la semilla, similar a la observada en semillas del mutante *eps* de pérdida de función (Figura 15).

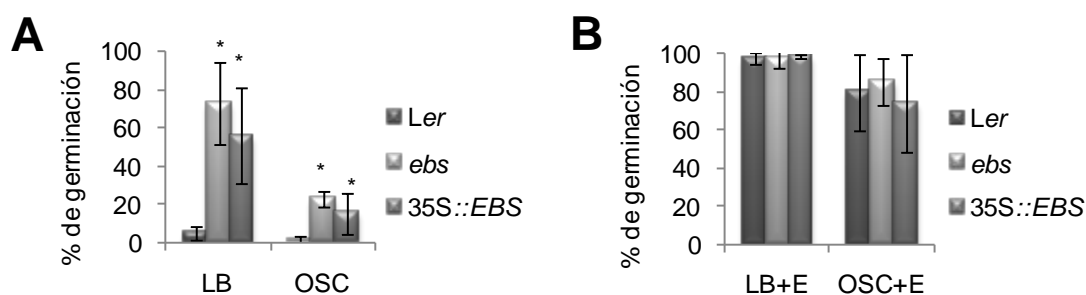


Figura 15. Fenotipo de dormición de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *EBS* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S en fondo genético *Ler*. A. Dormición cuantificada como germinación de semillas frescas de *Ler*, *eps* y 35S::*EBS* en condiciones de LB y OSC. B. Dormición

RESULTADOS

cuantificada como germinación de semillas frescas de *Ler*, *ebs* y *35S::EBS* en condiciones de LB y OSC, después de 3 días de estratificación (E). Significación: $*=p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 95%.

Se han descrito diferencias en los niveles de dormición de la semilla entre distintas accesiones de *Arabidopsis*, y de hecho este proceso ha sido estudiado desde el punto de vista de variación natural (Alonso-Blanco et al., 2003; Bentsink et al., 2010; Barua et al., 2011; Nguyen et al., 2012). Con el fin de determinar si el fondo genético establecía diferencias en la respuesta de dormición mediada por *EBS*, analizamos el efecto de su sobreexpresión constitutiva y/o de su pérdida de función en diferentes accesiones de *Arabidopsis*. En primer lugar, determinamos si el fenotipo de dormición observado en semillas de mutantes *ebs* y líneas *35S::EBS* en fondo *Ler*, también está presente en semillas en fondo *Col*. Como se observa en la Figura 16, en condiciones de luz, de oscuridad y después de estratificar, las semillas frescas del mutante *ebs* y de las líneas de sobreexpresión *35S::EBS* en fondo *Col*, presentan una reducción significativa de la dormición en comparación con el tipo silvestre *Col*. Este comportamiento es similar al observado previamente en semillas de tipo silvestre *Ler*, por lo que se puede concluir que el control de la dormición mediado por *EBS* es independiente del fondo genético.

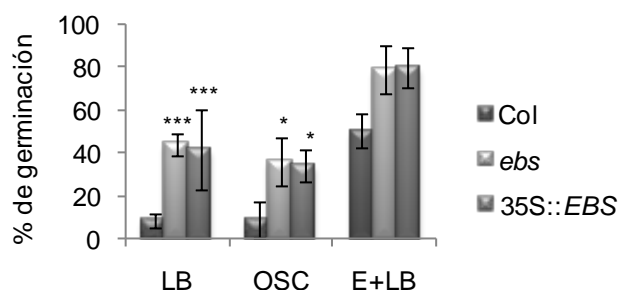


Figura 16. Fenotipo de dormición de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan *EBS* bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S* en fondo genético *Col*. Dormición cuantificada como germinación de semillas frescas *Col*, *ebs* y *35S::EBS* en condiciones de LB, OSC y después de estratificación (E+LB). Significación: $***=p \leq 0,005$, $*= p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente.

Tanto *Col* como *Ler* son ecotipos frecuentemente usados en el laboratorio, pero muestran niveles bajos de dormición de la semilla (Penfield et al., 2005; Liu et al., 2007; Bassel et al., 2011; Liu et al., 2011; Zheng et al., 2011; Nakabayashi et al., 2012; Vaistij et al., 2013). Por ello, quisimos analizar el efecto de *EBS* sobre el fenotipo de dormición de accesiones de *Arabidopsis* con niveles altos de dormición de la semilla, como es el caso de *Cvi* (Alonso-Blanco et al., 2003), y determinar si *EBS* podría

desempeñar un papel en el control de la dormición también en ecotipos muy durmientes. Puesto que no disponemos de líneas mutantes para *EBS* en fondo Cvi y la sobreexpresión de *EBS* causa efectos similares a la pérdida de función en las accesiones *Ler* y *Col*, decidimos ensayar el efecto de la sobreexpresión constitutiva de *EBS* en fondo Cvi. Para ello, generamos líneas transgénicas 35S::*EBS* en plantas de *Arabidopsis* de este ecotipo. En la Figura 17 se observa que el nivel de expresión de *EBS* en la línea de sobreexpresión en fondo Cvi es mayor que en el correspondiente tipo silvestre. Además, puesto que la construcción empleada es portadora de un gen reportador *GUS* bajo el control del promotor CaMV35S, las plantas empleadas en estos ensayos muestran expresión constitutiva de este marcador (Figura 17C).

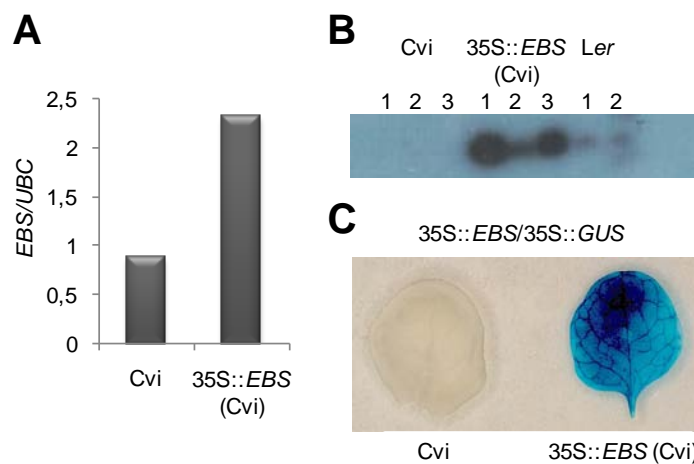


Figura 17. Expresión de *EBS* en líneas de sobreexpresión 35S::*EBS* generadas en fondo genético Cvi. A. Expresión de *EBS* en semillas frescas embebidas de Cvi y 35S::*EBS* en fondo Cvi después de someterlas a un tratamiento de 7 días en oscuridad a 4°C y 1 día en LB, medida mediante técnicas de qRT-PCR. Los valores de expresión se han relativizado con los de *UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 21 (UBC)*. B. Expresión de *EBS* en plantas de Cvi, 35S::*EBS* (Cvi) y *Ler*, por RT-PCR semicuantitativa. 1, 2 y 3 corresponden a preparaciones de cDNA de plantas independientes. C. Tinción de actividad GUS en hojas de plantas Cvi y 35S::*EBS* (Cvi).

Con el fin de comprobar el efecto de la sobreexpresión de *EBS* sobre la dormición del ecotipo durmiente Cvi, recogimos simultáneamente semillas de plantas 35S::*EBS* (Cvi) y del tipo silvestre Cvi. Además, recolectamos semillas de otras accesiones con distintos niveles de dormición tales como *Ler*, *Col* y *C24*. En todos los casos, las plantas de las que se recogieron estas semillas se cultivaron al mismo tiempo y en idénticas condiciones. Posteriormente, las semillas recolectadas se almacenaron durante diversos periodos de tiempo entre 0 y 12 semanas, para determinar cómo disminuye el nivel de dormición de las semillas durante el proceso de maduración. Como se observa en la Figura 18, las semillas de *Ler* y *Col* muestran

RESULTADOS

niveles bajos de dormición de la semilla, ya que después de dos semanas de almacenamiento, el 100% de las semillas germinan, a pesar de que son incapaces de germinar inmediatamente después de la recogida. En cambio, de acuerdo con resultados previos (Alonso-Blanco et al., 2003; Bethke et al., 2004), las accesiones C24 y Cvi muestran niveles de dormición muy superiores, ya que las semillas de C24 alcanzan el 50% de germinación tras 8 semanas de post-maduración y las de Cvi tras 10 semanas. Sin embargo, semillas de la línea sobreexpresora 35S::*EBS* (Cvi) necesitan 6 semanas de almacenamiento para llegar al 50% de germinación, indicando nuevamente que la sobreexpresión de *EBS* produce una disminución del periodo de dormición, incluso en accesiones con semillas muy durmientes. Estas observaciones confirman que *EBS* desempeña un papel esencial en la represión de la germinación durante el periodo de la dormición de la semilla.

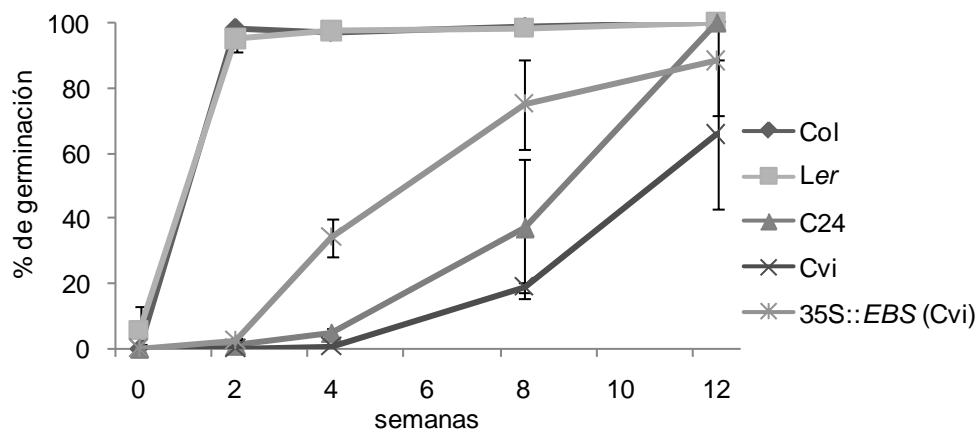


Figura 18. La sobreexpresión de *EBS* reduce el periodo de dormición de la semilla en accesiones durmientes de *Arabidopsis*. Fenotipo de dormición de semillas frescas de Col, Ler, C24, Cvi y 35S::*EBS* (Cvi) tras diferentes periodos de post-maduración (0, 2, 4, 8 y 12 semanas). El nivel de germinación de cuantificó a los 5 DDI.

Puesto que el proceso de estratificación contribuye a la rotura de la dormición, decidimos explorar la posible influencia de la sobreexpresión de *EBS* en esta respuesta. Para ello, determinamos el nivel de dormición de semillas de Cvi y de las líneas sobreexpresoras de *EBS* (Cvi), después de estratificarlas durante 7 días a 4°C. Como se observa en la Figura 19, este tratamiento de estratificación no provoca ningún efecto sobre la germinación de las semillas de Cvi, indicando que este tratamiento no es suficiente para romper la dormición de estas semillas. En cambio, la línea sobreexpresora 35S::*EBS* (Cvi) presenta una reducción considerable de la dormición, con un porcentaje de germinación superior al 80%. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *EBS* aumenta la sensibilidad del ecotipo Cvi a

tratamientos de frío que liberan a la semilla de la dormición, y son consistentes con que EBS desempeñe un papel central en la regulación de este proceso.

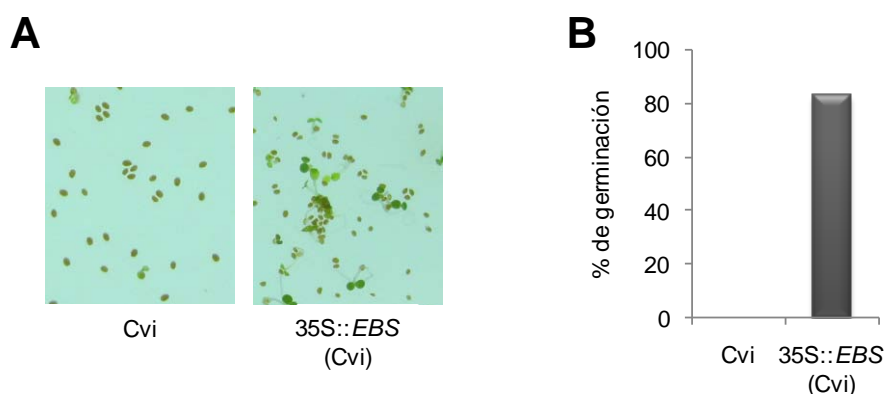


Figura 19. La sobreexpresión de *EBS* confiere un aumento de la sensibilidad a la estratificación de semillas de accesiones durmientes de *Arabidopsis*. A) Fenotipo y B) cuantificación de la dormición de semillas frescas de *Cvi* y *35S::EBS (Cvi)* después de 7 días de estratificación a 4°C. Los niveles de germinación se cuantificaron tras 5 DDI en condiciones de LB.

1.3.2 Sobreexpresión inducible de *EBS*.

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de *EBS* inducida en determinados estadios del desarrollo, también provoca efectos similares a la sobreexpresión constitutiva sobre la dormición de la semilla, nos propusimos generar líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresen *EBS* de manera inducible. Para ello, generamos líneas sobreexpresoras de *EBS* inducibles por β -estradiol, clonando la región codificante del cDNA de *EBS* en el vector de expresión pMDC7 (Curtis y Grossniklaus, 2003), que contiene un sistema inducible llamado XVE. En presencia de β -estradiol, la hormona inductora, el factor XVE se activa e induce la expresión de *EBS*.

Para realizar dicha construcción, se utilizó el cDNA de longitud completa de *EBS* (Piñeiro et al., 2003), con un tamaño de 675 pares de bases. El plásmido XVE::*EBS* se transformó en plantas de *Arabidopsis* y tras la siembra en medios con los antibióticos apropiados, se seleccionaron 26 líneas transgénicas independientes que presentaban una segregación de la resistencia a higromicina de 3:1 de resistentes:sensibles, y que por tanto, con mayor probabilidad serían portadoras de una única inserción del T-DNA. Puesto que la sobreexpresión de *EBS* produce una aceleración de la floración (Piñeiro et al., 2003), decidimos centrar nuestra búsqueda en aquellas líneas transgénicas que mostraron un fenotipo de floración temprana en

RESULTADOS

presencia de β -estradiol, en comparación con las mismas líneas no tratadas con β -estradiol y con las líneas de tipo silvestre. A continuación, analizamos la expresión de *EBS* en estas líneas cultivadas en presencia y ausencia del agente inductor, β -estradiol, con el fin de determinar cuáles de ellas respondían a la inducción hormonal de forma adecuada, mostrando niveles elevados de expresión de *EBS* en respuesta a β -estradiol, pero no en su ausencia.

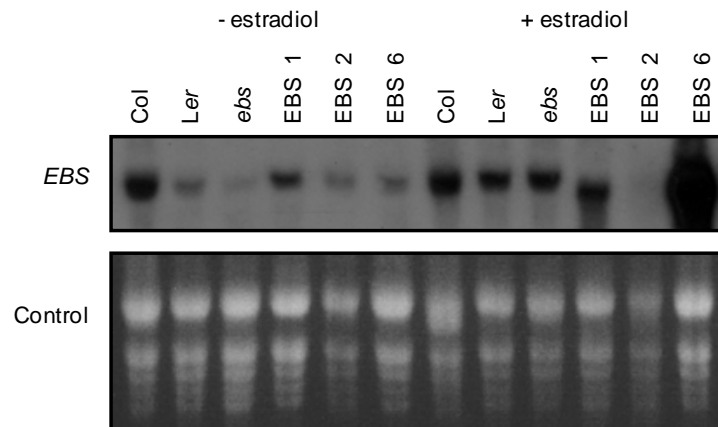


Figura 20. Inducción de la expresión de *EBS* en líneas XVE::*EBS* seleccionadas. Expresión de *EBS* en las líneas XVE::*EBS* seleccionadas. Para la hibridación de RNA se utilizaron 10 μ g de RNA total extraído de plántulas tratadas (+estradiol) o sin tratar (-estradiol) con β -estradiol a una concentración de 10 μ M. Como sonda se utilizó un fragmento del cDNA de *EBS*, amplificado con cebadores específicos del gen. Como control de carga se muestra el gel teñido con Bromuro de Etidio, antes de la transferencia del RNA a la membrana. Las líneas transgénicas analizadas se han nombrado EBS 1, 2 y 6.

Como se muestra en la Figura 20, la línea EBS 6 muestra una clara sobreexpresión de *EBS* al cultivarla en presencia de 10 μ M de β -estradiol, pero no en ausencia de éste, por lo que fue seleccionada como línea de trabajo para los análisis siguientes.

Para optimizar el tratamiento inductor quisimos averiguar las concentraciones de β -estradiol bajo las que se producía una sobreexpresión de *EBS*, empleando para ello un rango de tratamientos similares a los descritos previamente (Zuo et al., 2000; Brand et al., 2006; Liu et al., 2008). Pudimos comprobar que en todas las concentraciones estudiadas (entre 2 μ M y 100 μ M), se observa una clara inducción de la expresión de *EBS* (Figura 21A). Además, un tratamiento con 10 μ M de β -estradiol no produce ninguna inducción observable en plantas de tipo silvestre Col, por lo que se puede concluir que la sobreexpresión inducible de *EBS* observada en la línea EBS 6, es dependiente del activador transcripcional sintético XVE y de la presencia de β -estradiol (Figura 21A). Resultados similares se obtuvieron en experimentos de qRT-

PCR, en los que se obtuvo una inducción de la expresión de *EBS* superior a 7 veces con un tratamiento de β -estradiol 10 μ M (Figura 21B).

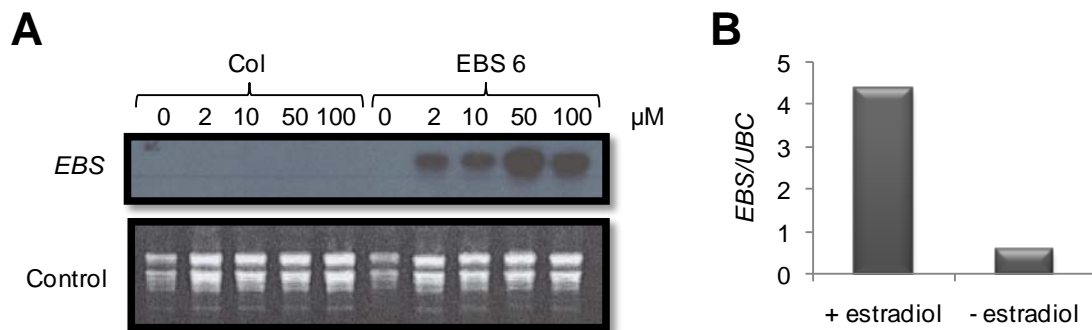


Figura 21. Efecto de la concentración de β -estradiol sobre la inducción de la expresión de *EBS* en plantas *XVE::EBS*. A. Northern blot mostrando la inducción de la expresión de *EBS* en respuesta a diferentes concentraciones de β -estradiol (0, 2, 10, 50, 100 μ M) de la línea transgénica EBS 6 portadora de la construcción *XVE::EBS*. Como control de carga se muestra el gel teñido con Bromuro de Etidio, antes de la transferencia del RNA a la membrana. B. qRT-PCR mostrando la inducción de la expresión de *EBS* en respuesta a tratamientos con 10 μ M de β -estradiol (+estradiol) y en ausencia (-estradiol) de plantas de la línea EBS 6 inducible. Los valores de expresión se han relativizado a los de *UBC*.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión de *EBS* provoca una aceleración de la floración en plantas de *Arabidopsis* (Piñeiro et al., 2003). Por ello, decidimos analizar el tiempo de floración de la línea EBS 6 en respuesta a tratamientos con β -estradiol. Como se observa en la Figura 22, esta línea muestra un fenotipo de floración temprana en condiciones de día largo tras la aplicación de β -estradiol, con diferencias significativas respecto a las líneas silvestres, y respecto a la línea transgénica sin tratar con β -estradiol.

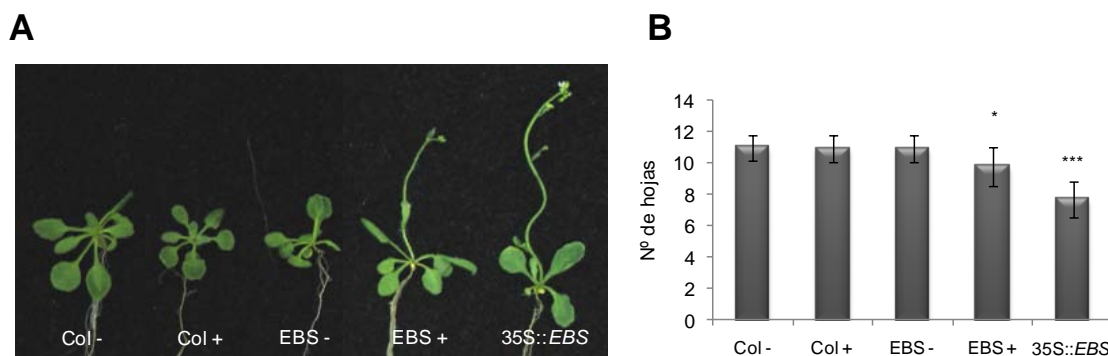


Figura 22. La sobreexpresión inducida de *EBS* provoca una aceleración de la floración. A. Fenotipo de floración temprana de la línea EBS 6 tras el tratamiento con 50 μ M β -estradiol (+); (-) indica plantas no expuestas a β -estradiol. A la derecha del panel A se muestra el fenotipo de floración desarrollado por una planta que sobreexpresa constitutivamente *EBS* (35S::*EBS*). B. Cuantificación del tiempo de floración en líneas de Col y de la línea inducible por β -estradiol (EBS 6), inducidas (+) y sin inducir (-) y de líneas

RESULTADOS

sobreexpresoras 35S::*EBS*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente.

Estos resultados corroboran que la línea EBS 6 muestra el comportamiento esperado, ya que la expresión de *EBS* se induce con tratamientos de β -estradiol, y esta acumulación excesiva del transcrito de *EBS* produce una aceleración de la floración, tal como ocurre en las líneas 35S::*EBS*. Además, esta floración prematura es dependiente de β -estradiol. Así pues, decidimos ensayar si la disminución de la dormición que se observa en las líneas de sobreexpresión 35S::*EBS*, también se produce en una línea portadora de una construcción de *EBS* inducible por β -estradiol. Para ello, cultivamos semillas frescas obtenidas de las plantas transgénicas portadoras de la construcción de inducción de *EBS* por β -estradiol, en placas con diferentes concentraciones de dicha hormona. Pudimos comprobar que la dormición de estas semillas de la línea transgénica, medida como germinación a los 5 DDI, disminuía al aumentar la concentración de β -estradiol, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Por el contrario, la dormición de las semillas recién recolectadas de Col no se ve afectada por el tratamiento con β -estradiol (Figura 23). Estos resultados indican que la sobreexpresión inducible de *EBS* provoca también una disminución de la dormición de las semillas, y nos permite concluir que la acumulación de *EBS* una vez se ha completado el desarrollo de la semilla es suficiente para desregular este proceso. Estos resultados sugieren que el efecto de *EBS* sobre la dormición no se produce, al menos exclusivamente, durante el desarrollo de la semilla, y que *EBS* desempeñaría una función de represión de la germinación que es necesaria tras la imbibición de la semilla.

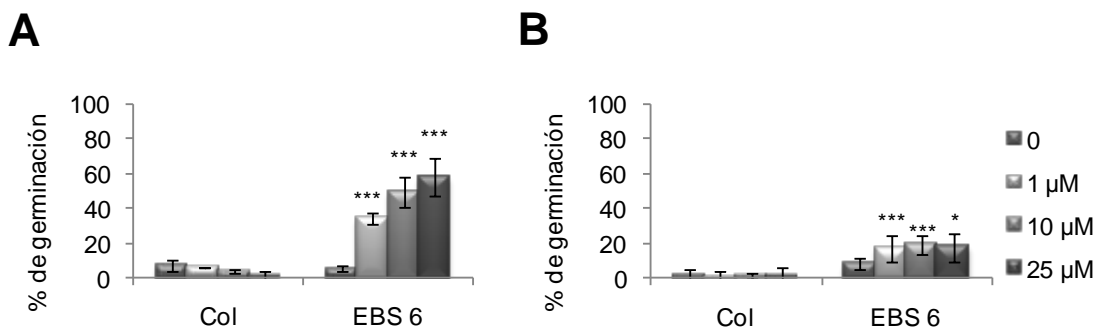


Figura 23. La sobreexpresión inducible de *EBS* durante la imbibición provoca una reducción en la dormición de semillas. A. Germinación a los 5 DDI, de semillas frescas del ecotipo silvestre Col y de plantas transgénicas inducibles por β -estradiol (EBS 6), expuestas a diferentes concentraciones de la hormona esteroide (0, 1, 10, 25 μ M), en condiciones de luz (A) y de oscuridad (B). Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente.

2. Papel del gen *SHL*, un homólogo de *EBS*, en el control de la dormición en *Arabidopsis*.

En *Arabidopsis* existen dos proteínas con alta homología a nivel de secuencia con *EBS*, *SHORT LIFE* (*SHL*) (Müssig et al., 2000) y otra proteína predicha, que nosotros hemos denominado *EBS-LIKE2* (*EBL2*). Tal como hemos comentado en secciones anteriores, *SHL* desempeña funciones que son parcialmente redundantes con *EBS* en el control de la transición floral y otros procesos de desarrollo, como el desarrollo de flores y frutos. Puesto que el gen *SHL* también muestra un patrón de expresión ubicuo como *EBS* y se expresa en la semilla, es posible que también esté implicado en la regulación del proceso de germinación durante el periodo de dormición. Con el fin de analizar el posible papel de *SHL* en el control de este proceso, y su posible dependencia respecto al fondo genético de las semillas, hemos analizado el comportamiento de dormición de semillas frescas procedentes de los mutantes *shl-1* y *shl-2*, mutaciones presentes en fondo genético *Col* y *Ler*, respectivamente. Además analizamos también el comportamiento de los correspondientes dobles mutantes con *ebs* (*ebs shl-1* y *ebs shl-2*). Como se muestra en la Figura 24, las semillas frescas de los mutantes *shl-1* y *shl-2* tienen un comportamiento similar al de su correspondiente tipo silvestre (*Col* y *Ler*, respectivamente), y son incapaces de germinar en LB. Sin embargo, las semillas de los dos dobles mutantes *ebs shl-1* y *ebs shl-2* muestran una moderada pero reproducible disminución de la dormición en comparación con *ebs* en ambos fondos genéticos.

Cuando realizamos estos experimentos en condiciones de oscuridad, llegamos a una conclusión similar. En condiciones de oscuridad, las semillas frescas de los mutantes *shl-1* y *shl-2* se comportan de manera similar a las de los tipos silvestres *Ler* y *Col*, y son incapaces de germinar. Por el contrario, las semillas de los dobles mutantes *ebs shl-1* y *ebs shl-2* muestran una reducción de la dormición en ausencia de estratificación y en condiciones de oscuridad mayor que la del mutante sencillo *ebs* (Figura 25). Por tanto, en condiciones de oscuridad, *SHL* parece tener cierta redundancia funcional con *EBS* en el control de la dormición. Estos datos sugieren que *SHL* podría jugar un papel redundante con *EBS* en la represión de la germinación de las semillas durmientes, función que se desvela únicamente en presencia de mutaciones que eliminan la actividad de *EBS*. Además, este papel sería independiente del fondo genético, ya que se observa tanto en *Col* como en *Ler*.

RESULTADOS

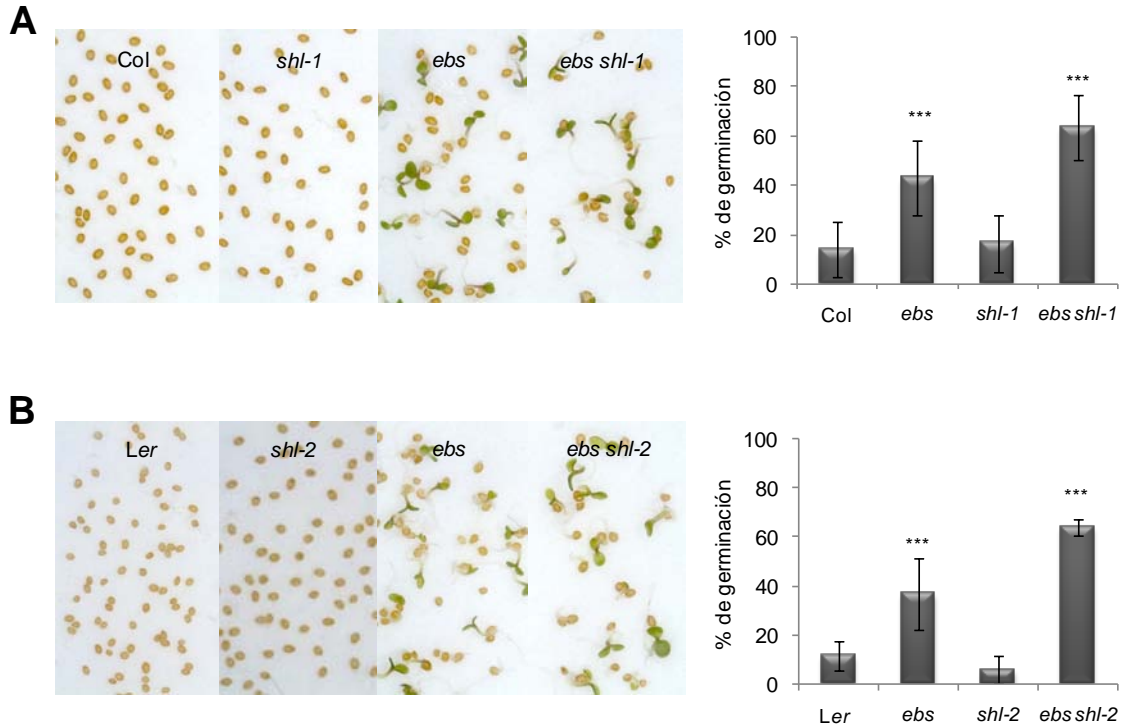


Figura 24. Análisis de la función que desempeña *SHL* en el control de la dormición en *Arabidopsis* en condiciones de luz. Dormición estimada como el porcentaje de germinación a los 5 DDI, de semillas de los ecotipos silvestres Col y Ler y de mutantes en estos fondos genéticos de *ebs*, *shl* y *ebs shl*, cultivadas en LB y fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. En A se muestran los resultados obtenidos con el alelo *shl-1* y en B con *shl-2*. Significación de los resultados de *ebs* y *shl* respecto al tipo silvestre, y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos: *** = $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%.

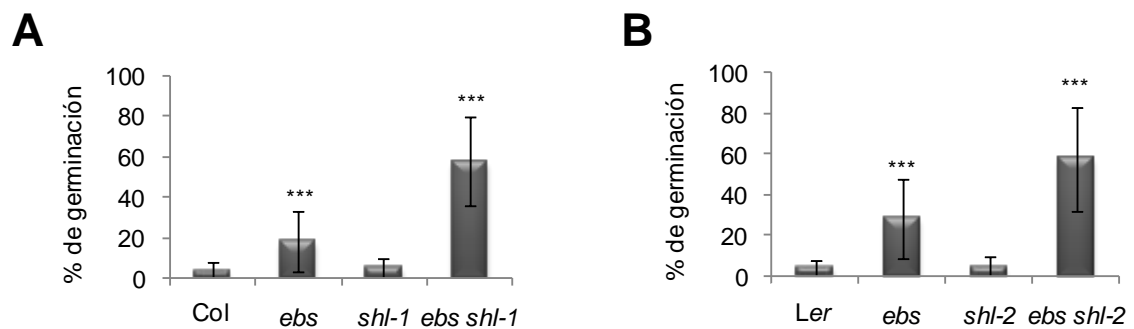


Figura 25. Análisis del papel que desempeña *SHL* en el control de la dormición en *Arabidopsis* en condiciones de oscuridad. Cuantificación de la germinación de semillas frescas a 7 DDI, cultivadas en condiciones de oscuridad, de los ecotipos silvestres Col y Ler, y de mutantes en estos fondos de *ebs*, *shl* y *ebs shl*. En A se muestran los resultados obtenidos con el alelo *shl-1* y en B con *shl-2*. Significación de los resultados de *ebs* y *shl* respecto al tipo silvestre, y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos: *** = $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%.

3. Interacción de *EBS* y *SHL* con hormonas implicadas en la regulación del proceso de la dormición de la semilla.

Como hemos discutido anteriormente, las fitohormonas GA y ABA desempeñan papeles centrales en la regulación de la germinación y la dormición de la semilla de *Arabidopsis*. Por ello, decidimos estudiar la respuesta de dormición a estas hormonas en semillas frescas de los mutantes *ebs* y *shl-2*, así como del doble *ebs shl-2*. En primer lugar estudiamos el efecto de las GAs (Figura 26A) y de un inhibidor de la síntesis de éstas, el paclobutrazol (PAC) (Figura 26B), en la germinación de semillas frescas de estos mutantes de *Arabidopsis*. De acuerdo con el papel de las GAs, en semillas de tipo silvestre *Ler*, la adición de concentraciones crecientes de esta hormona provoca que aumente la tasa de germinación de semillas frescas. Además, en presencia de cualquier concentración de PAC, las semillas de *Ler* son incapaces de germinar. El comportamiento del mutante *shl-2* es similar al de *Ler*, mientras que las semillas del mutante *ebs* presentan una reducción de la dormición aún en ausencia de GAs exógenas. Además, la germinación de semillas frescas de *ebs* aumenta progresivamente al incrementar la concentración de GA en el medio de germinación. Por otra parte, las semillas frescas del doble mutante *ebs shl-2* muestran una pérdida casi total de la dormición, incluso en ausencia de GAs exógenas, ya que prácticamente todas las semillas germinan. Asimismo, las semillas del doble mutante *ebs shl-2*, tienen mayor resistencia a PAC que las de *ebs*, siendo necesaria una concentración diez veces superior de PAC para poder inhibir la germinación de las semillas frescas del doble mutante (Figura 26B).

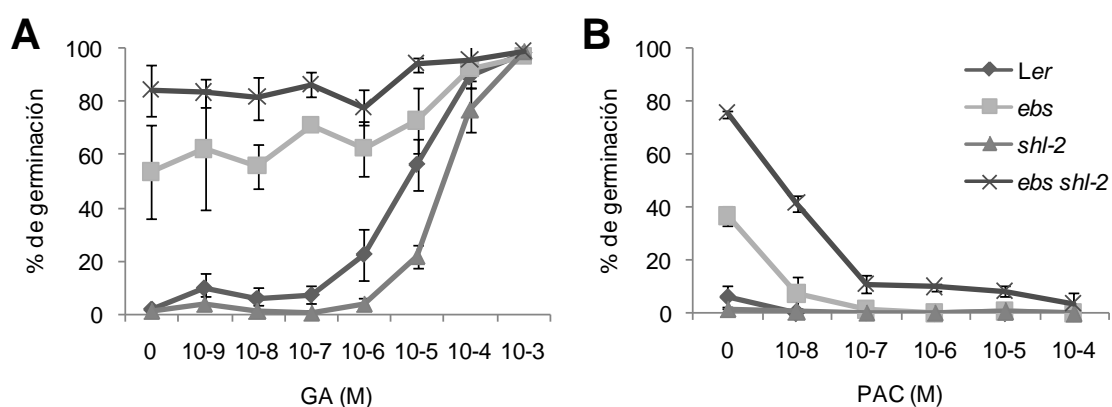


Figura 26. Efecto de giberelinas (GA) y paclobutrazol (PAC) sobre la dormición de semillas de mutantes *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2*. Germinación de semillas frescas del ecotipo silvestre *Ler*, y de mutantes en este fondo genético de *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2*, en respuesta a concentraciones crecientes de GA (A) y PAC (B). La germinación se cuantificó a los 5 DDI.

RESULTADOS

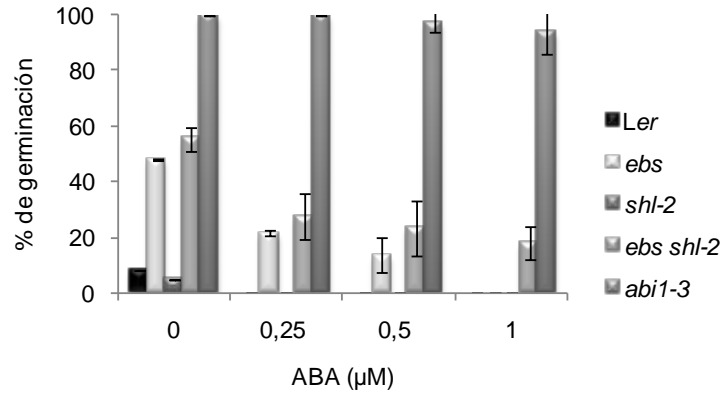


Figura 27. Efecto de ABA sobre la dormición de semillas de mutantes *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2*. Germinación de semillas frescas a los 5 DDI del ecotipo silvestre *Ler*, y de mutantes *ebs*, *shl-2*, *ebs shl-2* y del mutante insensible a ABA, *abi1*, en respuesta a diferentes concentraciones de ABA.

De igual manera, quisimos analizar la respuesta de las semillas frescas de estos mutantes a concentraciones crecientes de ABA. Como se muestra en la Figura 27, la adición de ABA (0,25μM-1mM) al medio de germinación impide que incluso el pequeño porcentaje de las semillas frescas de tipo silvestre *Ler* que germinan en ausencia de ABA, lo hagan en presencia de esta hormona inductora de la dormición de la semilla. Resultados muy similares se obtienen con las semillas del mutante *shl-2*. Sin embargo, las semillas del mutante *ebs* germinan en presencia de concentraciones bajas de ABA, mostrando mayor resistencia a esta hormona que las del tipo silvestre. Además, las semillas del doble mutante *ebs shl-2*, muestran menor sensibilidad a ABA que las semillas de *ebs* en cualquiera de las concentraciones estudiadas. En la Figura 27 se muestra también los resultados obtenidos con el mutante insensible a ABA *abi1-3*. Estos resultados son consistentes nuevamente con la hipótesis de que *SHL* tiene funciones redundantes con *EBS* en el control de la dormición de la semilla, y sugiere que los reguladores transcripcionales codificados por ambos genes podrían estar implicados en la regulación de este proceso de desarrollo mediado por hormonas.

4. Función de *EBS* y *SHL* en la regulación del desarrollo de la cubierta de la semilla.

La testa es la cubierta externa de la semilla que se deriva de los tejidos maternos, y que cubre al embrión y a la capa de endospermo que lo rodea (Holdsworth et al., 2008). La testa está constituida por una capa de células muertas, y se ha comprobado que es necesaria para la dormición de la semilla, ya que mutantes alterados en la pigmentación o en la estructura de la testa muestran defectos en la dormición (Debeaujon y Koornneef, 2000; Debeaujon et al., 2000; Holdsworth et al.,

2008). Esta capa epidérmica se desarrolla a partir del integumento exterior del óvulo tras la fecundación. Durante el desarrollo de la semilla, la epidermis sintetiza y segrega de forma polarizada gran cantidad de mucílago en el apoplasto, y acaba dando lugar a una estructura en forma de volcán llamada columela en las células epidérmicas (Haughn y Chaudhury, 2005). Durante los estadios finales de la maduración de la semilla, estas células sufren apoptosis y la capa de mucílago se seca. Cuando la semilla se hidrata tras la siembra, esta capa hidrófila de mucílago se expande y acaba atravesando la pared celular para rodear totalmente la semilla (Zwieniecki et al., 2001; Haughn y Chaudhury, 2005). Debido al papel que desempeña la cubierta de la semilla en el proceso de dormición y germinación, decidimos analizar la estructura superficial de las semillas de los mutantes *ebs* y *shl-2*, así como del doble mutante *ebs shl-2*, utilizando para ello técnicas de microscopía electrónica. Como se observa en la Figura 28 las semillas de *shl-2* presentan una estructura epidérmica similar a las de *Ler*, con células hexagonales en las que es visible la columela con forma de volcán. Sin embargo, en las semillas de *ebs* y *ebs shl-2*, se observan alteraciones en la morfología celular, con células cuadradas o pentagonales, y defectos en la columela.

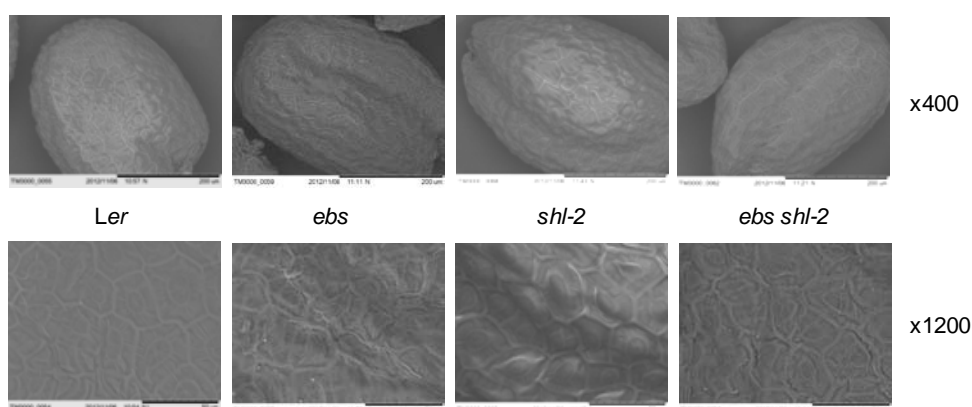


Figura 28. Mutaciones en el locus *EBS* provocan alteraciones en la morfología de la cubierta de la semilla. Imágenes de la superficie de semillas de *Ler*, *ebs*, *shl-2* y *ebs shl-2* tomadas al microscopio electrónico con 400 y 1200 aumentos.

Por otro lado, decidimos analizar si la capa viscosa de mucílago que recubre la semilla está también alterada en los mutantes *ebs*, *shl-1* y *shl-2*. Se ha propuesto que el mucílago puede tener un papel en la germinación, actuando como una barrera para el oxígeno y también para la dispersión de la semilla (Gutterman y Shem-Tov, 1996). Igualmente podría ser necesario para absorber agua, con el fin de aumentar y estabilizar el potencial hídrico que rodea la semilla, y asegurar así la germinación y el establecimiento de las plántulas (Penfield et al., 2001). Asimismo, se ha propuesto que tendría un papel en la protección de las heridas en la semilla (Wester, 2012). Con el fin de visualizar posibles alteraciones en la formación de la capa de mucílago en los

RESULTADOS

mutantes *ebs* y *shl* así como los dobles mutantes correspondientes en fondos genéticos *Ler* y *Col*, realizamos tinciones con rojo de rutenio. Como se observa en la Figura 29, este reactivo provoca la formación de una cápsula de color rosa alrededor de la semilla, señalando el mucílago. Como se muestra en la Figura 29, se observa una capa de mucílago clara en las semillas de los ecotipos silvestres *Ler* y *Col* y también en los dos mutantes *ebs*, *shl-1* y *shl-2*. Sin embargo, en las semillas de los dobles mutantes *ebs shl-1* y *ebs shl-2* no se aprecia la formación de la capa de mucílago tras su hidratación, lo que indica que las proteínas EBS y SHL serían necesarias para la formación de esta estructura, y que ambos genes tendrían funciones redundantes en la regulación de este proceso. Investigaciones adicionales serán necesarias para poder establecer una conexión entre el papel desempeñado por *EBS* y *SHL* en el desarrollo de la cubierta de la semilla, con la función que llevan a cabo estos genes en el proceso de dormición.

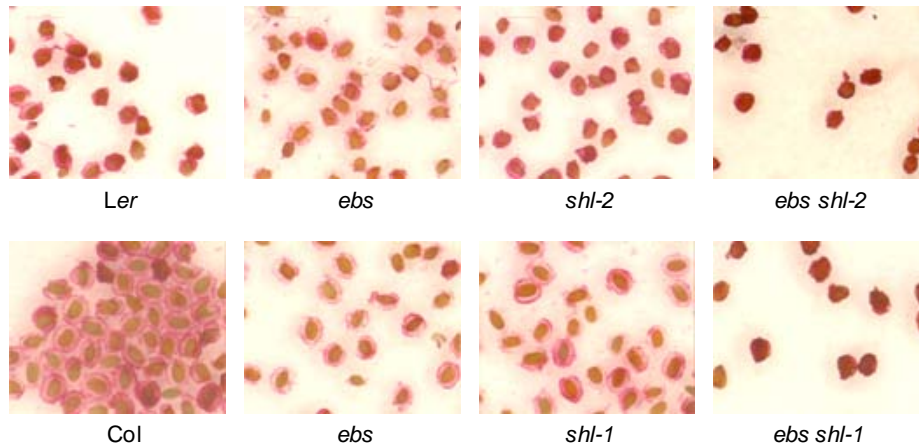


Figura 29. *EBS* y *SHL* tienen papeles redundantes en el desarrollo del mucílago de semillas frescas. Imágenes de la tinción con rojo de rutenio (0,03 p/v), de semillas frescas de las líneas silvestres *Ler* y *Col*, y de las líneas mutantes *ebs* y *shl* en fondo genético *Ler* y *Col*, y de los dobles mutantes *ebs shl-1* y *ebs shl-2*.

5. Análisis molecular de la función desempeñada por *EBS* en el control de la dormición de la semilla.

5.1 Identificación mediante análisis transcriptómicos globales de genes controlados por los reguladores transcripcionales *EBS* y *SPT* durante la dormición de la semilla.

Los dominios funcionales presentes en *EBS* sugieren que se trata de una proteína reguladora de la transcripción, implicada en procesos de remodelación de la cromatina. Consistente con esta hipótesis, resultados recientes de nuestro grupo muestran que *EBS* puede unirse a través de su dominio PHD a histonas modificadas

(en concreto a H3K4me_{2/3}), y que es necesaria para mantener una conformación transcripcionalmente inactiva de la cromatina en sus genes diana durante estadios previos a la transición floral. De hecho, la expresión de *FT*, un regulador central de la floración, se encuentra desreprimida en los mutantes *ebs*, y además hemos demostrado que EBS puede unirse a regiones discretas de la cromatina del locus *FT*. Todas estas observaciones indican que EBS actuaría como un represor transcripcional de *FT*, participando en la modulación de la estructura de la cromatina de este locus. Además, análisis transcriptómicos realizados en nuestro laboratorio con plántulas del mutante *ebs* muestran que la expresión de un número considerable de genes está desregulada, lo que de nuevo es consistente con un papel de la proteína EBS en la regulación de la expresión génica. Por todo ello, nuestra hipótesis de trabajo es que las alteraciones de la dormición observadas en los mutantes *ebs* podrían deberse a que EBS es necesaria para regular la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la represión de la germinación durante el periodo de dormición. Con el fin de identificar genes que se encuentren desregulados en el mutante *ebs* durante dicho proceso de desarrollo, hemos realizado un análisis transcriptómico de semillas frescas de este mutante embebidas durante 1 día.

Si bien el foco principal de este trabajo de Tesis Doctoral es profundizar en el conocimiento del papel que desempeña *EBS* en el control de la dormición de la semilla, en este análisis se incluyó también el mutante *spt-10*, que igualmente presenta alteraciones a nivel de este proceso. Como hemos mencionado anteriormente, *SPT* codifica un factor de transcripción de tipo bHLH implicado en la regulación de la dormición y que media la respuesta de germinación a la luz y la temperatura (Penfield et al., 2005). Es previsible que este factor de transcripción regule la dormición de la semilla modulando la transcripción de genes implicados en el control de este proceso. Al igual que *ebs*, el mutante *spt-10* se encuentra en fondo genético *Ler*, y se describió como un alelo de pérdida de función de *SPT* que provoca una fuerte reducción de la dormición de la semilla, eliminando el requerimiento de estratificación de semillas frescas en condiciones de luz (Penfield et al., 2005). Por el contrario, otros alelos de *SPT* como *spt-2*, en el mismo fondo genético, habían sido descritos como alelos de ganancia de función (Penfield et al., 2005). Además, los genes *GA3ox1* y *2* implicados en la biosíntesis de GAs se encuentran sobreexpresados en el mutante *spt-10* (Penfield et al., 2005). Todas estas observaciones llevaron a proponer que *SPT* sería necesario para la represión de la germinación en semillas frescas actuando como un inhibidor de la expresión de genes *GA3OX* (Penfield et al., 2005). Sin embargo, resultados posteriores han mostrado que

RESULTADOS

SPT desempeña papeles opuestos en el control de la dormición de diferentes accesiones de *Arabidopsis* y que la inserción de T-DNA presente en el alelo *spt-10* resulta en un aumento de expresión de *SPT* (Vaistij et al., 2013; este trabajo).

La comparación de los patrones de expresión globales durante la dormición en los mutantes *ebs* y *spt-10*, contribuirá a esclarecer como dos mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica – remodelación de la cromatina y reconocimiento específico de secuencias de DNA reguladoras - participan en el control de la dormición de la semilla. Además, este análisis nos permitirá establecer hipótesis acerca de la participación de estos genes en rutas genéticas comunes o independientes en las redes génicas que controlan la dormición de la semilla. Por ello, realizamos un análisis transcriptómico con RNA extraído de semillas frescas de *Ler*, *ebs* y *spt-10*, ya que ambos alelos mutantes están en dicho fondo genético. Como se muestra en la Figura 30, las semillas de los mutantes *ebs* y *spt-10* utilizadas para el análisis de perfiles transcriptómicos, mostraron valores esperados de reducción de la dormición, mientras que las semillas de tipo silvestre *Ler*, no mostraron germinación a los 5 DDI. Por tanto, concluimos que este es un material idóneo para el estudio de los perfiles transcriptómicos de estos mutantes.

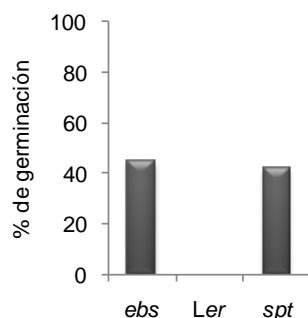


Figura 30. Germinación de las semillas frescas de los mutantes *ebs* y *spt-10* utilizadas para el análisis de perfiles transcriptómicos. Germinación de las semillas frescas de *Ler* y de los mutantes *ebs* y *spt-10*, empleadas para realizar los análisis de microarrays, cuantificada a 5 DDI, en condiciones de LB.

Los RNAs extraídos de estas semillas se utilizaron para preparar cDNAs que se hibridaron con micromatrices de DNA del “ATH1 Genome Array” de *Arabidopsis* producidas por Affymetrix, que contienen alrededor de 22500 sondas que representan unos 24000 genes de *Arabidopsis*. Este análisis se realizó en el Servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de Madrid.

Entre los genes que mostraban una expresión diferencial entre uno de los mutantes y el tipo silvestre *Ler*, y un valor de p-value (p-val) $\leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 95%, inicialmente seleccionamos aquellos cuyo valor de

expresión era al menos dos veces mayor (Fold Change, $FC \geq 2$) o menor ($FC \leq -2$) entre los genotipos comparados. A lo largo de esta memoria, los valores de aumento de expresión de genes se expresan como FC positivo y la disminución de la expresión como FC negativo. Por tanto, un valor de FC positivo representa el número de veces que aumenta la expresión de un gen en un mutante respecto al valor de la expresión en el tipo silvestre, mientras que un valor de FC es negativo indica las veces que disminuye la expresión en el mutante. Así, este análisis nos permitió identificar 334 genes con expresión diferencial en el mutante *ebs* con respecto a *Ler*. De ellos, 234 genes estaban sobreexpresados, y los 100 restantes estaban reprimidos. Utilizando idénticos criterios de selección, en el caso del mutante *spt-10*, los genes sobreexpresados fueron 787, mientras que los genes reprimidos fueron 291. De los genes reprimidos con respecto a *Ler*, 68 son compartidos en los perfiles transcriptómicos de los dos mutantes analizados. De los genes sobreexpresados, 197 son comunes para *ebs* y *spt* (Figura 31). Estos datos sugieren que *EBS* y *SPT* actuarían sobre la regulación de la dormición modulando específicamente la expresión de varios genes, si bien compartirían un número significativo de genes diana (directos e indirectos), cuya expresión se encuentra desregulada en ambos mutantes. En particular, la mutación *spt-10* causa la desregulación transcripcional de un mayor número de genes que *ebs*, lo que sugiere que *SPT* tendría un efecto más amplio sobre la expresión de genes durante el proceso de la dormición de la semilla, mientras que *EBS* actuaría sobre un grupo más específico de genes, a pesar de tratarse de un factor implicado en procesos de remodelación de cromatina.

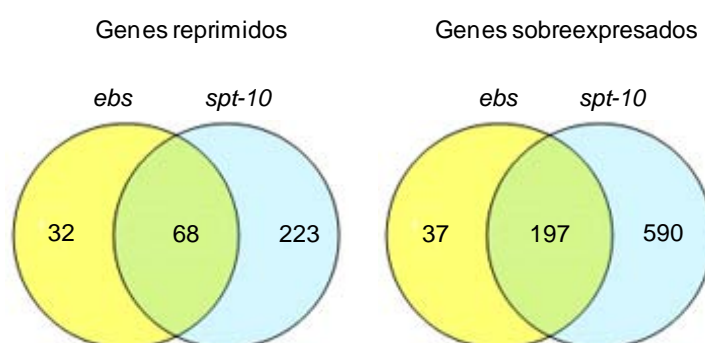


Figura 31. Diagramas de Venn representando el número de genes con expresión diferencial específicamente en uno de los mutantes analizados (*ebs* o *spt-10*) o en ambos. El diagrama muestra el número de genes con expresión alterada en los perfiles transcriptómicos de las semillas de los mutantes *ebs* y *spt-10* respecto a las de tipo silvestres *Ler*, para un valor $p \leq 0,05$ y de $FC \geq 2$ para los sobreexpresados y de $FC \leq -2$ para los reprimidos.

Además, nos propusimos determinar qué categorías funcionales en las que se encuentran los genes expresados diferencialmente en los mutantes *ebs* y *spt-10* están

RESULTADOS

sobrerrepresentadas (Figura 32). Para ello utilizamos las herramientas informáticas disponibles en la aplicación Bio-Analyzer Resource (BAR) de la Universidad de Toronto (Canadá), que permiten normalizar el número de genes con una expresión alterada en cada categoría con respecto al número total de genes en cada una de las categorías definidas. Las categorías con un mayor nivel de sobrerrepresentación en cada una de las clasificaciones funcionales empleadas en BAR, corresponden en ambos mutantes, a respuesta a estímulos abióticos y bióticos, y a respuesta a estrés, en el caso de Procesos Biológicos, a actividades enzimáticas tipo hidrolasas en *ebs* y transferasas en *spt-10*, en el caso de Funciones Moleculares, y a genes relacionados con la pared celular en ambos mutantes, cuando se considera la clasificación de Componente Celular. Estas observaciones son consistentes con cambios en la actividad metabólica en semillas que inician la germinación, como ocurre en semillas frescas de *ebs* y *spt-10* embebidas, en las que aumentan las actividades enzimáticas relacionadas con la movilización de sustancias de reservas. Además, la sobrerrepresentación de componentes que participan en procesos de modificación de la estructura de la pared celular se puede relacionar con el aumento de la elongación celular que se produce durante la germinación, y que conlleva la remodelación de componentes de la pared.

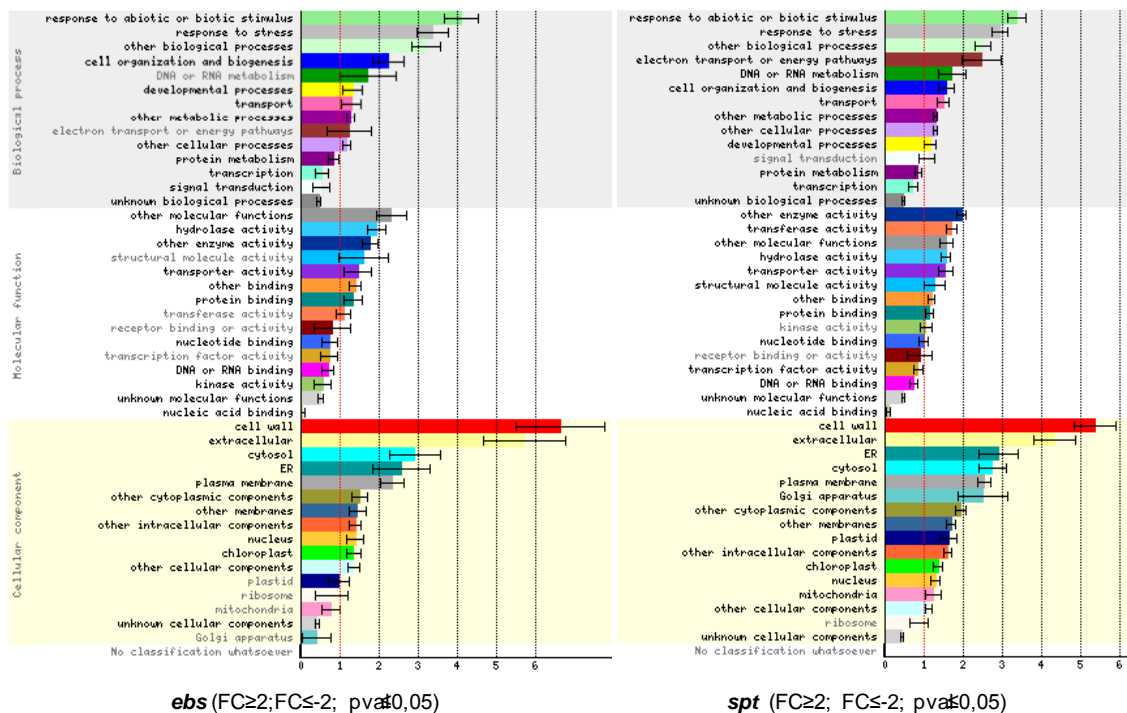


Figura 32. Clasificación funcional normalizada de genes expresados diferencialmente en los perfiles transcriptómicos de los mutantes *ebs* y *spt-10*. Clasificación funcional de todos los genes que muestran expresión alterada con valores de FC \geq 2 o FC \leq -2 y pva \leq 0,05 en el mutante *ebs* respecto a *Ler*, y del mutante *spt-10* respecto a *Ler*, utilizando la aplicación informática BAR

(<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>) (Provart y Zhu, 2003) que proporciona valores de representación relativos a los genes presentes en cada categoría en Arabidopsis.

En la Figura 33 se muestran los 50 genes que mostraron mayores niveles de alteración de expresión en el mutante *ebs* (un listado completo de genes reprimidos con un $FC \leq -2$ o sobreexpresados con un $FC \geq 2$ se incluye en el Anexo I). Entre ellos aparecen genes que codifican proteínas con actividad de hidrolasas como PYK10, BGLU21, EXGT-A4, XTR3, At5g45670 y At1g78060, así como genes que codifican expansinas, como EXP2 y EXP3. Ambas categorías están relacionadas con cambios en la organización de la pared celular (Ahn et al., 2010; Akamatsu et al., 1999, Lee et al., 2001; Janiak et al., 2012). También encontramos genes que codifican las histonas H3 y H2B (Liu et al., 2007; Müller et al., 2012; Vethantham et al., 2012), genes relacionados con la respuesta a GAs durante el desarrollo de la semilla (Roxrud et al., 2007), como GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6 (GASA6) y GAST1 PROTEIN HOMOLOG 2 (GASA2) (Ohgishi et al., 2004; Shpak et al., 2004; Roxrud et al., 2007), así como proteínas de choque térmico, como el factor de transcripción específico de semillas HSFA9 (Le et al., 2010), y HSP101, Hsp70b, HSP26.5-P, At1g59860, At1g54050, At2g29500 (Sun et al., 2001; Sung et al., 2001; Nishizawa et al., 2006; Kotak et al., 2007; Gao et al., 2008). La expresión de estos genes de choque térmico parece estar regulada por ABA, y se han relacionado con el desarrollo de los últimos estadios de la maduración de la semilla, con la tolerancia a la desecación, y se ha demostrado que su expresión disminuye en la germinación (Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer y Vierling, 2000). Los cambios de muchas de estas actividades son consistentes con las alteraciones que se producen a nivel de pared celular durante el proceso de germinación, y podrían ser responsables de las alteraciones observadas durante la germinación de las semillas del mutante *ebs*.

RESULTADOS

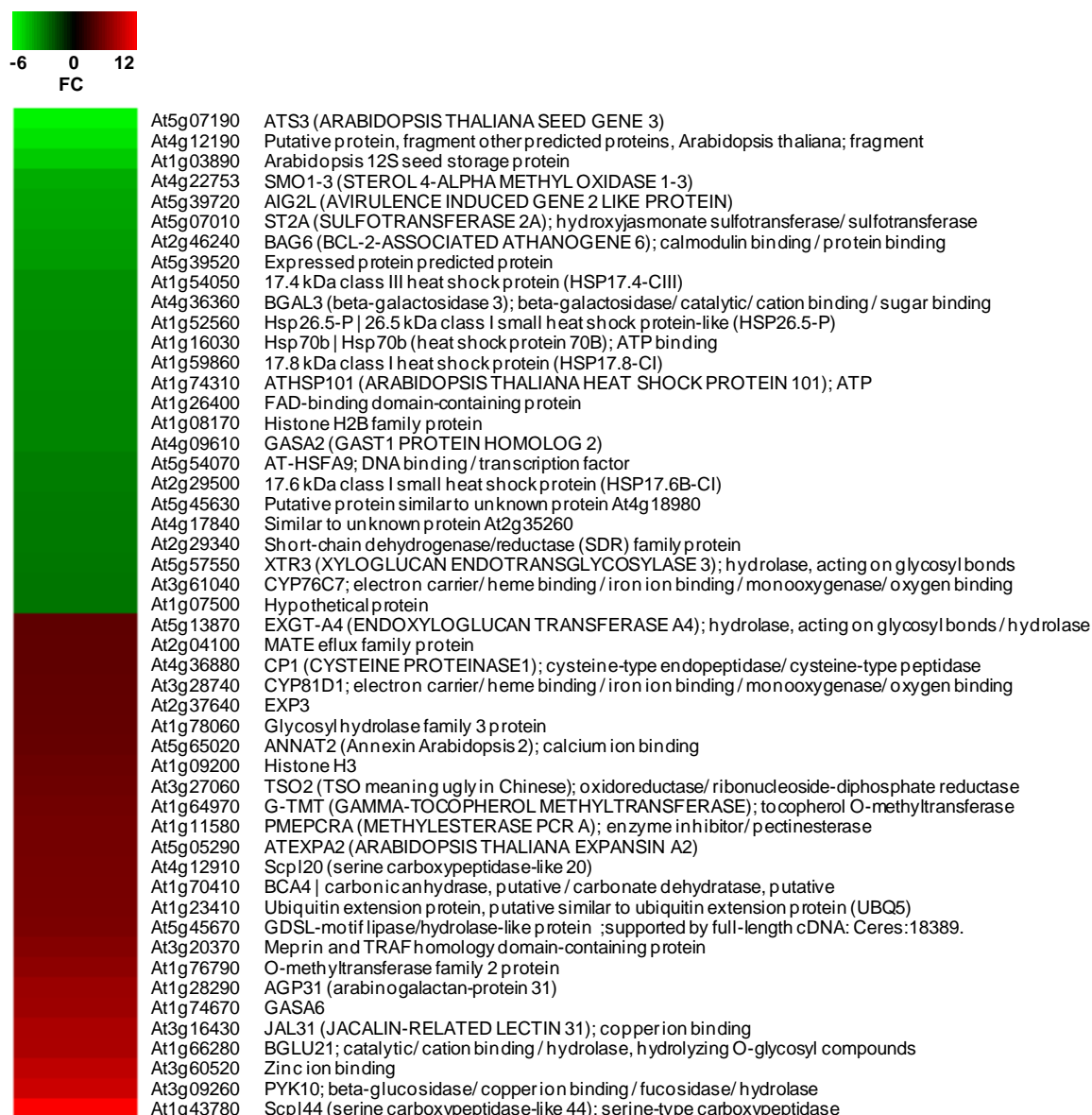


Figura 33. Listado de genes que mostraron mayor desregulación de su expresión en el análisis transcriptómico llevado a cabo con el mutante *ebs*. Se muestran los 25 genes que mostraron mayor nivel de represión (en verde) y de sobreexpresión (en rojo) en el mutante *ebs* respecto a *Ler* ($p \leq 0,05$).

Por otra parte, entre los 50 genes que presentaron mayores niveles de desregulación en el mutante *spt-10* (Figura 34), encontramos genes relacionados con la respuesta a GAs como GASA6, GASA4 (Aubert et al. 1998; Ohgishi et al., 2004; Shpak et al., 2004; Roxrud et al., 2007), histonas H1-3, H2B, y H3, varias proteínas de choque térmico como At2g29500, HSP22, At1g52560, At1g54050, HSP101, HSP17,6II, HSP23,6-MITO, Hsp70b, At1g59860, At2g20560, At1g53540, así como diversas expansinas y extensinas, como EXP1, EXP2, EXP3, EXP9, EXPL1 y ELP. Asimismo, encontramos genes que codifican hidrolasas, como At5g45670, PYK10, XTH19, EXGT-A4, BGLU21, entre otras. Un listado completo de genes reprimidos con

un $FC \leq -2$ o sobreexpresados con un $FC \geq 2$ se incluye en el Anexo II. Al igual que en el mutante *ebs*, los cambios de expresión observados podrían modificar los niveles de actividad de estas proteínas que son consistentes con las alteraciones que se producen a nivel de pared celular durante el proceso de germinación, y podrían explicar el diferente comportamiento de las semillas del mutante *spt-10* durante dicho proceso. Asimismo, entre los genes cuya expresión aumenta en el mutante *spt-10* se encuentra el propio *SPT* (con un FC de 3,18), una observación consistente con resultados recientes que muestran la sobreexpresión de este gen en el alelo mutante *spt-10* (Vaistij et al., 2013).

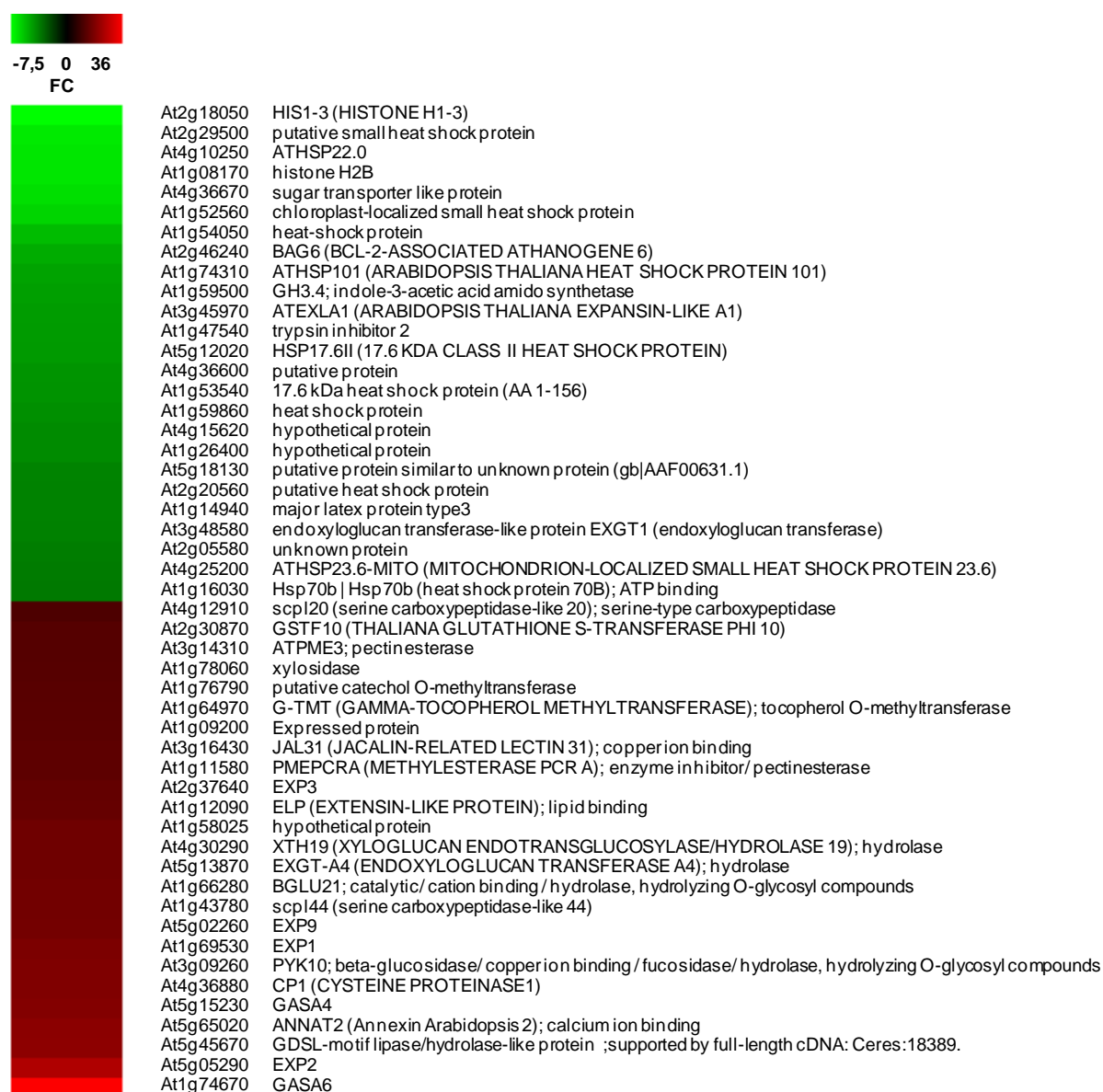


Figura 34. Listado de genes que mostraron mayor desregulación de su expresión en el análisis transcriptómico llevado a cabo con el mutante *spt-10*. Se muestran los 25 genes que presentaron mayores niveles de represión (en verde) y sobreexpresión (en rojo) en el mutante *spt-10* respecto a Ler ($pval \leq 0,05$).

RESULTADOS

Estos datos muestran que más de la mitad de los genes entre los 25 que presentan mayor desregulación en su expresión en ambos mutantes son comunes para los dos, lo que sugiere que EBS y SPT podrían compartir circuitos reguladores comunes en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*. Ambos mutantes tienen desregulada la expresión de genes relacionados con la hidrólisis de componentes de la pared y con la expansión celular, que podrían estar relacionados con la reactivación del crecimiento durante el inicio de la germinación. Asimismo, ambos mutantes presentan alterada la expresión de genes relacionados con la respuesta a GAs, consistente con el papel de esta hormona como promotor de la germinación. Además se observa la desregulación de proteínas de choque térmico, reguladas por ABA, relacionadas con el desarrollo de los últimos estadios de la maduración de la semilla, y con la tolerancia a la desecación (Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer y Vierling, 2000).

5.1.1 EBS actúa sobre circuitos reguladores diferentes durante la imbibición de la semilla y el desarrollo vegetativo.

En nuestro laboratorio disponemos de datos transcriptómicos de análisis de expresión en el mutante *ebs*, obtenidos en otros estadios del desarrollo de *Arabidopsis*, en concreto en plántulas durante el crecimiento vegetativo, inmediatamente antes de la transición floral (López-González, Tesis Doctoral 2010). Esto nos ha permitido analizar el grado de solapamiento existente entre los genes regulados por *EBS* durante el inicio de la germinación de la semilla fresca y en la fase vegetativa de desarrollo. Para ello comparamos los perfiles transcriptómicos del mutante *ebs* en los dos estadios de desarrollo, centrándonos en los genes que presentaron valores de $FC \geq 2$ o $FC \leq -2$ y $p \leq 0,05$. Como se muestra en la Figura 35, los genes alterados en los perfiles globales de genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs* obtenidos en plántula y en semilla, muestran un solapamiento muy reducido, ya que menos del 8% de los genes son comunes en ambos casos. Estas observaciones indican que EBS regula patrones de expresión génica diferentes en ambos estadios del desarrollo, ya que comparando los genes con expresión desregulada en el mutante *ebs* antes de la transición floral y en semillas frescas embebidas, se observa poca similitud entre ellos. Se ha demostrado que genes implicados en el control de la transición floral, en muchos casos, también desempeñan un papel en la regulación de la dormición (Liu et al., 2007; Chiang et al., 2009; Liu et al., 2011). Este es el caso del propio *EBS*; sin embargo, nuestros resultados

demuestran que los genes que median el efecto de este regulador transcripcional en ambos procesos son en su mayoría independientes.

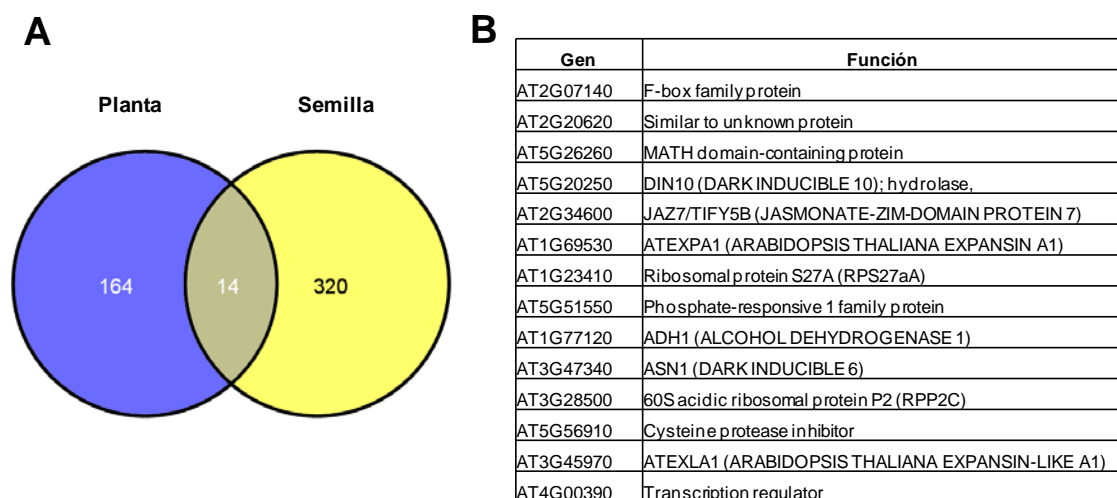


Figura 35. EBS regula genes distintos durante el periodo de dormición de la semilla y el crecimiento vegetativo que precede a la transición floral. En A se muestra un Diagrama de Venn con el número de genes comunes entre los expresados diferencialmente en el mutante *ebs* en ambos procesos de desarrollo. En B se muestra la lista de los genes cuya expresión se encuentra alterada en *ebs* en los dos estadios del desarrollo analizados. Para el análisis comparativo, se utilizaron los genes alterados con valores de $FC \geq 2$ y $pval \leq 0,05$ para los sobreexpresados y de $FC \leq -2$ y $pval \leq 0,05$ para los reprimidos.

5.1.2 Diversos genes implicados en la regulación de la dormición y la germinación de semillas se encuentran desregulados en los mutantes *ebs* y *spt*.

Con el fin de analizar de manera exhaustiva el comportamiento de genes implicados en control de la dormición o la germinación, y que estuvieran expresados diferencialmente en los mutantes *ebs* o *spt-10*, llevamos a cabo una selección similar a la descrita en el análisis comparativo anterior, pero estableciendo valores de $FC \geq 1,3$ o $FC \leq -1,3$ y de $pval \leq 0,05$, y dirigida a genes potencialmente relacionados con estos procesos de desarrollo (Figura 36).

RESULTADOS

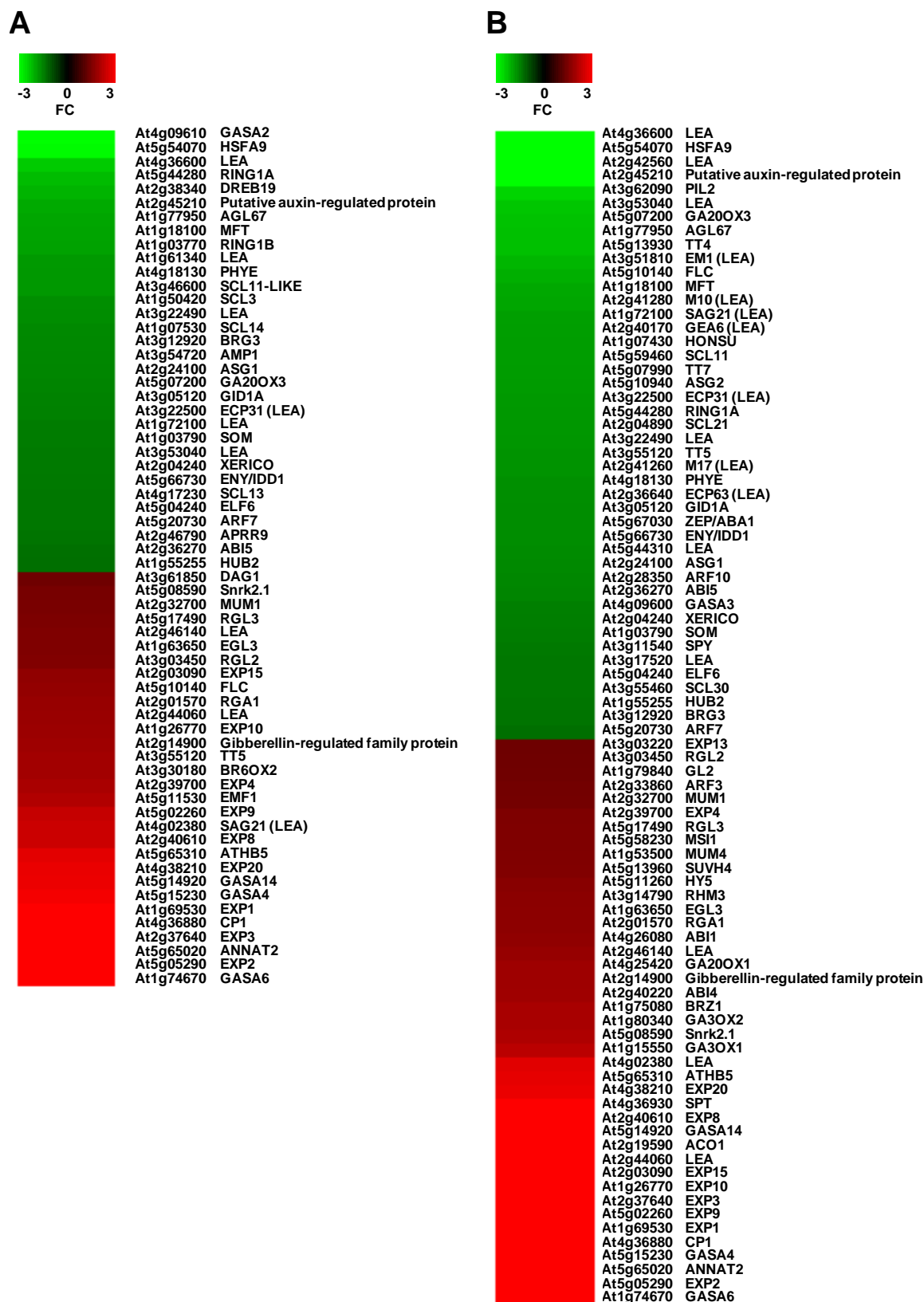


Figura 36. Genes potencialmente relacionados con el control de los procesos de dormición y germinación que se encuentran desregulados en los mutantes *ebs* o *spt-10* respecto a *Ler*. Genes con valores de $FC \geq 1,3$ y de $pval \leq 0,05$ para los genes sobreexpresados, en color rojo, y de $FC \leq -1,3$ y $pval \leq 0,05$ para los reprimidos, en color verde, en el mutante *ebs* (A) y *spt-10* (B).

Diversos genes relacionados con el metabolismo y la señalización dependiente de las hormonas ABA y GAs aparecen desregulados en los perfiles transcriptómicos de los mutantes analizados (Figura 36). Entre los genes diferencialmente expresados en los mutantes *ebs* y *spt-10* identificamos *ABI5*, cuya expresión es menor en ambos mutantes. La expresión de *ALTERED SEED GERMINATION1 (ASG1)* también disminuye en ambos mutantes (Bassel et al, 2011), así como la de *ASG2* en el caso de *spt-10*. En base a modelos de redes transcripcionales globales en la semilla se ha propuesto que *ASG1* actuaría como un promotor de la dormición mientras que *ASG2* funcionaría como un regulador positivo de la germinación, y ambos genes muestran respuestas alteradas a PAC y ABA (Bassel et al, 2011). Además, en el mutante *spt-10* también encontramos alterada la expresión de otros genes de señalización de ABA, como *ABI1*, *ABI4*, y *ABA1/ZEP* (Finkelstein y Somerville, 1990; Giraudat et al., 1992; Nambara et al., 1992; Parcy et al., 1994; Nambara et al., 2010; Reeves et al., 2011; Shu et al., 2013). El mutante *ebs* presenta además, una reducción en la expresión de *AMP1*, un gen que como hemos mencionado está implicado en la adquisición y/o mantenimiento de la dormición de semillas, regulando el contenido en ABA (Griffiths et al., 2011; Shi et al., 2013).

En los perfiles transcriptómicos de los mutantes *ebs* y *spt-10* encontramos niveles altos de expresión para varios genes que codifican proteínas DELLA (Lee et al., 2002; Tyler et al., 2004; Cao et al.; 2005; Park et al., 2013). Entre estos genes moderadamente sobreexpresados están *RGA*, *RGL2* y *RGL3*, de los que *RGA* y *RGL2* están implicados directamente en la señalización de GA en la semilla (Lee et al., 2010; Cao et al., 2005; Oh et al., 2007; Stamm et al., 2012). *SPINDLY (SPY)*, otro regulador negativo de la respuesta a GA, está reprimido en el mutante *spt-10* (Swain et al., 2001). Además la expresión de *SCARECROW-LIKE (SCL3)*, otro gen de la familia GRAS (Zhang et al., 2011), se encuentra reducida en *ebs*. *SCL3* interacciona directamente con las proteínas DELLA y es un regulador positivo de la biosíntesis o de la señalización de GA, de manera antagónica a como actúan las proteínas DELLA para modular la germinación de la semilla, por lo que *SCL3* podría ser un atenuador del efecto de las proteínas DELLA (Zhang et al., 2011). *EBS* y *SPT* activan la expresión de *INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS (IDD1/ENY)*, que promueve la germinación mediando la señalización de la luz y la señalización de GA, antagonizando la acción de las proteínas DELLA (Feurtado et al., 2011). La expresión del gen que codifica el receptor de GA *GID1A* (Willige et al., 2007; Ariizumi et al., 2013) también es menor en ambos mutantes.

RESULTADOS

Genes que participan en el metabolismo de GA también muestran alteraciones de expresión en los dos mutantes analizados. En el mutante *spt-10* aumenta la expresión de los genes de biosíntesis de GA *GA3ox1*, *GA3ox2* y *GA20ox1*. Sin embargo, la expresión de *GA20ox3* aparece reducida, tanto en *ebs* como en *spt*. Estos datos son consistentes con resultados previos que muestran que estos genes *GA3ox* están sobreexpresados en el mutante *spt-10*, lo que es consistente con el fenotipo de dormición reducida de este mutante (Penfield et al., 2005). Asimismo, EBS y SPT regulan también a genes de la familia GASA, que responden a GA. Tanto en *ebs* como en *spt* encontramos altos niveles de expresión de *GASA4*, *GASA6* y *GASA14*. Sin embargo, en *ebs* disminuye la expresión de *GASA2* y en *spt* la de *GASA3*. Aunque no se ha demostrado el papel de proteínas GASA en el control de la dormición, la expresión de varios de estos genes se encuentra alterada en semillas de mutantes como *amp1* y el triple mutante *snrk2.2/2.3/2.6*, que muestran también defectos en dormición (Griffiths et al., 2011; Nakashima et al., 2009). Como se muestra en la Figura 36, la expresión de *MFT*, un regulador positivo de la dormición en Arabidopsis (Vaistij et al., 2013), está reducida en los mutantes *ebs* y *spt-10* respecto a la de Ler. Nuestros resultados son consistentes con datos recientes que muestran que la expresión de *MFT* aumenta en alelos de pérdida de función de *SPT* (Vaistij et al., 2013) y con el fenotipo de dormición reducida observado en los mutantes *ebs* y *spt-10*, ya que los mutantes *mft* muestran menores niveles de dormición (Vaistij et al., 2013). De manera similar, *XERICO* aparece reprimido en ambos mutantes. Este gen codifica una proteína portadora de un dominio RING-H2 zing finger, y su transcrito está inducido por las proteínas DELLA y reprimido por GA (Piskurewicz et al., 2008). Además, *XERICO* se ha implicado en el metabolismo de ABA (Ko et al., 2006; Zentella et al., 2007).

En los perfiles globales de expresión de ambos mutantes, hemos identificado también varios genes relacionados con la modulación de la estructura de la pared y el crecimiento celular. Entre ellos se encuentran *CYSTEINE PROTEINASE1 (CP1)* (Ogawa et al., 2003), cuya expresión aumenta de manera significativa en ambos mutantes, así como la de diversas expansinas, como *EXP1*, *EXP2*, *EXP3*, *EXP4*, *EXP8*, *EXP9*, *EXP10*, *EXP15*, *EXP20* (Sampedro y Cosgrove, 2005). EBS y SPT, por tanto, podrían actuar directa o indirectamente modulando la estructura de la pared celular.

Asimismo, *EBS* y *SPT* parecen tener funciones en el control de genes implicados en el desarrollo de la cubierta de la semilla, que a su vez está implicada en

modular sus niveles de dormición (Léon-Kloosterziel et al., 1994; Western et al., 2001; Arsovski et al., 2010). La expresión de *TRANSPARENT TESTA 5 (TT5)* (Focks et al., 1999), que participa en la síntesis de flavonoides en la testa de las semillas, está incrementada en el mutante *ebs*, pero disminuye en *spt*. En cambio, la expresión de otros genes de desarrollo de la cubierta como *TT4* y *TT7*, está reducida únicamente en el mutante *spt* (Buer y Djordjevic; 2009). Por otra parte, en los dos mutantes analizados, aumenta la expresión de *MUCILAGE-MODIFIED 1 (MUM1)* y *ENHANCER OF GLABRA 3 (EGL3)*. *MUM1* está relacionado con la deposición del mucílago de la semilla (Western et al., 2001), mientras que *EGL3* participa en la regulación de síntesis de mucílago y de la diferenciación celular epidérmica (Arsovski et al., 2009; González et al., 2009; Li et al., 2009; North et al., 2010). En *spt* también aumenta la expresión de *MUM4*, la de su homólogo *RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 3 (RMH3)* y *GLABRA2 (GL2)*. *MUM4* y *GL2*, junto con *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)*, son necesarios para la síntesis completa de mucílago (Western et al., 2004).

Los datos obtenidos en el análisis transcriptómico de estos mutantes ha desvelado también una posible relación de los genes *EBS* y *SPT* con mecanismos de regulación de la dormición mediados por factores ambientales, como la luz. Estas observaciones son consistentes con datos previos que apoyan la participación de estos genes en dicho proceso. Así, la expresión de *PHYE* está reducida en ambos mutantes. Aunque *PHYB* y *PHYA* son los principales receptores de luz que controlan la germinación, *PHYE* también desempeña un papel activo similar al de *PHYB* en el control de este proceso, ya que funciona en las respuestas a baja intensidad de luz LFR (low fluence response) (Hennig et al., 2002). Además, en los mutantes *ebs* aumenta la expresión de *DAG1*, un gen que como hemos mencionado promueve la dormición (Gualberti et al., 2002) y está regulado por *PIL5* (Finkelstein et al., 2008). *PIL5* también activa a *BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR-RELATED GENE3 (BRG3)*, quien se une a las proteínas DELLA para reprimir la germinación (Park et al., 2013). *BRG3* está reprimido en los mutantes *spt-10* y *ebs*, por lo que podría estar favoreciendo una reducción de la dormición en dichos mutantes. Además la proteína *PIL5* también se une a *HON*, que codifica una fosfatasa que inhibe la señalización de ABA, y cuya expresión está reducida en *spt-10* (Kim et al., 2013).

El perfil de los genes expresados diferencialmente en *ebs* y *spt* ha revelado también una serie de genes que codifican factores de transcripción implicados en el control de la germinación de la semilla durante la dormición, y que podrían mediar la regulación de *EBS* y *SPT* sobre este proceso. Así *SOMNUS (SOM)*, que codifica una

RESULTADOS

proteína de tipo Zn finger que actúa como un regulador negativo de la germinación, muestra niveles reducidos de expresión en los dos mutantes estudiados. Por su parte, la expresión de *PIL2*, un factor de transcripción de tipo bHLH que responde a la luz, disminuye en el mutante *spt*. Este factor está implicado en la respuesta de germinación a la luz roja/luz roja lejana, e interacciona físicamente con RGL2 (Stamm et al, 2012). Genes que codifican factores de transcripción de tipo MADS box, tales como *FLC* y *AGL67*, también aparecen desregulados en los mutantes *ebs* y *spt-10*. *FLC* es un represor central del tiempo de floración en *Arabidopsis* (Michaels y Amasino, 1999), pero también regula la germinación de manera dependiente de la temperatura (Chiang et al, 2009). La expresión de *FLC* es mayor en las semillas del mutante *ebs* y está reprimida en el mutante *spt-10*. En ambos mutantes, la expresión de *AGL67* aparece reducida, lo que podría explicar al menos parcialmente el fenotipo de reducción de la dormición que presentan, ya que se ha propuesto que *AGL67* es un represor central de la germinación y los mutantes *agl67* muestran menores niveles de dormición de la semilla (Bassel et al., 2011).

También encontramos que *EBS* y *SPT* podrían regular a genes que participan en el control transcripcional de la expresión génica a través de procesos de remodelación de la cromatina. En ambos mutantes disminuye la expresión de *HUB2*, relacionada con complejos de remodelación de la cromatina necesarios para la regulación de la dormición de la semilla (Liu et al., 2007). Además, disminuye la expresión de *ELF6*, que codifica una demetilasa de histonas (Jeong et al., 2009), y de *RING1A*, que codifica una subunidad del complejo PRC1 que participa en la represión transcripcional estable (de Napoles et al., 2004; Wang et al. 2004). Por otra parte, en el mutante *ebs* se observa alterada la expresión de otros dos componentes del complejo PRC1, disminuida la de *RING1B*, y aumentada la de *EMF1* (Bratzel et al., 2010; Kim et al., 2012). Igualmente en *spt* encontramos aumentos de la expresión de *SUVH4*, que codifica una metiltransferasa que introduce H3K9me2, marca epigenética represora, que actúa en el control de la dormición primaria en *Arabidopsis* (Liu et al., 2011), y también de *MSI1*, que codifica un componente de PRC2 (Derkacheva et al., 2013). Todos estos cambios en la expresión de genes que codifican componentes de diversos complejos de remodelación de la cromatina, y que se observan en los mutantes analizados, podrían estar relacionados con la reprogramación de la expresión génica global que se produce durante la transición de la semilla durmiente a una que inicia el proceso de germinación.

Todas las observaciones descritas anteriormente son consistentes con que tanto *EBS* como *SPT* estén implicados en la regulación de los circuitos génicos necesarios para la regulación de la germinación durante el periodo de dormición, y que ambos genes participarían en distintos aspectos del control de este proceso en los que estarían implicados factores hormonales, ambientales y metabólicos. Ambos loci parecen actuar sobre la expresión de otros reguladores transcripcionales, entre los que se incluyen tanto factores de transcripción como componentes de complejos que reorganizan la cromatina, y que podrían contribuir a un control fino de la dormición a distintos niveles.

5.1.3 Confirmación mediante q-PCR de las alteraciones transcripcionales observadas en los perfiles globales de expresión en semillas de los mutantes *ebs* y *spt*.

Para corroborar los datos obtenidos en el análisis transcriptómico anteriormente descrito, extrajimos RNA de semillas frescas de *Ler*, *ebs* y *spt* embebidas durante 1 d, y realizamos experimentos de qRT-PCR, utilizando cebadores específicos para cada uno de los genes que comprobamos. Como se observa en la Figura 37, los niveles de expresión obtenidos para genes como *GASA4*, *WRKY23*, *FLC*, *AGL44*, *SOM*, *MFT*, *AGL67*, *RING1A*, *DREB19* y *LEA* se corresponden con los valores obtenidos en el análisis de perfiles transcriptómicos, tanto en el mutante *ebs* como en *spt*. Estos datos corroboran los resultados de los perfiles transcriptómicos e indican que los datos de expresión globales obtenidos son representativos del estado transcripcional de las semillas frescas de dichos mutantes embebidas durante un día.

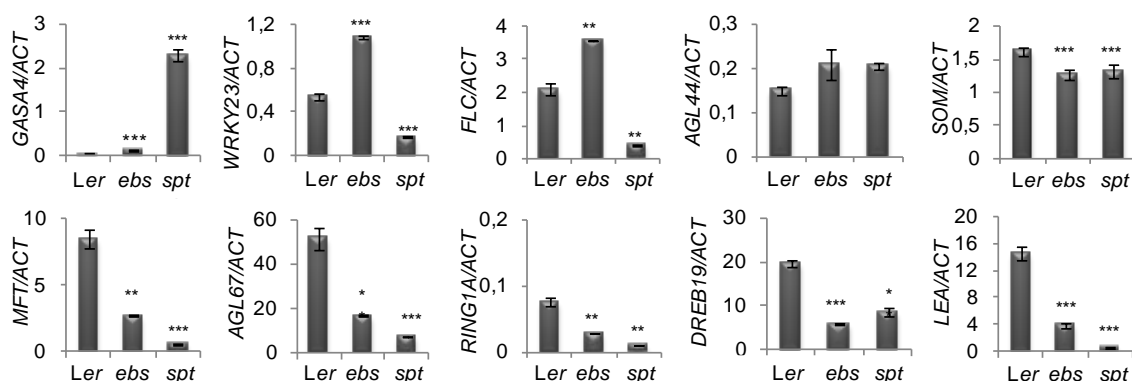


Figura 37. Análisis de expresión por qPCR en semillas frescas de genes diferencialmente expresados en los mutantes *ebs* y *spt-10*. Expresión de los genes *GASA4*, *WRKY23*, *FLC*, *AGL44*, *SOM*, *MFT*, *AGL67*, *RING1A*, *DREB19* y *LEA* (*At4g36600*) en semillas frescas de *Ler*, *ebs* y *spt-10*, embebidas durante 1 día, por qRT-PCR. Los valores de expresión de los genes analizados se han

RESULTADOS

relativizado con los de *ACT2*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y 99%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes respecto a *Ler*.

Estos datos nos permiten confirmar que la regulación de *EBS* y *SPT* sobre estos genes en algunos casos es similar, pero en otros ocurre en sentido opuesto, de manera que dichas mutaciones tienen efectos contrarios sobre la expresión de genes diferencialmente expresados en los perfiles transcriptómicos de los dos mutantes analizados. Estas observaciones sugieren que estos genes desregulados no serían responsables de los defectos en dormición presentes en los mutantes *ebs* y *spt*, aunque no podemos descartar que la complejidad de los circuitos reguladores que controlan la dormición de la semilla permitan que cambios opuestos en la expresión de determinados genes resulten en alteraciones similares en el fenotipo de dormición de las semillas. Serán necesarios análisis adicionales para determinar el posible papel de estos genes desregulados en el control de la dormición.

5.2 Análisis de los cambios de expresión en genes desregulados en el mutante *ebs* durante el proceso de germinación.

La expresión de determinados genes implicados en la regulación de la dormición/germinación está sometida a reprogramación, de manera que en la ventana temporal que va desde la imbibición de la semilla hasta la protrusión de la radícula de la semilla, momento en que se considera completo el proceso de germinación, los niveles de transcrito de dichos genes pueden variar significativamente. Por ello, además de corroborar mediante qPCR los cambios de expresión de genes expresados diferencialmente que identificamos en el análisis transcriptómico en el mismo momento en que se realizó dicho análisis (1 día tras la imbibición), decidimos comprobar si algunos de estos genes mostraban cambios de expresión durante el proceso de germinación (0 a 2 días de imbibición). Muchos de los genes expresados diferencialmente en los análisis transcriptómicos estaban igualmente desregulados en los mutantes *ebs* y *spt-10*. Por otro lado, la observación de que el alelo *spt-10* muestra mayores niveles de expresión de *SPT* puede dificultar la interpretación de los resultados obtenidos con dicho mutante. Por ello, y puesto que el objetivo central de este trabajo es esclarecer el papel de *EBS* en la regulación de la dormición, decidimos determinar si la pérdida de función de *EBS* provocaba alteraciones en el patrón de expresión de algunos de esos genes durante ese periodo. Realizamos estos ensayos tanto para genes desreprimidos, como para algunos cuya expresión disminuía en los perfiles globales de expresión génica. Como se observa en la Figura 38, tanto

At3g60520, que codifica una proteína con un dominio Zn finger, de función desconocida, como *TSO2*, que codifica una ribonucleosido reductasa, muestran picos de expresión muy notorios un día después de la imbibición, a pesar de que en semillas del tipo silvestre, sus niveles de expresión se mantienen bastante estables durante el periodo analizado. Por su parte, el gen *ARABINOGALACTAN PROTEIN 31 (AGP31)* también muestra un aumento de expresión en ese día, donde aparece un pico de expresión en el tipo silvestre. Sin embargo, a diferencia de los genes anteriores, los niveles de expresión de *AGP31* también están elevados en las otras muestras analizadas, a tiempo 0 y 2 días tras la imbibición. Por su parte, los niveles de expresión del factor de transcripción *AGL44* siguen un patrón similar en el mutante *ebs* y en el tipo silvestre, con una ligera disminución durante el periodo de germinación, pero siempre con valores por encima de los niveles detectados en el tipo silvestre. También el factor de transcripción *WRKY23* presenta un patrón de expresión similar en el mutante *ebs*, aunque con niveles algo superiores a los observados en el tipo silvestre. Entre los genes que se encuentran reprimidos en el mutante *ebs* encontramos *ARABIDOPSIS THALIANA SEED GENE 1 (ATS1)*, *ATS3* y *GASA2*, los cuales muestran un comportamiento similar, con una disminución de los niveles de expresión de sus mensajeros, que es más patente entre 0 y 1 día tras la imbibición. *DREB19*, sin embargo, muestra un comportamiento más complejo, ya que se encuentra reprimido en el mutante *ebs* tras un día de imbibición y fuertemente sobreexpresado en la muestra del día 2. La expresión de *AGL67*, por su parte, es mayor en el mutante *ebs* en semillas recién recogidas, mientras que en imbibición, la expresión de *AGL67* es menor en *ebs*. Estos datos reflejan la complejidad de la regulación mediada por EBS durante la germinación/dormición de semillas de *Arabidopsis*.

RESULTADOS

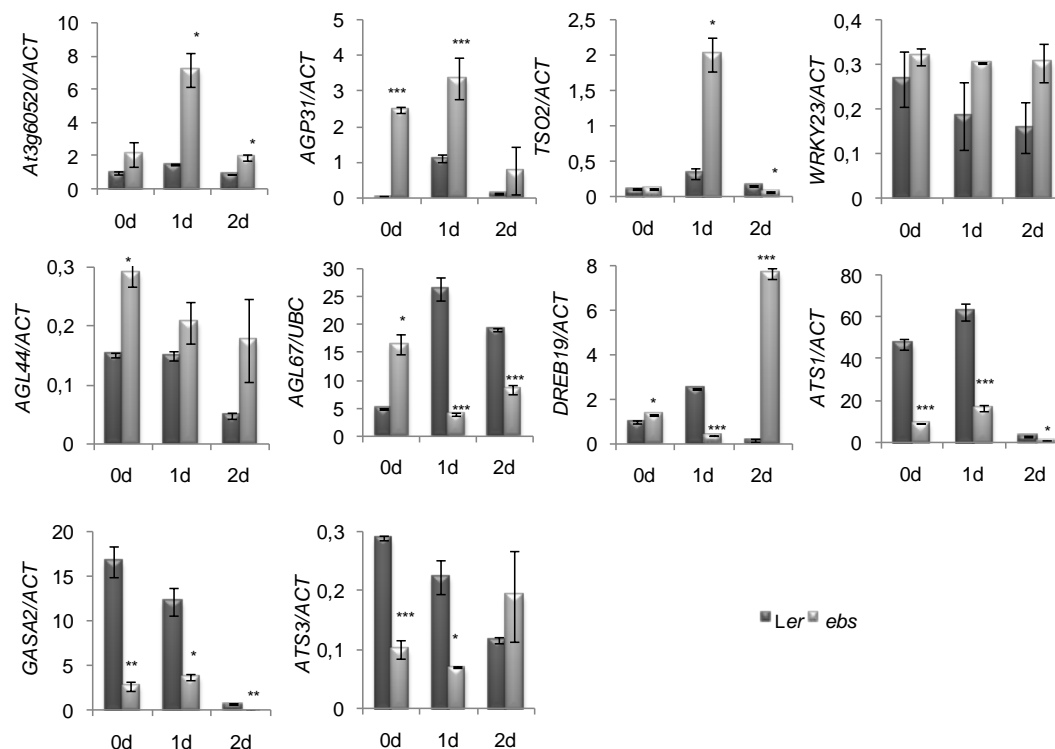


Figura 38. Expresión temporal de genes diferencialmente expresados en el mutante *ebs*, en semillas a 0d, 1d y 2d de imbibición. Expresión de los genes *At3g60520*, *AGP31*, *TSO2*, *WRKY23*, *AGL44*, *AGL67*, *DREB19*, *ATS1*, *GASA2* y *ATS3* en semillas frescas de *Ler* y *ebs*, recién cosechadas (0d), embebidas durante 1 día (1d) y durante 2 días (2d), mediante qPCR. Los valores de expresión se han relativizado con los de *ACT2*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5%, 99% y 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia entre *Ler* y *ebs* en un mismo día.

5.3 Efecto de mutaciones en *SHL* sobre la expresión de genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs*.

El análisis fenotípico de la dormición que hemos realizado con los dobles mutantes *ebs shl* ha demostrado que *SHL* desempeña funciones redundantes con *EBS* en el control de este proceso en *Arabidopsis*, ya que la pérdida de función de ambos genes provoca un fenotipo de dormición más extremo que el de mutantes *ebs*, mientras que los mutantes *shl* no presentan defectos visibles en este proceso (Figura 24). Por tanto, es posible que algunos de los genes que se encuentren desregulados en los mutantes *ebs* durante la dormición de la semilla, muestren mayores niveles de desregulación de su expresión en los dobles mutantes *ebs shl*. Así, aquellos genes que se vean afectados en su expresión por ambas mutaciones, podrían ser al menos parcialmente responsables de los defectos en dormición presentes en mutantes *ebs* y en los dobles mutantes *ebs shl*. Por ello, decidimos analizar en el doble mutante *ebs*

shl los cambios de expresión que muestran algunos de los genes identificados mediante los análisis transcriptómicos globales del mutante *ebs*.

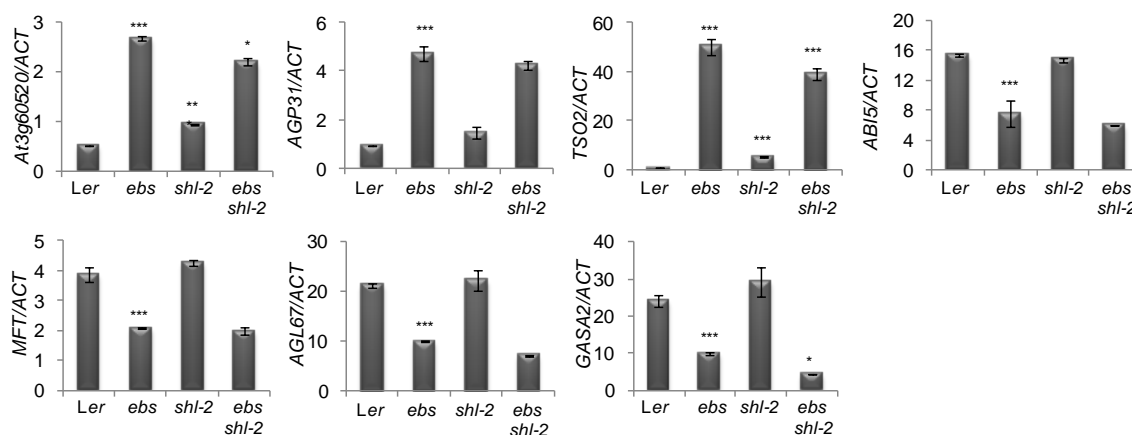


Figura 39. Niveles de expresión en el doble mutante *ebs shl* de genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs*. Expresión medida por qPCR de los genes *At3g60520*, *AGP31*, *TSO2*, *ABI5*, *MFT*, *AGL67* y *GASA2* en semillas frescas de *Ler* y de *ebs*, *shl* y *ebs shl-2*, embebidas durante 1 día. Los valores de expresión se han relativizado con los de *ACT2*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a *Ler* y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Como se muestra en la Figura 39, los cambios de expresión en el mutante *ebs* son consistentes con los observados previamente en nuestros experimentos de transcriptómica y de qRT-PCR, confirmando estas observaciones. Además, pudimos comprobar que en el mutante *shl-2*, los niveles de expresión de los genes ensayados son idénticos o muy similares a los encontrados en semillas del tipo silvestre. Estos resultados están de acuerdo con la ausencia de alteraciones en la dormición de este mutante (Figura 24). Cuando cuantificamos los niveles de expresión de estos mismos genes en el doble mutante *ebs shl-2*, pudimos comprobar que en la mayor parte de los casos (*At3g60520*, *AGP31*, *TSO2*, *ABI5* y *MFT*) la presencia de ambas mutaciones no potenciaba significativamente la desregulación observada en el mutante sencillo *ebs*. Sin embargo, la mutación *shl-2* potencia la desregulación de la expresión de los genes *AGL67* y *GASA2* observada en *ebs*, y que es consistente con la mayor reducción de dormición que muestra el doble mutante *ebs shl-2* en comparación con *ebs*.

5.4 Estudio de la posible implicación de los genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs* en la regulación de la dormición mediada por *EBS*.

Algunos de los genes expresados diferencialmente en los mutantes *ebs* y *spt-10*, podrían estar mediando el efecto de *EBS* y *SPT* sobre el control de la germinación

RESULTADOS

de la semilla durante el periodo de dormición. Por ello, sería previsible que la pérdida de función de aquellos genes implicados en la regulación de este proceso conllevara defectos en el proceso de dormición. De hecho, para algunos de los genes identificados en este análisis, como *RGL2*, *SOM*, *MFT* y *AGL67*, se ha descrito un papel en la regulación de la dormición en *Arabidopsis* (Piskurewicz et al., 2008; Kim et al., 2008; Park et al., 2011; Bassel et al., 2011, Vaistij et al., 2013). Para otros, en cambio, no se conoce su función, o se han descrito funciones en otros aspectos del desarrollo o de la biología de *Arabidopsis*, pero no en la dormición de la semilla.

Los datos transcriptómicos obtenidos en este trabajo y los publicados recientemente muestran una sobreexpresión de *SPT* en el alelo *spt-10* (Vaistij et al., 2013), a pesar de que fue descrito inicialmente como un alelo de pérdida de función (Penfield et al., 2005). Estas observaciones podrían complicar la interpretación de los datos transcriptómicos obtenidos con dicho mutante. Además, como hemos mencionado anteriormente, muchos de los genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs* muestran una desregulación similar en el mutante *spt-10*. Por ello, dado el interés primordial de nuestro laboratorio por profundizar en el estudio de la proteína EBS y sus homólogos en *Arabidopsis*, decidimos centrar nuestro estudio en la regulación de la dormición mediada por EBS. Por ello, decidimos iniciar el análisis de la posible implicación de diversos genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs* en la regulación de la dormición, e investigar posibles interacciones genéticas de *EBS* con aquellos loci que también estuviesen implicados en la modulación de la dormición de la semilla. Para ello, obtuvimos mutantes portadores de inserciones de T-DNA en algunos de los genes identificados, y analizamos los niveles de dormición de sus semillas. De esta forma pudimos comprobar que los mutantes del gen *At3g60520*, sobreexpresado en los dos mutantes analizados, no presentaron alteraciones en su fenotipo de dormición; asimismo, los mutantes en su homólogo *At1g02070* y los dobles mutantes combinando ambas mutaciones también muestran un fenotipo de dormición similar al del tipo silvestre (no mostrado). Los mutantes en los loci *ATS1*, expresado diferencialmente únicamente en el mutante *ebs*, así como *WRKY23*, que muestra cambios opuestos de expresión en los mutantes *ebs* y *spt-10*, tampoco tuvieron alteraciones en el nivel de dormición de la semilla (no mostrado). En nuestras condiciones de estudio tampoco observamos cambios en la dormición de la semilla en los mutantes *mft* a pesar de que se ha descrito recientemente una disminución de la dormición en el alelo *mft-2* (Vaistij et al., 2013). En cambio, de acuerdo con resultados anteriores, sí mostraron alteraciones de la dormición los mutantes *rgl2*, *scl14* y *agl67*. Además, encontramos que los mutantes *agp31* también presentaban defectos en la

dormición no descritos previamente. *RGL2*, *AGL67*, *AGP31* así como *MFT* se encuentran desregulados de forma similar tanto en el mutante *ebs* como en *spt-10*, mientras que *SCL14* se encuentra reprimido exclusivamente en el mutante *ebs*. En las secciones siguientes se describen los resultados obtenidos en el análisis de estos mutantes, cuya pérdida de función conlleva a alteraciones en la dormición, y que por tanto serían buenos candidatos a mediar el efecto de *EBS* y, en algunos casos, posiblemente el de *SPT* en este proceso.

5.4.1 Caracterización del fenotipo de dormición en semillas frescas de mutantes *agp31*.

AGP31 codifica una proteína de la pared celular, con una organización multidominio única en *Arabidopsis* (Liu y Mehdy, 2007; Albenne et al., 2012), y que podría estar implicada en respuestas de defensa y en desarrollo. Se ha demostrado que la expresión de *AGP31* está reprimida por metiljasmonato, por heridas y por ABA en hojas (Liu y Mehdy, 2007), pero hasta el momento no se ha descrito implicación alguna en el control de la dormición de semillas. Sin embargo, cuando analizamos semillas frescas del mutante *agp31*, pudimos observar una reducción moderada pero significativa en los niveles de dormición (Figura 40), en comparación con los mostrados por semillas del tipo silvestre. Estas alteraciones observadas en el mutante *agp31* son consistentes con la implicación de *AGP31* en el control de la dormición.

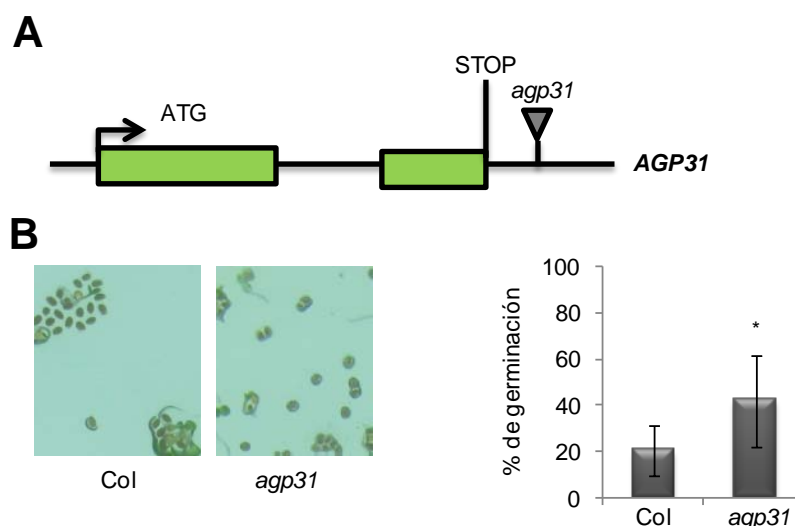


Figura 40. Los mutantes *agp31* muestran una reducción del nivel de dormición de la semilla. A. Diagrama de la inserción de T-DNA en el mutante *agp31*. B. Fenotipo y cuantificación de la germinación de semillas frescas del mutante *agp31* respecto a la línea silvestre Col. Los ensayos se realizaron a los 5 días después de la imbibición. Significación $*=p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Con el fin de determinar si *EBS* y *AGP31* interaccionan genéticamente en el control de la dormición, generamos plantas dobles mutantes *ebs agp31*. Como se observa en la Figura 41, en las semillas de este doble mutante la dormición es aún más reducida que en las de sus parentales. Estos resultados sugieren que ambos genes actúan de forma aditiva sobre el control de la dormición, y que a pesar de que *EBS* es necesario para reprimir directa o indirectamente la expresión de *AGP31*, éste tendría funciones independientes de *EBS* en los circuitos genéticos que modulan la dormición.

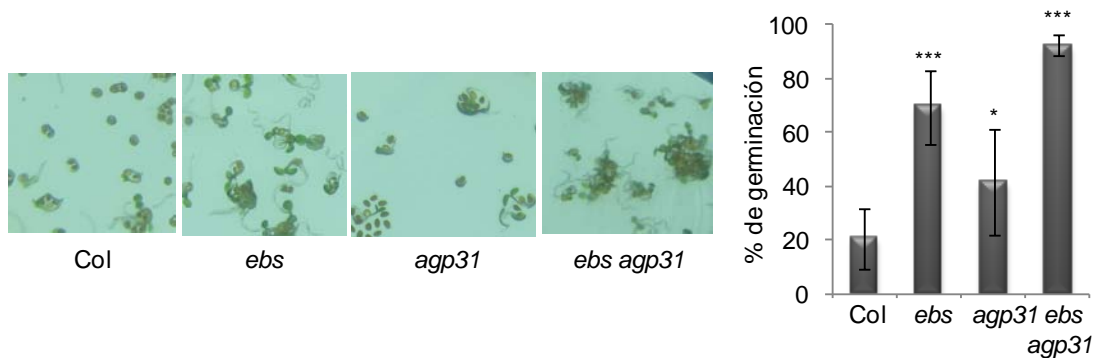


Figura 41. Los genes *EBS* y *AGP31* no interaccionan genéticamente en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*. Fenotipo de dormición y cuantificación de la germinación de semillas frescas del mutante *ebs*, *agp31* y del doble mutante *ebs agp31*, respecto al tipo silvestre Col. Los ensayos se realizaron a los 5 días después de imbibición. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

5.4.2 Caracterización del fenotipo de dormición observado en semillas frescas de mutantes *sc14*.

SCL14 se expresa débilmente en todos los tejidos de la planta de *Arabidopsis*, pero muestra niveles de expresión 10 veces más altos en semillas secas (Fode et al., 2008). Además, actúa inhibiendo la represión de la germinación dependiente de ABA: mediante análisis informáticos de genes implicados en dormición, se ha observado que *SCL14* está conectado con factores que median la respuesta a ABA, como *ABI3* y *ABI5* (Bassel et al., 2011). Estas observaciones, unidas a la desregulación de la expresión de *SCL14* que hemos observado en el mutante *ebs*, sugieren que *SCL14* podría participar también en la regulación de la dormición. De hecho, tal como se observa en la Figura 42, los mutantes *sc14-1* (Fode et al., 2008) muestran una reducción de la dormición de la semilla, en comparación con lo observado en las semillas de plantas Col.

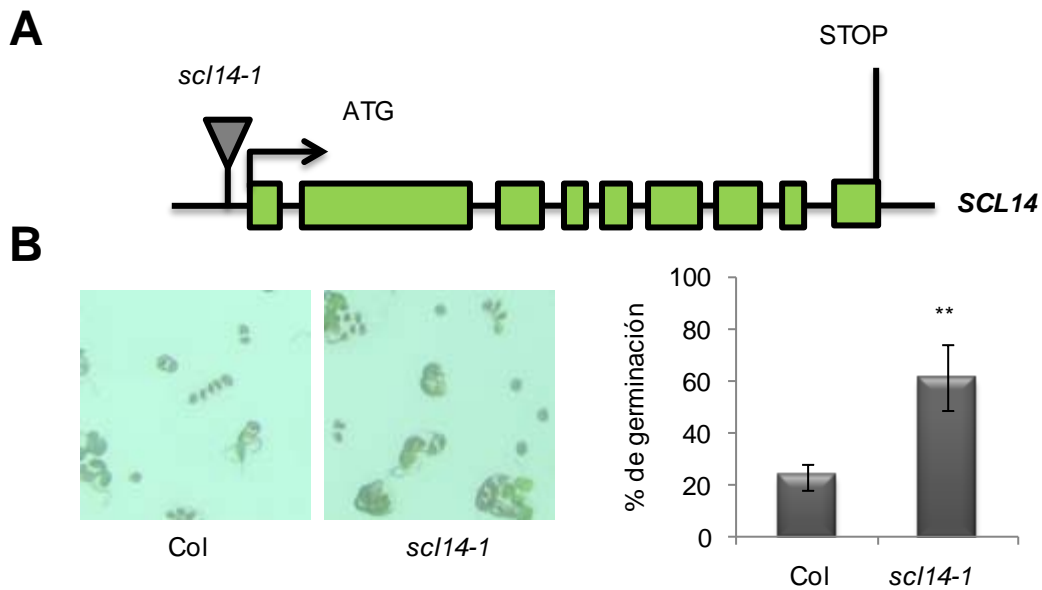


Figura 42. Los mutantes *scl14-1* muestran una reducción de la dormición de la semilla. A. Esquema de la inserción de T-DNA en el mutante *scl14-1* (Fode et al., 2008; Bassel et al., 2011). B. Fenotipo de dormición y cuantificación de la germinación de semillas frescas del tipo silvestre Col y del mutante *scl14-1* a los 5 días después de la imbibición. Significación **= $p \leq 0,01$, que establece un nivel de confianza del 99%.

Asimismo, para determinar una posible interacción genética entre *EBS* y *SCL14* generamos el doble mutante *ebs scl14-1* y analizamos el fenotipo de dormición del doble mutante. Tal como se observa en la Figura 43, encontramos una reducción significativa de los valores de germinación observados en el doble mutante en comparación con los parentales, siendo la dormición similar a la que presentan las semillas del tipo silvestre. Estos resultados han desvelado una compleja interacción genética entre *EBS* y *SCL14* en el control de la dormición. Serán necesarios experimentos adicionales para comprender la naturaleza de la interacción observada entre *EBS* y *SCL14*.

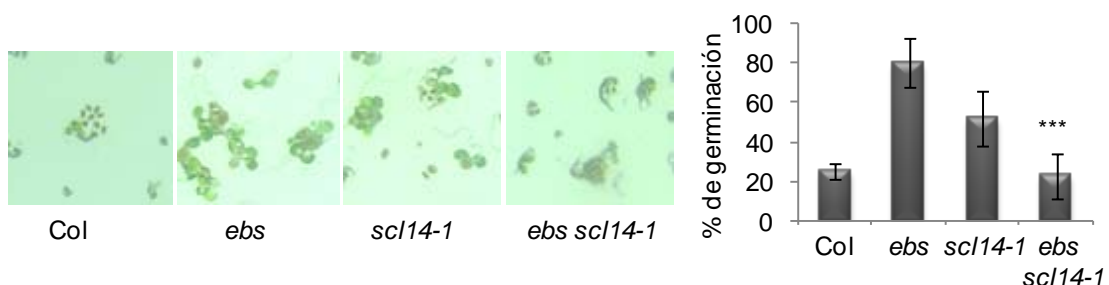


Figura 43. Fenotipo de dormición del doble mutante *ebs scl14-1*. Fenotipo de dormición y cuantificación de la germinación de semillas frescas del tipo silvestre Col, de los mutantes *ebs*, *scl14-1* y del doble mutante *ebs scl14-1* a los 5 días después de imbibición. Significación ***= $p \leq 0,005$, que establece

RESULTADOS

un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

5.4.3 Análisis de la interacción genética entre *EBS* y *RGL2* en el control de la dormición de semillas.

RGL2 modula la interacción entre GA y ABA durante la germinación de la semilla (Lee et al, 2002; Tyler et al., 2004, Ko et al., 2006; Zentella et al., 2007; Piskurewicz et al., 2008; Lee et al, 2010; Stamm y Kumar et al., 2010; Yu et al., 2010). Además, las semillas del mutante *rgl2* muestran una clara reducción de la dormición (Lee et al, 2002; Stamm et al, 2012). Puesto que *RGL2* se encuentra desregulado en el mutante *ebs*, y ambos mutantes muestran defectos en la regulación de la dormición de la semilla, es posible que estos dos genes participen en una ruta común de control de la dormición. Como se observa en la Figura 44 y de acuerdo con datos previos, las semillas de los mutantes *rgl2* tienen un nivel de dormición menor que el tipo silvestre (Lee et al, 2002; Stamm et al, 2012). Además, el doble mutante *ebs rgl2-5* presenta una alteración similar del fenotipo de dormición que los parentales mutantes sencillos, lo que sugiere una posible interacción genética entre ambos loci en la represión de la germinación durante el periodo de dormición.

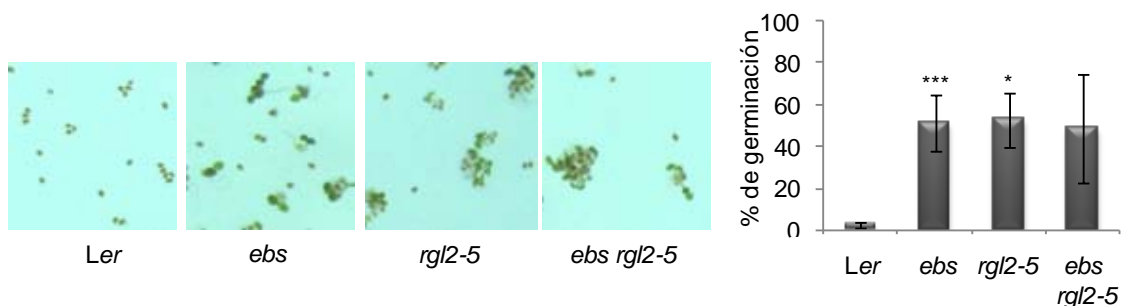


Figura 44. Fenotipo de dormición del doble mutante *ebs rgl2-5*. Fenotipo de dormición y cuantificación de la germinación de semillas frescas del tipo silvestre *Ler*, de los mutantes *ebs*, *rgl2-5* y del doble mutante *ebs rgl2-5* a los 5 días después de imbibición. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

5.4.4 Caracterización del fenotipo de dormición en semillas frescas de los mutantes *flc* y *ft*.

Debido a que la expresión de *FLC* y de *FT*, reguladores claves del proceso de la floración, está alterada en mutantes de complejos remodeladores de la cromatina que además regulan la dormición, nos propusimos estudiar el fenotipo de dormición

que presentaban los mutantes *flc* y *ft*. Además del tiempo de floración, *FLC* también regula la germinación de manera dependiente de la temperatura (Chiang et al., 2009). Se ha demostrado que para que tenga lugar la germinación, son necesarios niveles altos de expresión de *FLC* y bajas temperaturas. Se ha propuesto que *FLC* podría regular la germinación a través de la ruta de la degradación de ABA y de síntesis de GA en semillas embebidas (Chiang et al., 2009), ya que se ha observado que en semillas de líneas que sobreexpresan *FLC* embebidas a temperaturas bajas, se produce un aumento del nivel de expresión de *CYP707A2*, uno de los principales genes implicados en las rutas que degradan ABA, y de *GA20ox1*, un gen que regula la conversión de GA inactivo a GA bioactivo, promoviendo así la germinación (Chiang et al., 2009). Además, *FLC* se encuentra desregulado en el mutante *ebs* de acuerdo con nuestros datos transcriptómicos (Figura 36).

Por otro lado, previamente se ha descrito el papel de EBS en la represión de *FT* durante el control de la floración en *Arabidopsis* (Piñeiro et al., 2003). Puesto que se han identificado numerosos reguladores de la floración implicados también en el control de la dormición, nos propusimos analizar también si *FT* desempeña un papel durante la dormición de la semilla. Para ello, realizamos ensayos de dormición utilizando semillas del mutante *ft*, con los resultados que se describen a continuación.

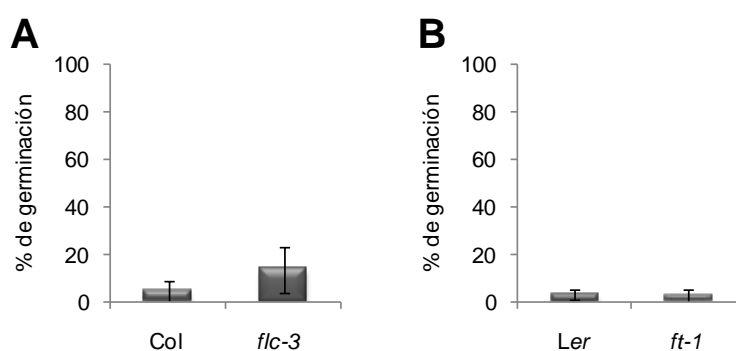


Figura 45. Los mutantes *flc* y *ft* no muestran alteraciones detectables en la dormición de la semilla. Cuantificación de la germinación de semillas frescas de Col y Ler, y de los mutantes *flc-3* (A) y *ft-1* (B) a los 5 DDI.

En nuestras condiciones de estudio, los mutantes *flc-3* (Figura 45A) y *ft-1* (Figura 45B) no presentan diferencias significativas en los niveles de dormición respecto al tipo silvestre. Los resultados de otros grupos de investigación, que han obtenido datos similares al analizar el fenotipo de dormición del mutante *flc* sin encontrar alteraciones significativas (Liu et al., 2011), confirman nuestras observaciones experimentales. Aunque no es posible descartar que puedan ocurrir

RESULTADOS

fenómenos de redundancia funcional con otros miembros de la familia de factores de transcripción de tipo MADS box, estos datos indican que *FLC* no sería estrictamente necesario para el control de la dormición de la semilla. Los datos mostrados en la Figura 45 sugieren que el gen *FT* tampoco sería esencial para la regulación del proceso de dormición, aunque de nuevo no sería posible descartar totalmente que fenómenos de redundancia funcional con otros miembros de la familia *FT-like* enmascaren la función de *FT* en este proceso.

5.4.5 Análisis de la posible interacción genética entre *EBS* y *AGL67* en el control de la dormición.

AGL67 codifica un factor de transcripción de la familia MADS box, específico de semillas (Le et al., 2010) que como hemos dicho, se ha propuesto como un represor central de la germinación de semillas (Bassel et al., 2011). Con el fin de desvelar posibles interacciones funcionales entre *AGL67* y *EBS* en la regulación de la dormición, nos propusimos analizar las alteraciones de la germinación presentes en semillas frescas de dobles mutantes *ebs agl67*. Para ello, realizamos cruzamientos de *ebs* con alelos de *agl67* descritos previamente (Bassel et al., 2011). Como se observa en la Figura 46, los dos alelos de inserción empleados, *agl67-1* y *agl67-2*, son portadores de inserciones de T-DNA en el extremo 3' del locus *AGL67* que afectan de forma significativa a su expresión. La expresión del gen en el alelo *agl67-1* es detectable en experimentos de qRT-PCR con niveles similares a los del tipo silvestre, utilizando cebadores aguas arriba de la inserción, pero no se detecta el mensajero empleando cebadores situados por debajo del sitio de inserción del T-DNA. En cambio, la expresión en el alelo *agl67-2* es casi indetectable con ambas parejas de cebadores (Figura 46B). Estas observaciones sugieren que la inserción de T-DNA en *agl67-1* podría generar una proteína truncada, mientras que *agl67-2* podría representar un alelo de pérdida de función. Por ello, centramos nuestro análisis genético en el doble mutante *ebs agl67-2*. Como se puede observar en la Figura 46C, el análisis de expresión por qRT-PCR confirmó que la expresión de *AGL67* no se detecta en este doble mutante, y que además, de acuerdo con el análisis de perfiles transcriptómicos, su nivel de expresión es inferior en el mutante *ebs* que en las semillas de tipo silvestre.

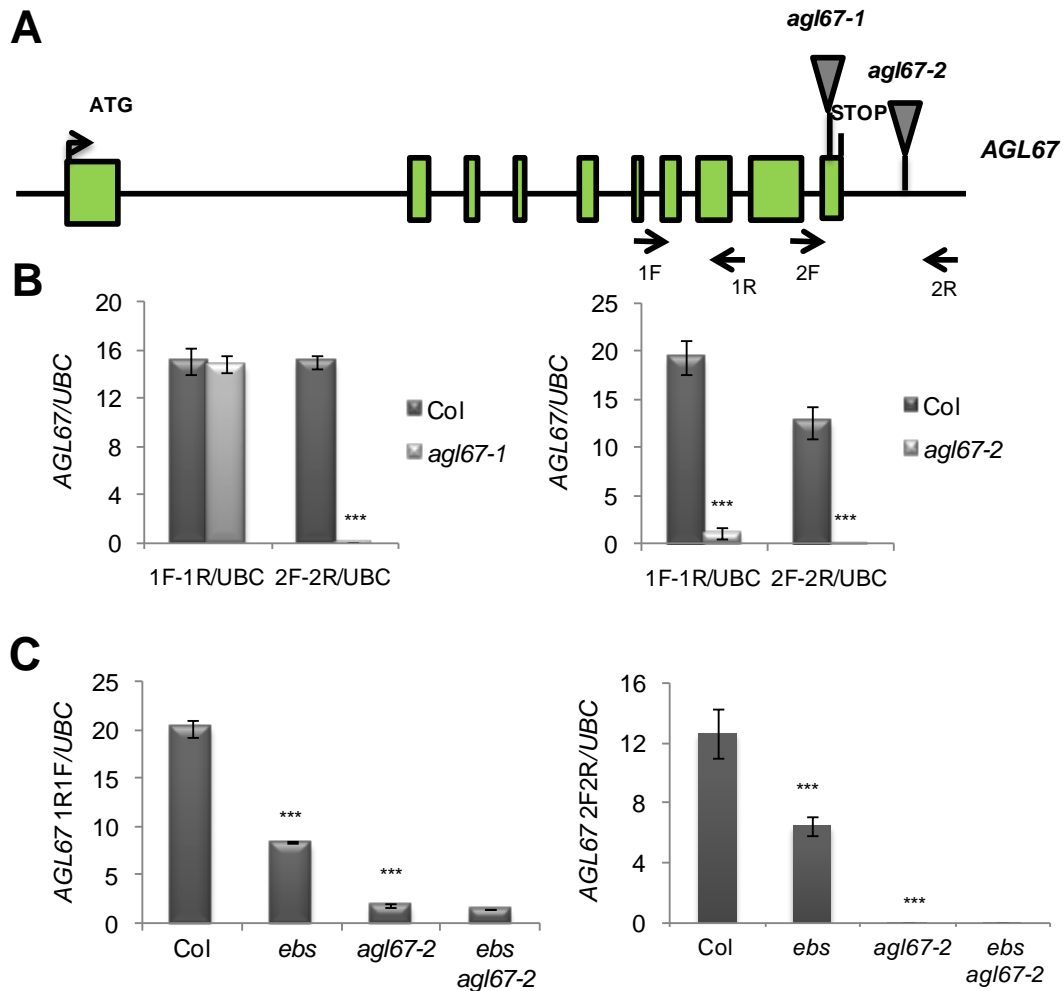


Figura 46. Esquema de las inserciones de T-DNA y expresión de *AGL67* en semillas de las líneas mutantes *agl67-1* y *agl67-2* y del doble mutante *ebs agl67-2*. A. Esquema de la estructura del gen *AGL67* donde se sitúan los sitios de inserción del T-DNA en las líneas mutantes *agl67-1* y *agl67-2*. Los exones se representan en verde, y los intrones y UTRs con una línea horizontal. Además se representa la situación de los cebadores utilizados para llevar a cabo las reacciones de qRT-PCRs: 1F-1R, entre el séptimo exón y el octavo exón, y 2F-2R, entre el último exón y la región 3' UTR. B. Determinación por qRT-PCR de los niveles de expresión de *AGL67* en semillas frescas de Col y de los mutantes *agl67-1* y *agl67-2*, con dos parejas de cebadores 1F-1R y 2F-2R. C. Determinación por qRT-PCR de los niveles de expresión de *AGL67*, con los cebadores usados anteriormente, en semillas frescas y embebidas durante 1d, del tipo silvestre Col y en los mutantes *ebs*, *agl67-2* y del doble mutantes *ebs agl67-2*. Los valores de expresión de *AGL67* se han relativizado con respecto a los de *UBC*. Significación ***= $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación en B se refiere a la diferencia de expresión entre Col y el mutante sencillo. La significación en C se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Como se observa en la Figura 47 y de acuerdo con resultados previos, tanto el mutante *ebs* como *agl67* presentan una disminución significativa de la dormición de la semilla, aunque ésta es mayor en el mutante *ebs*. Cuando analizamos el fenotipo de

RESULTADOS

dormición de semillas del doble mutante *ebs agl67-2*, pudimos observar que el porcentaje de germinación de semillas frescas fue siempre superior al del tipo silvestre, y muy similar al del mutante *agl67*, y por tanto inferior al determinado para semillas de *ebs*. Resultados similares se obtuvieron cuando analizamos la germinación de semillas frescas del doble mutante en oscuridad. En estas condiciones, las semillas frescas del doble mutante *ebs agl67* muestran nuevamente niveles de germinación idénticos a los del mutante sencillo *agl67*, que son sensiblemente inferiores a los de *ebs* (Figura 48).

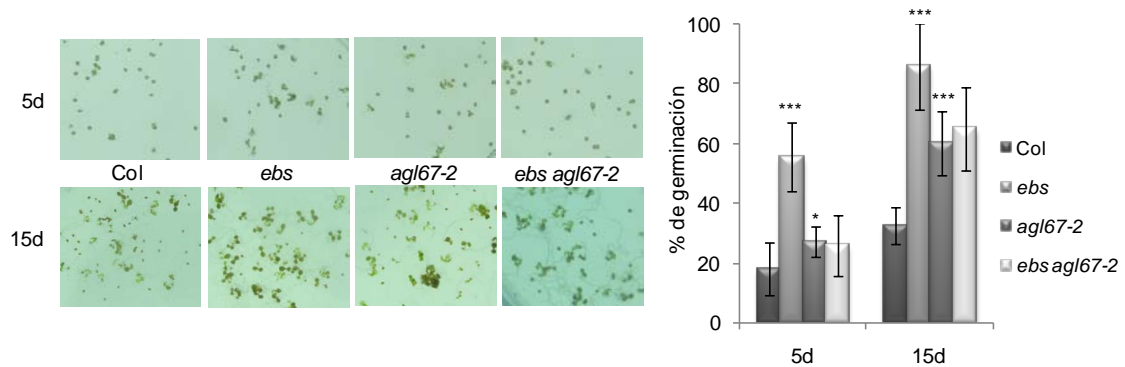


Figura 47. Fenotipo de dormición del doble mutante *ebs agl67-2* a los 5 y a los 15 DDI en condiciones de iluminación con LB. Fenotipo y cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col, *ebs*, *agl67-2* y del doble mutante *ebs agl67-2*, a los 5 y a los 15 DDI. En los dos análisis el doble mutante es significativamente diferente a *ebs*, pero similar a *agl67-2*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos, dentro de un mismo día.

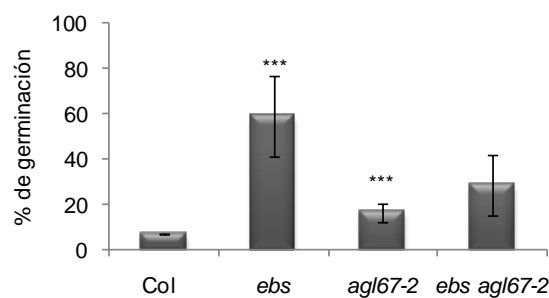


Figura 48. Fenotipo de dormición de *ebs agl67-2* en condiciones de oscuridad. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col, y de los mutantes *ebs*, *agl67-2* y el doble mutante *ebs agl67-2* a los 7 DDI y cultivadas en condiciones de oscuridad. Significación: ***= $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

El mutante *agl67-1* muestra niveles detectables de la región 5' del transcrito del gen (Figura 46B), lo que sugiere que este alelo mutado podría no ser un alelo de

pérdida total de la función de este gen. A pesar de ello, este alelo de *AGL67* también muestra una alteración significativa de los niveles de dormición de la semilla (Figura 49). Para confirmar las observaciones obtenidas con el alelo *agl67-2*, cuantificamos la dormición de semillas frescas del tipo silvestre Col, de los mutantes *ebs*, *agl67-1* y del doble mutante *ebs agl67-1* a los 5 DDI. Así observamos que el doble mutante *ebs agl67-1* presenta diferencias significativas respecto al parental *ebs* y no presenta diferencias respecto a *agl67-1*, resultados similares a los obtenidos con el doble mutante *ebs agl67-2*.

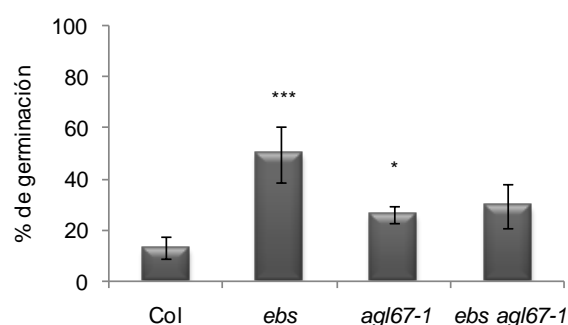


Figura 49. Fenotipo de dormición de *ebs agl67-1* en condiciones de LB. Cuantificación de la dormición de semillas frescas del tipo silvestre Col, de los mutantes *ebs*, *agl67-1* y del doble mutante *ebs agl67-1*, a los 5 días después de imbibición, y cultivadas en condiciones de LB. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y del 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Todos estos datos indican que en ausencia de un gen *AGL67* funcional, las mutaciones en *EBS* no provocan una disminución adicional de la dormición, y que por tanto *AGL67* es necesario para que se manifieste el fenotipo de dormición reducida de mutantes *ebs*. Puesto que la expresión de *AGL67* disminuye en semillas de este mutante, estas observaciones son consistentes con que *EBS* actúe en la misma ruta de control de la dormición que este regulador central de la dormición. Por tanto, *EBS* es necesario para regular la expresión de *AGL67* durante el periodo de dormición de la semilla, y esta proteína MADS-box a su vez, podría mediar el efecto de *EBS* sobre otros genes implicados en la regulación de la dormición de la semilla. Puesto que *AGL67* es un factor de transcripción con un papel regulador central en este proceso, decidimos analizar el efecto de la pérdida de función de *AGL67* sobre la expresión de algunos de los genes que se encuentran desregulados en el mutante *ebs*, con el fin de poder establecer así hipótesis acerca de cuáles de los genes regulados por *EBS* durante el periodo de dormición de la semilla, estarían también bajo el control de *AGL67*.

RESULTADOS

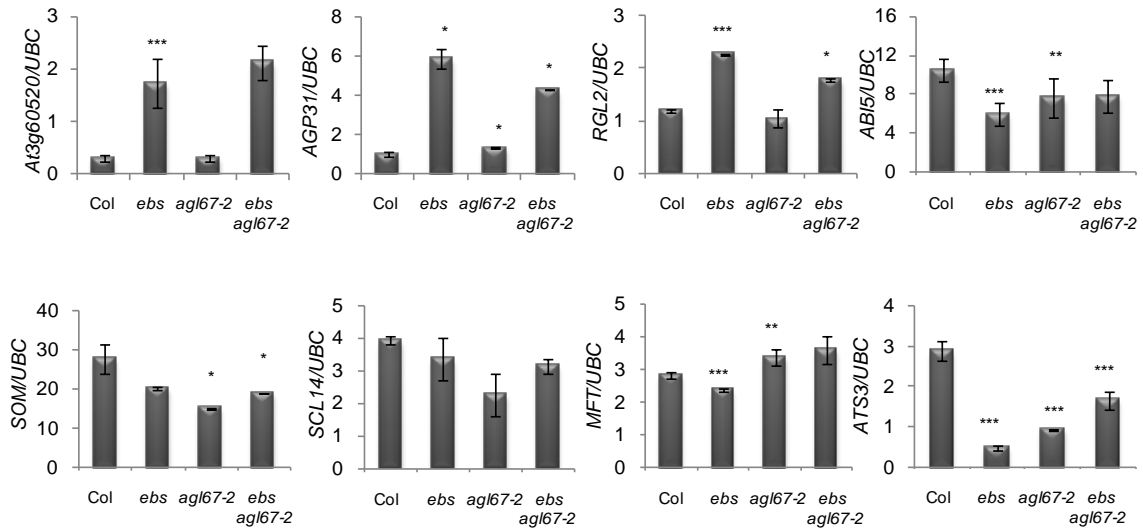


Figura 50. Análisis de la expresión de los genes expresados diferencialmente en los mutantes *ebs*, *agl67-2* y *ebs agl67-2*. Expresión de los genes *At2g60520*, *AGP31*, *RGL2*, *ABI5*, *SOM*, *SCL14*, *MFT* y *ATS3*, en semillas frescas y embebidas durante 1d del tipo silvestre Col y de los mutantes *ebs*, *agl67-2* y el doble mutante *ebs agl67-2*, cuantificada por qRT-PCR. Los valores de expresión se han relativizado con los de *UBC*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, **= $p \leq 0,01$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5%, 99% y 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Como se observa en la Figura 50, algunos de los genes diferencialmente expresados en el mutante *ebs*, no se ven afectados por la pérdida de función de *AGL67*. Este es el caso de *RGL2*, *AGP31* y *At3g60520*, que además muestran un nivel de expresión similar en el mutante *ebs* y en el doble mutante *ebs agl67*. Estos resultados sugieren que la expresión de estos tres genes estaría regulada por *EBS* de manera independiente de *AGL67*. En el resto de los genes analizados en este experimento (*ATS3*, *MFT*, *SCL14*, *SOM* y *ABI5*) los niveles de expresión están también alterados en el mutante *agl67*, lo que indica que este MADs box es necesario para su correcta regulación. Serán necesarios experimentos adicionales para determinar cuáles de esos genes desregulados en los mutantes *ebs* y *agl67* median el papel de estos dos reguladores transcripcionales sobre la dormición, así como para comprender la relación funcional existente entre *EBS* y *AGL67* en la regulación de este proceso. Estas observaciones sugieren que *AGL67* podría mediar la regulación de *EBS* sobre determinados genes, pero no sobre todos los que se encuentran desregulados en el mutante *ebs*. Por tanto, *EBS* regularía la expresión de muchos de estos genes independientemente de *AGL67*, aunque desconocemos todavía la relevancia de dichos loci en la regulación de la dormición mediada por *EBS*.

El análisis genético que hemos realizado ha desvelado una interacción genética entre *EBS* y *AGL67*, lo que sugiere que ambos loci podrían actuar en una ruta genética común implicada en la regulación de la dormición de la semilla en *Arabidopsis*. Puesto que la expresión de *AGL67* está anormalmente reprimida en el mutante *ebs*, *AGL67* actuaría por debajo de *EBS* en este circuito regulador de la dormición. Trabajos previos de nuestro laboratorio han permitido demostrar que *EBS* es capaz de unirse a zonas reguladoras de la cromatina del locus *FT* para reprimir su expresión, y esta unión es esencial para mantener la cromatina de este regulador central del tiempo de floración en *Arabidopsis* en una conformación inactiva que impide una iniciación prematura de la floración (López-González, Tesis Doctoral 2010). Con el fin de determinar si la regulación de *EBS* sobre *AGL67* es directa como en el caso de *FT*, realizamos experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), utilizando líneas transgénicas de *Arabidopsis* en las que el cDNA de *EBS* se expresa bajo el control de su propio promotor y fusionado con un epítipo MYC. La caracterización previa de estas líneas llevada a cabo en nuestro laboratorio ha demostrado que la proteína *EBS* es funcional, ya que es capaz de complementar los defectos fenotípicos presentes en plantas mutantes *ebs* (López-González, Tesis Doctoral 2010). Como se observa en la Figura 51, en el DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-MYC en las líneas *pEBS::MYC-EBS*, no pudimos amplificar ninguna de las regiones analizadas del gen *AGL67* a un nivel significativamente superior que en los controles realizados con la misma línea sin anticuerpo. Si bien no podemos descartar la unión de *EBS* a zonas genómicas no analizadas del locus *AGL67*, estos resultados son consistentes con que la regulación de *EBS* sobre *AGL67* no sea directa.

EBS tiene una función represora sobre la expresión de *FT*, y este gen maestro de la floración se encuentra sobreexpresado en mutantes *ebs* (Piñeiro et al., 2003). Por el contrario, la expresión de *AGL67* se encuentra reprimida en semillas de mutantes *ebs*, lo que indica que *EBS* es necesario para la activación de *AGL67* durante el periodo de dormición de la semilla. Aunque no podemos descartar que *EBS* pueda tener una función activadora de la expresión génica en determinados contextos, estas observaciones en conjunto sugieren que la regulación de *EBS* sobre *AGL67* podría estar mediada por otro(s) regulador(es) hasta el momento desconocidos.

RESULTADOS

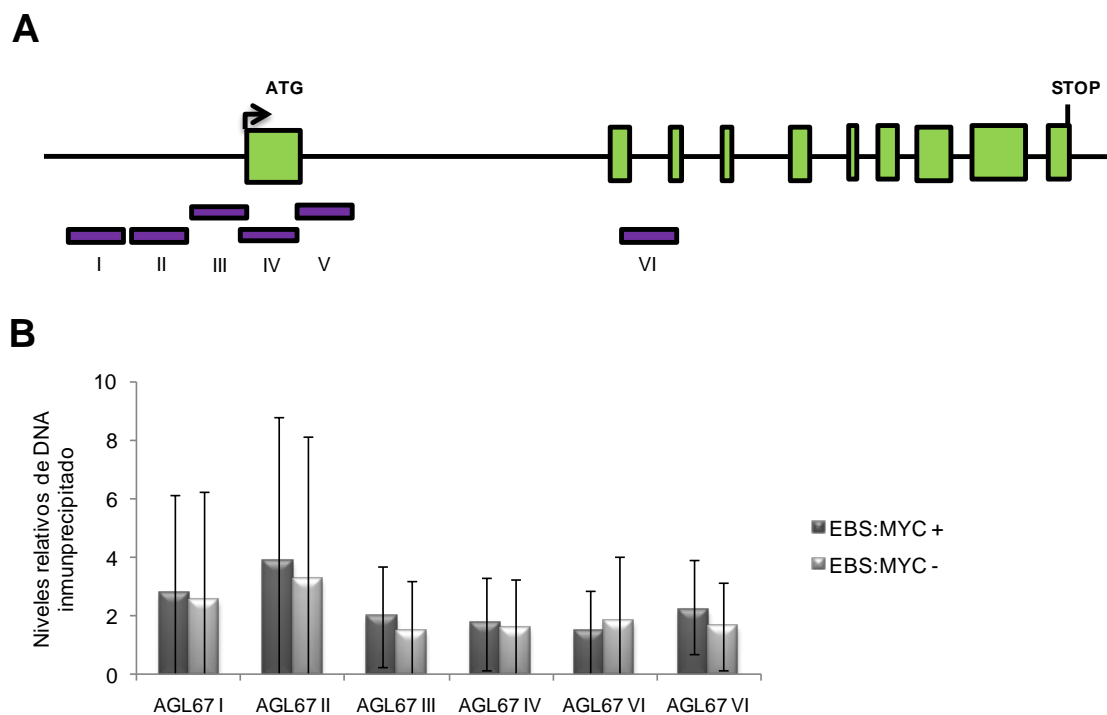


Figura 51. Análisis de la posible unión de EBS a regiones genómicas del locus *AGL67*. A. Esquema de la estructura genómica de *AGL67* indicando las regiones analizadas. B. Media de 3 análisis por qPCR para las regiones I-VI de la cromatina de *AGL67* utilizando como molde DNA inmunoprecipitado de semillas de líneas *pEBS::MYC-EBS* con el anticuerpo anti-MYC (EBS:MYC+), y en ausencia de dicho anticuerpo (EBS:MYC-).

6. Análisis de la posible interacción de *EBS* con otros factores remodeladores de cromatina en la regulación de la dormición.

Además de *EBS*, diferentes factores remodeladores de la cromatina se han implicado en la regulación de la dormición de la semilla en *Arabidopsis* (Liu et al, 2007; Liu et al., 2011), y algunos de ellos desempeñan funciones relacionadas con la modulación de los niveles de dicha marca de la cromatina, que tiene un papel central en la regulación de la expresión génica en eucariotas. Por ese motivo, decidimos analizar la existencia de posibles interacciones genéticas de *EBS* con genes que codifican remodeladores de la cromatina previamente implicados en la regulación de la dormición de la semilla, con especial énfasis en aquellos factores que median cambios en los niveles de H3K4me2/3.

6.1 Relación funcional de *EBS* con los genes *HUB1* y *HUB2*, implicados en la monoubiquitinación de la histona H2B.

6.1.1 Interacción de *EBS* con los genes *HUB1/2* en la regulación de la dormición.

Las proteínas de *Arabidopsis* HUB1 y HUB2 median la monoubiquitinación de la histona H2B (Zhu et al., 2005), que está funcionalmente relacionada con H3K4me3, una marca característica de genes transcripcionalmente activos (Alvarez-Venegas et al., 2003; Alvarez-Venegas y Avramova, 2005; Berr et al., 2009; Tamada et al., 2009; Alvarez-Venegas et al., 2010; Thorstensen et al., 2011). En *Arabidopsis* estas modificaciones resultan en cambios en la expresión de genes que influyen en procesos claves del desarrollo, como el control de la dormición de semillas y la transición floral (Liu et al., 2007; Cao et al., 2008), también regulados por *EBS* (Gómez-Mena et al., 2001; Piñeiro et al., 2003). Por todo ello, decidimos analizar si los genes *HUB* estaban relacionados funcionalmente con *EBS* en el control de la dormición. Para ello, realizamos un análisis genético en el que combinamos las mutaciones *ebs*, *hub1-4* y *hub2-2* en plantas dobles y triples mutantes, de cuyas semillas analizamos los niveles de dormición. De acuerdo con resultados previos, las semillas frescas de los mutantes *ebs*, *hub1* y *hub2* germinan prematuramente (Gómez-Mena et al., 2001; Liu et al., 2007) (Figura 52). De hecho, los dobles mutantes *hub1 hub2* muestran el mismo fenotipo de dormición que los mutantes sencillos, consistente con la participación de ambas proteínas en el mismo complejo proteico (Liu et al., 2007). Asimismo, los dobles mutantes *ebs hub* muestran en todos los casos una reducción de la dormición mayor que la observada en cada uno de los mutantes sencillos. Además, el triple mutante *ebs hub1 hub2* muestra una reducción adicional de la dormición, en comparación con los dobles mutantes mencionados anteriormente, y a los 2 DDI ya se observan el 100% de las semillas germinadas. Este fenotipo aditivo de los dobles y triples mutantes indica una ausencia de interacción genética entre *EBS* y los genes *HUB* en el control de la dormición, por lo que participarían en rutas genéticas al menos parcialmente independientes del control de la dormición.

RESULTADOS

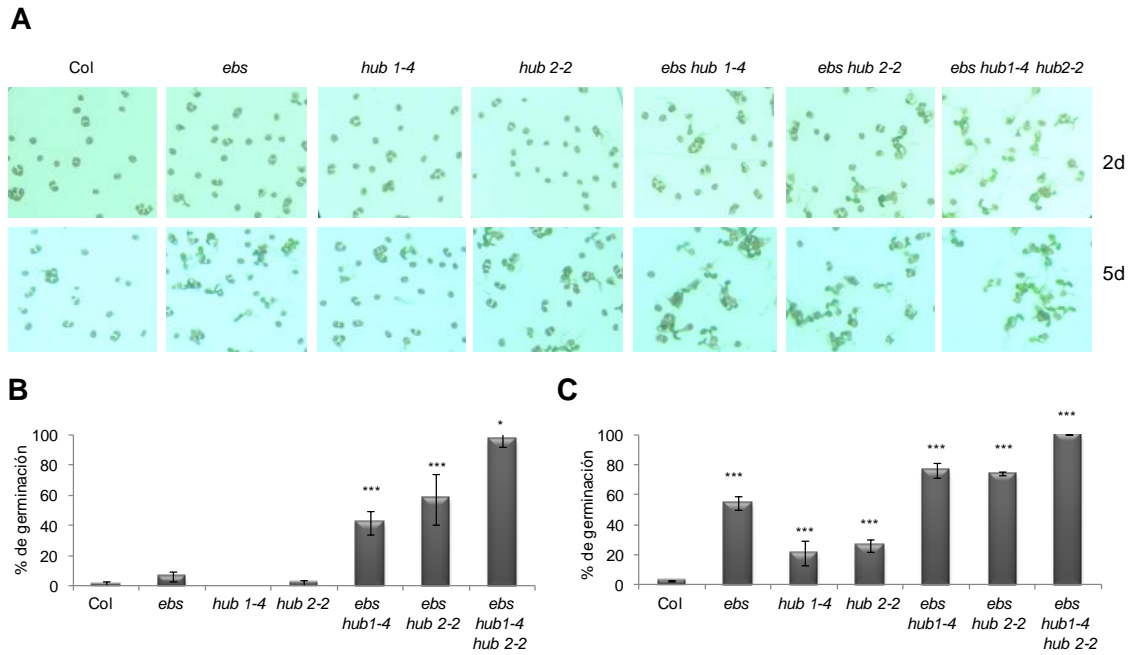


Figura 52. *EBS* actúa en una ruta genética independiente de los genes *HUB* en el control de la dormición. A. Dormición estimada como germinación a los 2 y 5 DDI de semillas frescas del tipo silvestre Col y de los mutantes *ebs*, *hub 1-4*, *hub 2-2*, de los dobles mutantes *ebs hub 1-4* y *ebs hub 2-2* y del triple mutante *ebs hub 1-4 hub 2-2*. Cuantificación del porcentaje de germinación del experimento mostrado en (A), a los 2 (B) y a los 5 (C) DDI. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establecen un nivel de confianza del 99,5% y 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col, de los dobles mutantes respecto a los mutantes sencillos, y del triple mutante respecto a los dobles mutantes.

Además, analizamos en el mutante *ebs* la expresión de varios genes que están regulados por *HUB1*, y que podrían mediar el efecto de este gen sobre la dormición de la semilla. De acuerdo con resultados previos (Liu et al., 2007), la expresión de los genes *NCED9*, *ATS2*, *CYP707A1* y *CYP707A2* disminuye de forma drástica en los mutantes *hub1*. Sin embargo, tal y como se observa en la Figura 53, la expresión de estos genes no está alterada de forma significativa en semillas del mutante *ebs*. Por lo tanto, nuestras observaciones son nuevamente consistentes con la idea que *EBS* tiene funciones independientes de *HUB1* en la regulación de genes que controlan la dormición de la semilla.

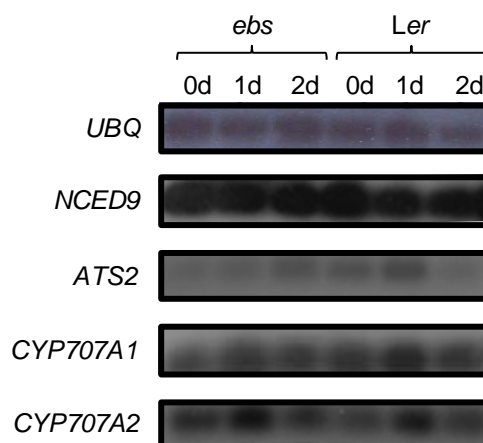


Figura 53. Expresión de genes regulados por HUB1 en el mutante ebs. Expresión medida por RT-PCR de *NCED9*, *ATS2*, *CYP707A1* y *CYP707A2*, genes que se encuentran desregulados en el mutante *hub1*, en semillas frescas del mutante *ebs* y de *Ler* embebidas durante 0, 1 y 2 días (0d, 1d y 2d). Como control interno se utilizó la expresión de *UBQ10*.

Por otro lado, analizamos el efecto de las mutaciones en los genes *HUB* sobre los niveles de mensajeros de genes que se encuentran expresados diferencialmente en el mutante *ebs*, y que identificamos en el análisis transcriptómico llevado a cabo. Para ello, cuantificamos mediante qRT-PCR el nivel de expresión de dichos genes en semillas de los mutantes *hub1-4*, *hub2-2*, de los dobles mutantes *ebs hub1-4* y *ebs hub2-2* y del triple mutante *ebs hub1-4 hub2-2*, así como en las semillas del tipo silvestre (Figura 54).

Como observamos en la Figura 54 las expresiones de los genes analizados muestran un comportamiento similar en *ebs* y en los mutantes *hub*, respecto al silvestre. En el caso de los genes *At3g60520*, *AGP31* y *TSO2*, las expresiones de los mutantes sencillos analizados son superiores a los de Col. En el caso de *ABI5*, *SOM*, *SCL14*, *MFT*, *AGL67* y *ATS3*, los mutantes sencillos muestran niveles inferiores de expresión en todos los genotipos analizados, aunque la disminución es mayor en el mutante *ebs* que en los otros mutantes sencillos. La expresión de los genes analizados en los dobles y triples mutantes muestra en todos los casos una desregulación mayor que la observada en los mutantes sencillos y particularmente mayor que en el mutante *ebs*. Por tanto, la pérdida de función de *EBS* y de los *HUBs* tiene un efecto aditivo sobre la desregulación de la expresión de los genes analizados. Por todo ello, en base a los análisis genéticos y de expresión realizados, podemos concluir que *EBS* y los genes *HUB* funcionarían en rutas independientes en el control de la dormición de semillas.

RESULTADOS

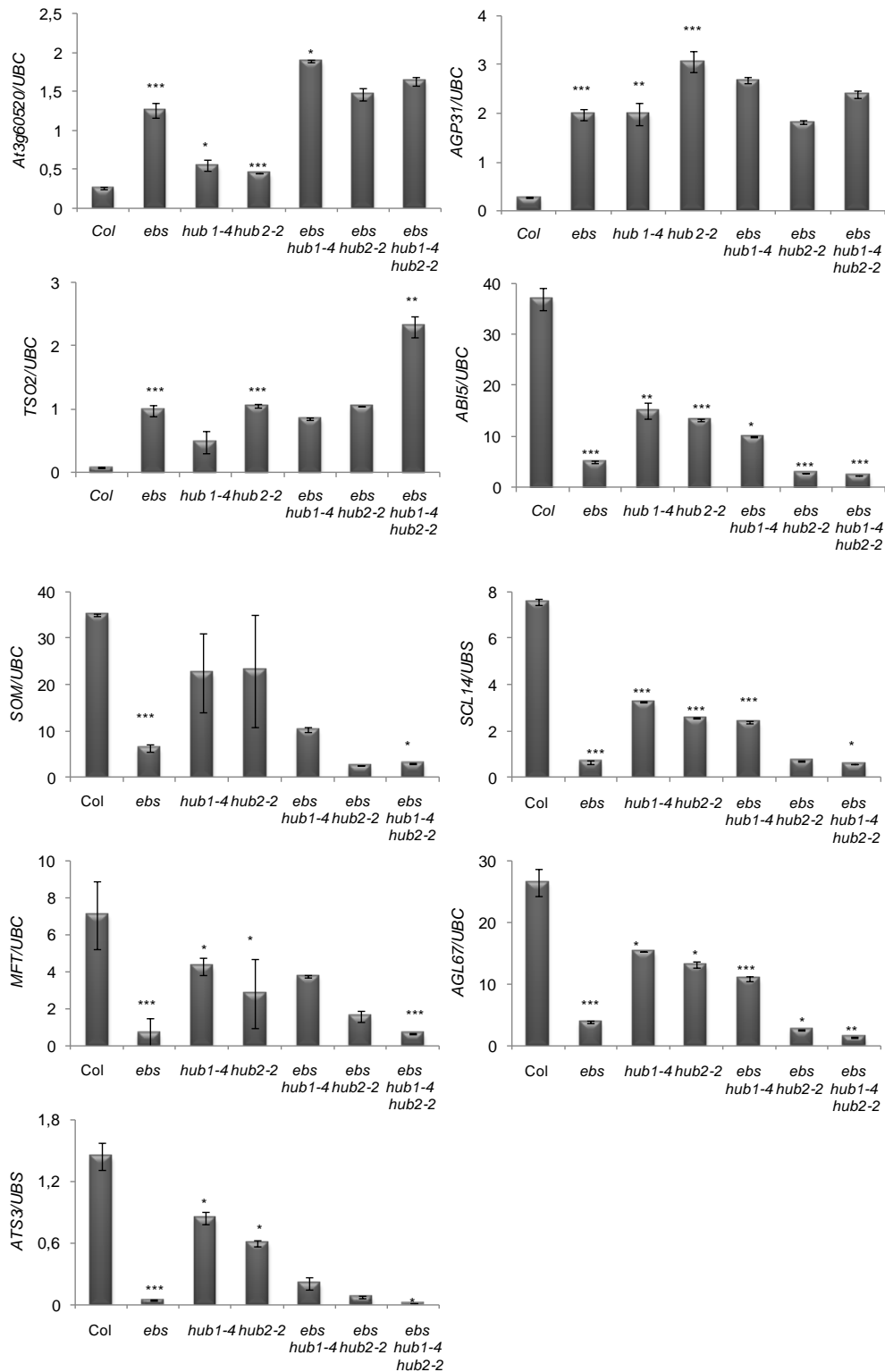


Figura 54. Efecto de mutaciones en los genes *HUB* sobre la expresión de genes desregulados en el mutante *ebs*. Expresión medida por qRT-PCR de los genes *At3g60520*, *AGP31*, *TSO2*, *ABI5*, *SOM*, *SCL14*, *MFT*, *AGL67* y *AT33*, y en semillas frescas embebidas durante 1 día. Se emplearon semillas del tipo silvestre Col y de los mutantes *ebs*, *hub 1-4*, *hub 2-2*, de los dobles mutantes *ebs hub1-4* y *ebs hub 2-2*, y del triple mutante *ebs hub1-4 hub 2-2*. Los valores de expresión se han relativizado con los de *UBC*. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col, de los dobles mutantes respecto a los mutantes sencillos, y del triple mutante respecto a los dobles mutantes.

6.1.2 Análisis de la interacción de *EBS* con *HUB1/2* en la regulación de la floración.

Tanto *EBS* como los genes *HUB1* y *HUB2* participan en el control de la floración (Piñeiro et al., 2003; Cao et al., 2008), un aspecto del desarrollo en el que nuestro laboratorio está también interesado. Aunque los resultados que hemos descrito anteriormente indican que no existe una interacción genética entre *EBS* y los genes *HUB* en el control de la dormición, no podemos descartar que exista en la regulación de otros procesos de desarrollo como la transición floral. Por ese motivo, decidimos analizar el tiempo de floración de los dobles y triples mutantes *ebs hub*, y que fueron generados para el análisis de dormición descrito anteriormente. En la Figura 55, se muestra el fenotipo de floración y la cuantificación del tiempo de floración de plantas del tipo silvestre Col y de los mutantes *ebs*, *hub1-4*, *hub2-2*, de los dobles mutantes *ebs hub1-4* y *ebs hub2-2* y de los triples mutantes *ebs hub1-4 hub2-2* en condiciones de DL y DC. Los dobles y triples mutantes analizados en las dos condiciones fotoperiódicas estudiadas, presentan un fenotipo de floración más temprano que la de los mutantes sencillos. Por lo tanto, el fenotipo de aceleración de la floración es aditivo, lo que indica que, al igual que en el caso de la dormición de la semilla, *EBS* y los genes *HUB* no interaccionan genéticamente en el control del tiempo de floración.

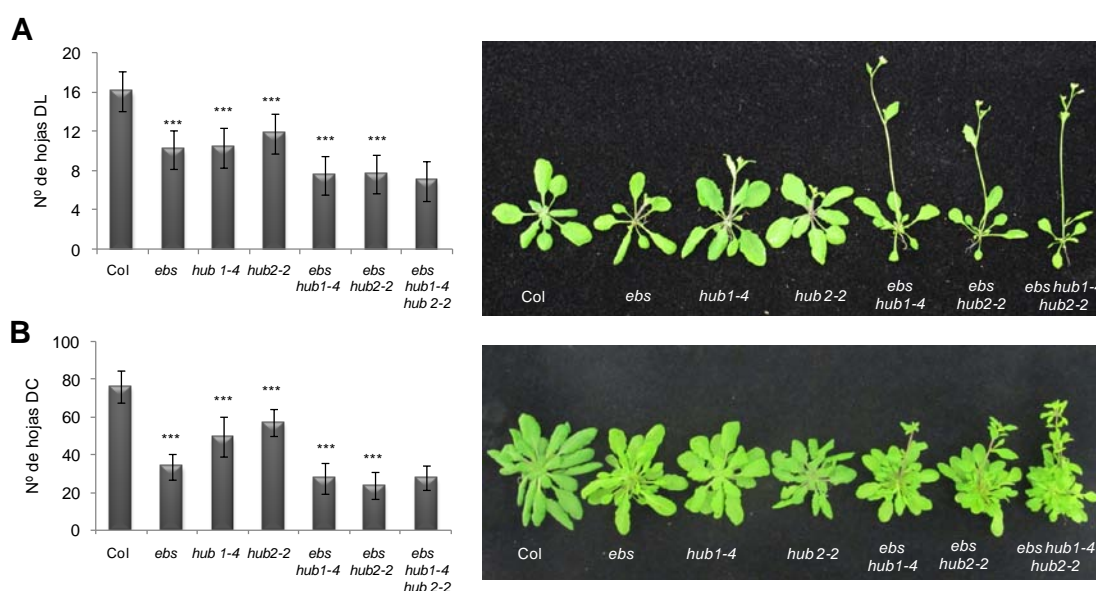


Figura 55. Los genes *HUBs* y *EBS* no interaccionan genéticamente en el control de la floración. Cuantificación y fenotipo de la floración de plantas del tipo silvestre Col y de los mutantes *ebs*, *hub 1-4*, *hub 2-2*, de los dobles mutantes *ebs hub1-4* y *ebs hub 2-2*, y del triple mutante *ebs hub1-4 hub 2-2*, cultivadas en A) condiciones de DL y B) de DC. Significación *** $p < 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col, del doble mutante respecto a los mutantes sencillos y del triple mutante respecto a los dobles mutante.

6.2 Implicación del complejo PAF1 en el control de la dormición.

Debido al fenotipo de reducción de la dormición observado en los mutantes *hub1* y *hub2*, y dado que el PAF1-C está relacionado con la monoubiquitinación de la histona H2B y con el reclutamiento de metiltransferasas de histonas, quisimos analizar el fenotipo de dormición mostrado por mutantes en los componentes *ELF7* y *ELF8* del PAF1-C. Como se muestra en la Figura 56, los componentes *ELF7* y *ELF8* del PAF1-C participan en el control de la dormición en *Arabidopsis*, ya que los mutantes *elf7* y *elf8* muestran una reducción significativa en la dormición de semillas respecto a Col. En el transcurso de nuestro trabajo, Liu et al., 2011 corroboraron estos resultados, y mostraron también una reducción de la dormición en mutantes afectados en el resto de subunidades del PAF1-C.

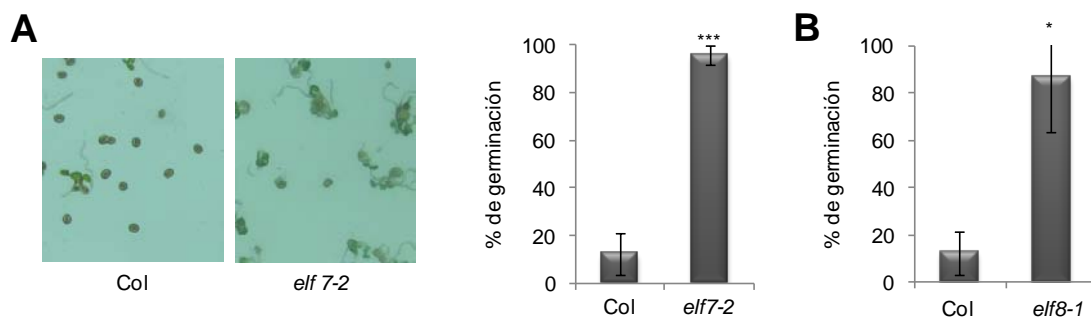


Figura 56. Los componentes del PAF1-C *ELF7* y *ELF8* son necesarios para la correcta regulación de la dormición. Dormición de semillas frescas de Col y de los mutantes *elf7-2* (A) y *elf8-1* (B), a los 5 DDI. Significación: ***= $p \leq 0,005$ y *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y 95%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes respecto a Col.

6.3 Relación funcional de *EBS* con genes implicados en la metilación de histonas en el proceso de dormición.

6.3.1 Análisis de la interacción genética de *EBS* con *ATXR7* en el control de la dormición.

Determinadas proteínas con actividad metiltransferasa de histonas catalizan la trimetilación de residuos H3K4, una modificación de la histona H3 que está asociada a la activación transcripcional de genes en eucariotas (Miller et al., 2001; Roguev et al., 2001; Avranova, 2009). En base a la similitud de metiltransferasas específicas de H3K4 descritas en levaduras, en *Arabidopsis* se ha propuesto la existencia de diversas proteínas tipo Trithorax como metiltransferasas específicas implicadas en la modulación de esta marca (Ng et al. 2007). Entre ellas, las proteínas *ATX1*, *ATX2*, *ATXR3* y *ATXR7*, están implicadas en la metilación de histonas y en la regulación de

la floración, activando la expresión de *FLC* (Álvarez-Venegas et al., 2003; Saleh et al., 2008; Tamada et al., 2009; Berr et al, 2009; Yun et al, 2012). Dada la implicación de EBS y de HUB1 y 2 en la regulación de la dormición y la floración, y su relación con H3K4me3, decidimos analizar si las metiltransferasas ATX1 y 2, y ATXR7 serían necesarias también para una correcta regulación de la dormición de semillas. Como se observa en la Figura 57, los mutantes *atx1-2*, *atx1-3*, y *atx2-1* no presentaron diferencias significativas respecto al tipo silvestre Col en cuanto a la dormición de semillas frescas. Sin embargo, los mutantes *atxr7-1* y *atxr7-2*, presentaron una reducción significativa de la dormición, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, comportándose ambos alelos de una manera similar respecto al nivel de dormición en las semillas (Figura 57). En el curso de este trabajo, el grupo del Dr. W. Soppe (Max Planck Institute for Developmental Biology, Colonia, Alemania) publicó unas observaciones que confirmaban estos resultados, al menos en condiciones de luz, ya que empleando una aproximación similar encontraron una reducción de la dormición de semillas frescas en el mutante *atxr7-1* (Liu et al., 2011).

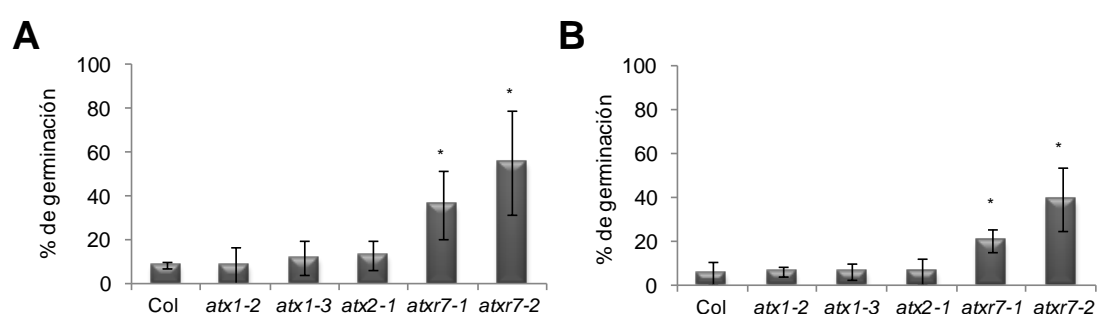


Figura 57. La metiltransferasa de histonas ATXR7 está implicada en el control de la dormición en *Arabidopsis*. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de los mutantes *atx1-2*, *atx1-3*, *atx2-1*, *atxr7-1* y *atxr7-2* en condiciones de luz (A), a los 5 DDI, y de oscuridad (B), a los 7 DDI.. Significación: *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 95%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes respecto a Col.

Con el fin de determinar si estos genes que codifican metiltransferasas pudieran tener funciones redundantes en el control de la dormición de la semilla, analizamos el comportamiento de los dobles mutantes *atx1-2 atxr7-1*. Como se observa en la Figura 58, este doble mutante presenta una reducción de la dormición significativamente mayor que la de *atx1-2*, pero similar a la de *atxr7-1*. Por tanto, *ATX1* no parece desempeñar un papel en la regulación de la dormición, y por lo tanto, no tiene funciones redundantes con *ATXR7* en el control de este proceso.

RESULTADOS

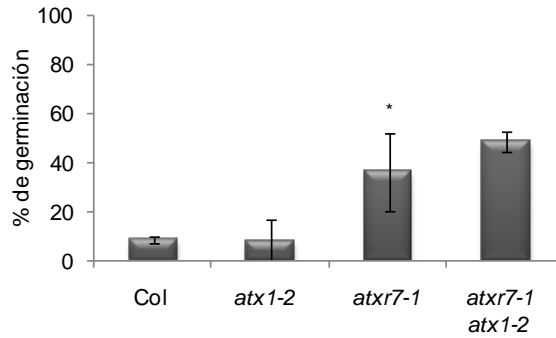


Figura 58. ATX1 no es funcionalmente redundante con ATXR7 en el control de la dormición en Arabidopsis. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col y de los mutantes *atx1-2*, *atxr7-1* y del doble mutante *atxr7-1 atx1-2*, a los 5 DDI. Significación: $*=p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 95%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Puesto que *ATXR7* está implicado en el control de la dormición de semillas de *Arabidopsis*, probablemente mediando cambios en la conformación de la cromatina de los genes diana, quisimos determinar si *ATXR7* interacciona genéticamente con *EBS* en la regulación de este proceso de desarrollo. Para ello generamos los dobles mutantes *ebs atxr7* y analizamos los niveles de dormición de sus semillas.

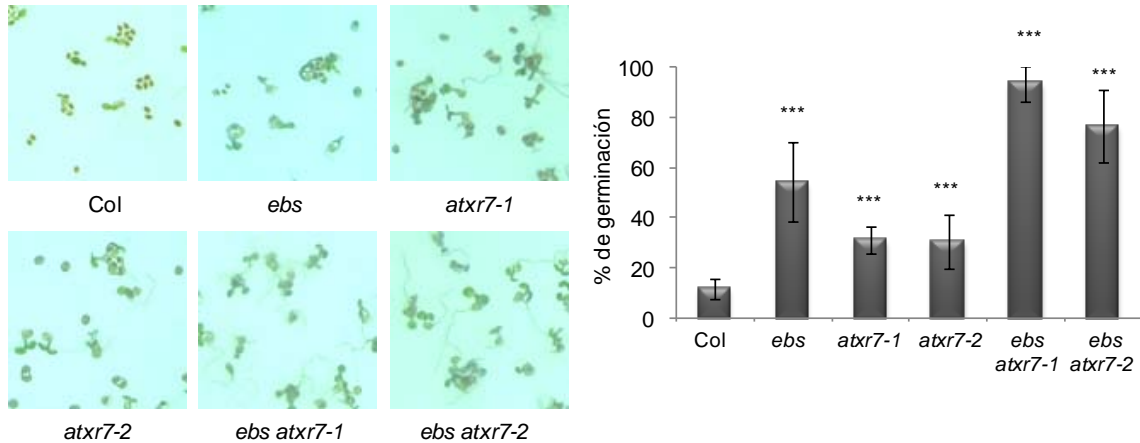


Figura 59. EBS y ATXR7 actúan en rutas genéticas independientes en el control de la dormición de semillas de Arabidopsis. Fenotipo y cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col y de mutantes *ebs*, *atxr7-1*, *atxr7-2*, *ebs atxr7-1* y *ebs atxr7-2* a los 5 DDI. Significación: $***=p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Como se muestra en la Figura 59, los mutantes *ebs atxr7-1* y *ebs atxr7-2* presentan un fenotipo aditivo, con mayor reducción de la dormición (porcentajes de germinación por encima del 80%) que los dos mutantes sencillos. Por tanto, *ATXR7* y

EBS controlan la dormición de semillas de *Arabidopsis*, actuando en rutas genéticas independientes.

Además, decidimos estudiar en los mutantes *atxr7-2* y *ebs atxr7-2* la expresión de diversos genes que habíamos identificado previamente por estar expresados diferencialmente en el mutante *ebs*, y determinar así si los loci *EBS* y *ATXR7*, comparten la regulación de genes que podrían mediar su efecto sobre la dormición de la semilla.

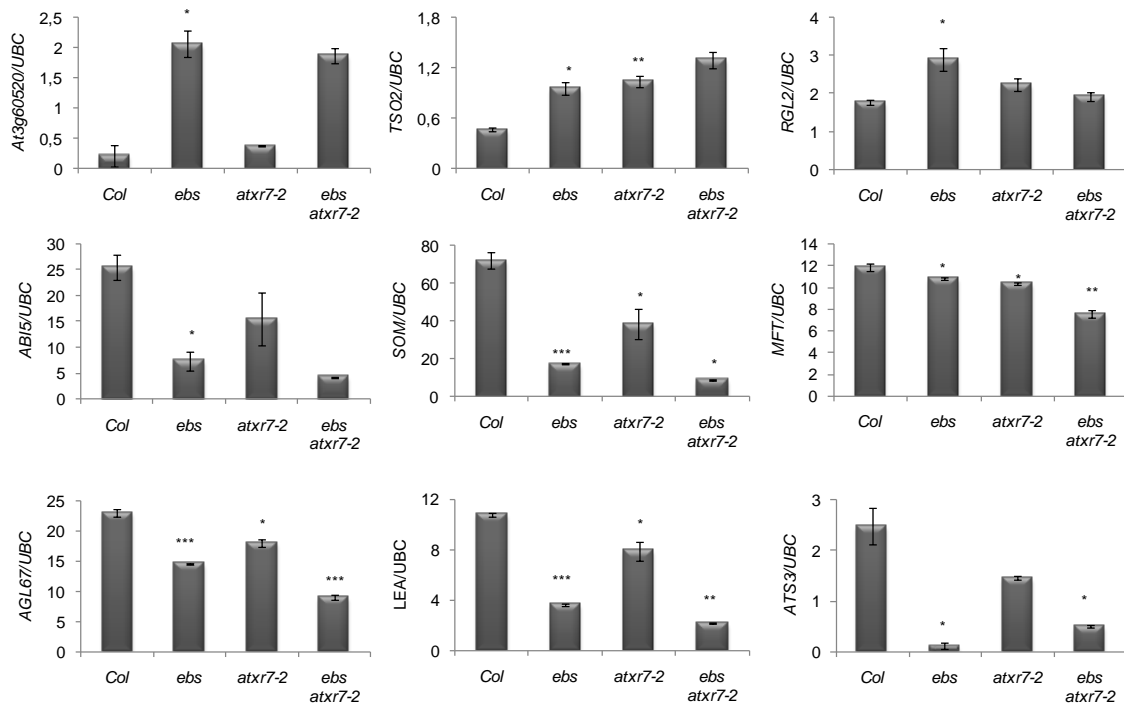


Figura 60. Expresión en semillas de *atxr7-2* y *ebs atxr7-2* de diversos genes expresados diferencialmente en el mutante *ebs*. Expresión por qRT-PCR de los genes *At3g60520*, *TSO2*, *RGL2*, *ABI5*, *SOM*, *MFT*, *AGL67*, *LEA* (*At4g36600*) y *ATS3* en semillas frescas de *Col*, *ebs*, *atxr7-2* y *ebs atxr7-2* embebidas durante 1 día. Los valores de expresión se han relativizado con respecto a los de *UBC21*. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a *Col* y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Como se observa en la Figura 60, la expresión de *At3g60520* y *RGL2* en el mutante *ebs* es elevada respecto a la que observamos en el tipo silvestre *Col*. Sin embargo, los mutantes *atxr7* presentan una expresión de ambos genes similar a la de semillas de *Col*, lo que sugiere que *EBS* pero no *ATXR7*, regularía la expresión de *At3g60520* y *RGL2*.

En cuanto al nivel de expresión de *AGL67*, *MFT*, *ATS3*, *LEA*, *ABI5*, *SOM* y *TSO2*, nuestros resultados indican que *ATXR7* y *EBS* actuarían de forma aditiva sobre la regulación de la expresión de estos genes durante el periodo de dormición. Como

RESULTADOS

se observa en la Figura 60, el mutante *atxr7-2* muestra cambios similares a *ebs* en la expresión de los genes *AGL67*, *MFT*, *ATS3*, *LEA*, *ABI5*, *SOM* y *TSO2*, mientras que cuando se combinan ambas mutaciones, su efecto en la expresión se potencia en la mayor parte de los casos, al igual que ocurría con el fenotipo de dormición de los dobles mutantes *ebs atxr7-2*.

6.3.2 Análisis de la interacción genética de *EBS* con *ATXR7* en el control de la floración.

Previamente se ha descrito que *ATXR7* participa en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis* a través de la remodelación de la cromatina del gen *FLC* (Tamada et al., 2009). Aunque los resultados que hemos obtenido indican que *EBS* y *ATXR7* actúan en rutas independientes de regulación de la dormición, podrían interactuar genéticamente en el control del tiempo de floración. Como se muestra en la Figura 61, los dobles mutantes *ebs atxr7* tienen un fenotipo de floración aún más temprano que los dos parentales, tanto en condiciones de DL como de DC. Este fenotipo aditivo de aceleración de la floración en el doble mutante *ebs atxr7* sugiere que ambos genes no interactúan genéticamente, y por tanto actuarían en rutas genéticas independientes también en el control del tiempo de floración.

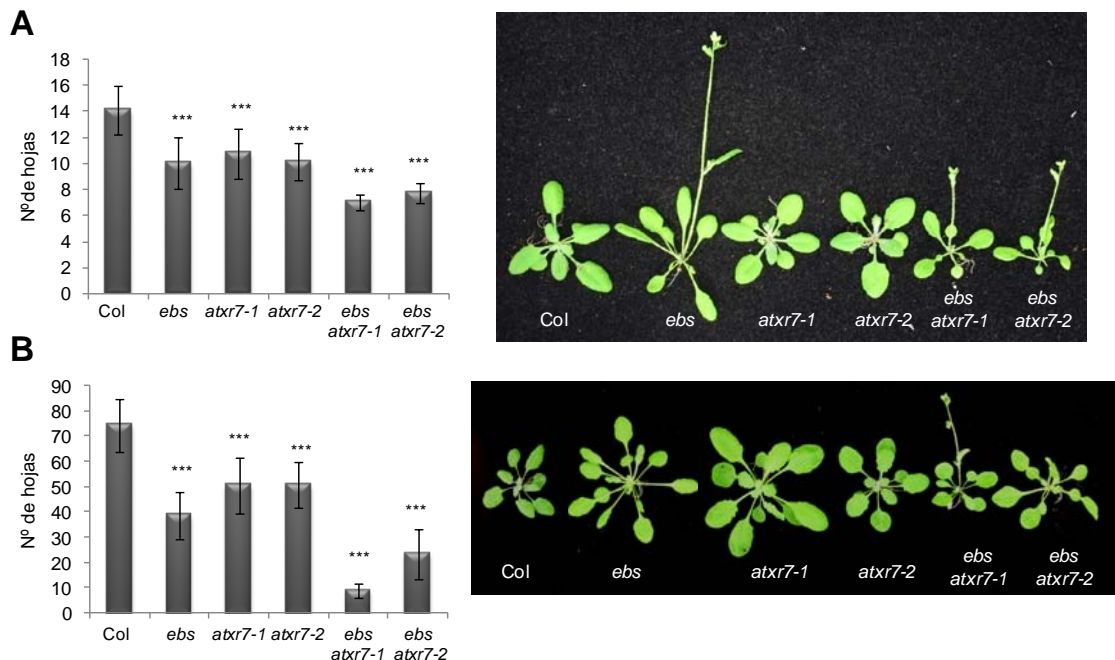


Figura 61. *EBS* y *ATXR7* actúan a través de rutas independientes en el control del tiempo de floración. Cuantificación y fenotipo de floración de Col y de mutantes *ebs*, *atxr7-1*, *atxr7-2*, *ebs atxr7-1* y *ebs atxr7-2* en condiciones de DL (A) y de DC (B). Significación ***= $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%, de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

Por lo tanto, *EBS* y *ATXR7* codifican proteínas implicadas en procesos de remodelación de la cromatina de genes que regulan los mismos procesos del desarrollo, pero actúan a través de rutas genéticas independientes, tanto en el control de la dormición como en el control de la floración en *Arabidopsis*.

6.3.3 Participación de la metiltransferasa de histonas *SDG8* en la regulación de la dormición de semillas.

SDG8/EFS, es un homólogo de la metiltransferasa de histonas *SET2* en levaduras (Xu et al., 2008). Esta metiltransferasa promueve la di y trimetilación de la histona H3K36 en sus genes diana, marca de genes transcripcionalmente activos (Zhao et al, 2005; Xu et al, 2008). Se ha descrito que *SDG8* y *EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2)*, un componente del *PRC2*, interaccionan de manera sinérgica para la represión de genes de maduración de la semilla, para el mantenimiento de la identidad de la célula, y para promover el correcto desarrollo de la plántula (Tang et al, 2012). Además se ha demostrado que las proteínas *SET2* interaccionan funcionalmente con el *PAF1-C*, que como hemos comentado, está implicado en la regulación de la dormición de la semilla (Liu et al., 2011). Por todo ello, nos propusimos estudiar si *SDG8* desempeña también un papel en la regulación de la dormición de semillas frescas. Como se observa en la Figura 62, el mutante *sdg8* muestra una considerable reducción de la dormición de semillas frescas, respecto a las semillas de tipo silvestre *Col*, confirmando que la deposición de las marcas de la cromatina de la que es responsable *SDG8*, es necesaria para un control adecuado del proceso de dormición. Durante el curso de este trabajo se describieron una serie de alteraciones fenotípicas que afectan a la dormición de las semillas del mutante *efs-1* y que son consistentes con nuestras observaciones (Bassel et al., 2011).

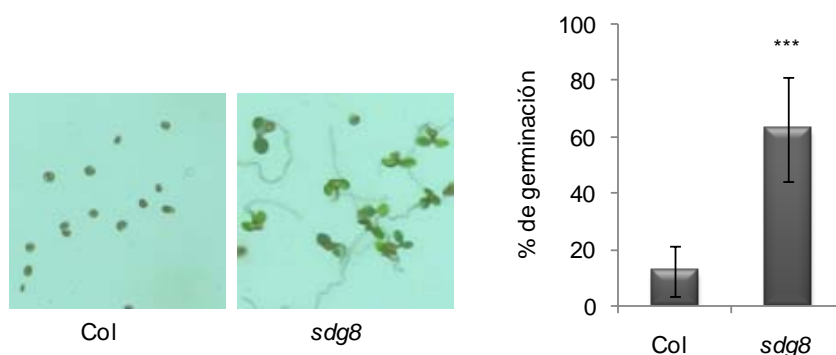


Figura 62. *SDG8/EFS* participa en la regulación de la dormición de la semilla. Imagen y cuantificación de semillas frescas de *Col* y del mutante *sdg8* a los 5 días después de imbibición. Significación ***= $p \leq 0.001$

RESULTADOS

0,005, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia del mutante respecto a Col.

Además, nos propusimos analizar en el mutante *sdg8* los niveles de expresión de diferentes genes que son expresados diferencialmente en el mutante *ebs*, como *FLC*, *AGL67*, *SOM*, *ABI5*, *MFT* y *RGL2*, con el fin de poder concluir si *EBS* y *SDG8* estarían implicados en regular la expresión de un grupo común de genes que participan en el control de la dormición/germinación de semillas.

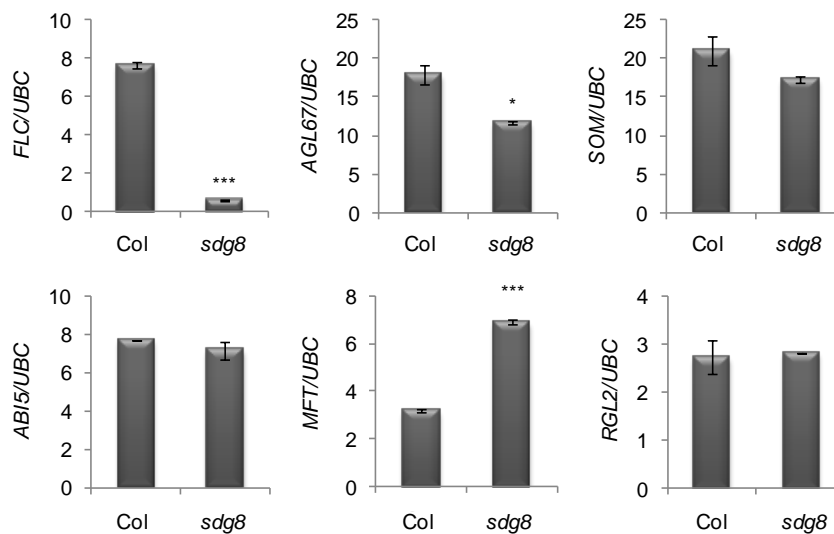


Figura 63. Expresión en el mutante *sdg8* de genes expresados diferencialmente en *ebs*. Expresión de *FLC*, *AGL67*, *SOM*, *ABI5*, *MFT* y *RGL2* en semillas frescas de Col y del mutante *sdg8*, embebidas durante 1 día. Significación **= $p \leq 0,05$, ***= $p \leq 0,005$, que establecen un nivel de confianza del 95% y 99,5%, respectivamente. La significación se refiere a la diferencia del mutante respecto a Col.

Como se observa en la Figura 63, los niveles de expresión de *FLC* en el mutante *sdg8* son muy bajos, como cabría esperar, ya que se ha descrito que *SDG8* es necesario para la activación de este gen central en el control de la floración (Xu et al., 2008). Estos resultados confirman que *SDG8* también participa en el control de la expresión de *FLC* en semillas frescas, aunque de manera opuesta a *EBS*, que reprimiría la expresión de este gen, tal y como se observa en la Figura 37.

Además, hemos comprobado que los niveles de expresión de *AGL67*, están significativamente reducidos en el mutante *sdg8* con respecto a Col, al igual que ocurría en el mutante *ebs*. Esta disminución de la expresión de *AGL67* es consistente con el menor nivel de dormición de las semillas observada en el mutante *sdg8*. Sin embargo, la expresión de *MFT* en el mutante *sdg8* se encuentra desreprimida, al contrario de lo que observamos en el mutante *ebs* (Figura 63). Por otra parte, la

expresión de *SOM*, *ABI5* y *RGL2* no presenta diferencias significativas entre semillas del mutante *sdg8* y de Col, por lo que en nuestras condiciones, *SDG8* no parece modular la expresión de estos genes. Por tanto, *SDG8* es necesario para la correcta regulación de la expresión de *FLC*, *AGL67* y *MFT* en el proceso de dormición, aunque su efecto en la expresión de estos genes es opuesto al de *EBS* en el caso de *FLC* y *MFT*, lo que sugiere que ambos remodeladores de cromatina actuarían de forma diferente sobre la regulación de la expresión de estos loci.

Como en el caso de los factores remodeladores de cromatina mencionados anteriormente, quisimos explorar si *SDG8* presentaba alguna relación funcional con *EBS* en el control de la dormición, para lo que generamos el doble mutante *ebs sdg8*.

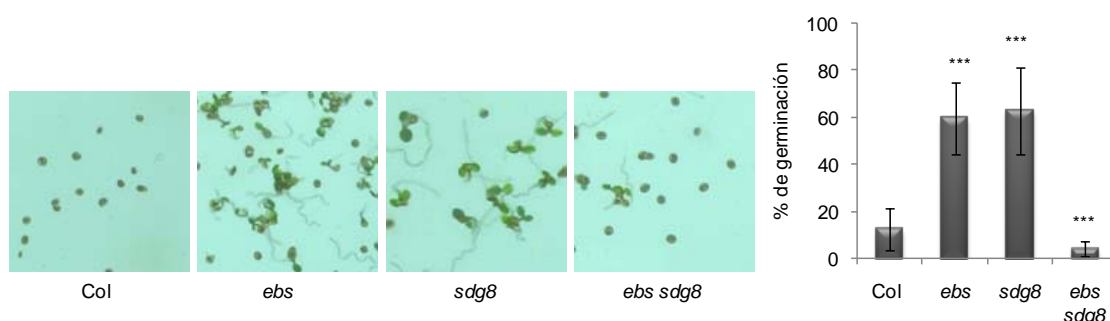


Figura 64. Fenotipo de dormición del doble mutante *ebs sdg8*. Fenotipo y cuantificación de la germinación de semillas frescas de Col y de los mutantes *ebs*, *sdg8* y *ebs sdg8*, medida a los 5 DDI. Significación: ***= $p \leq 0,005$, que establece un nivel de confianza del 99,5%. La significación se refiere a la diferencia de los mutantes sencillos respecto a Col y del doble mutante respecto a los mutantes sencillos.

De acuerdo con nuestros resultados previos, las semillas frescas de mutantes *ebs* y *sdg8* muestran reducciones significativas de dormición (Figura 64). Sin embargo, el doble mutante *ebs sdg8*, muestra niveles de germinación de semillas frescas muy similares a los de las semillas del tipo silvestre Col, de manera que la reducción de la dormición observada para ambos mutantes por separado se suprime totalmente en el doble mutante, lo que podría sugerir la existencia de algún tipo de interacción genética entre ambos loci en el control de la dormición. Al igual que en el resto de los experimentos de dormición descritos a lo largo de este trabajo, comprobamos que la viabilidad de las semillas del doble mutante *ebs sdg8* era mayor del 80%, concretamente en este caso era próxima al 100%, lo que confirma que la ausencia de germinación observada en las semillas de este doble mutante no se debe a letalidad causada por la combinación de ambas mutaciones. Dado que *AGL67* es un regulador central en el control de la dormición en *Arabidopsis*, y que su expresión se encuentra

RESULTADOS

reducida en *ebs* y en *sdg8*, quisimos analizar la expresión de *AGL67* en el doble mutante *ebs sdg8*.

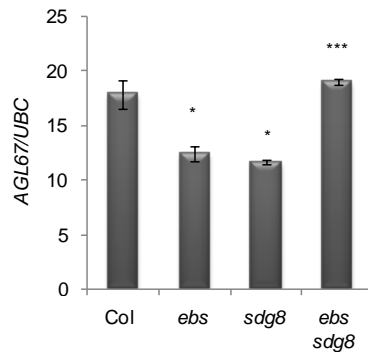


Figura 65. Expresión de *AGL67* en el doble mutante *ebs sdg8*. Expresión de *AGL67* en semillas frescas de Col y de los mutantes *ebs*, *sdg8* y *ebs sdg8*, embebidas durante 1 día. Se muestran datos de qRT-PCR en los que los valores de expresión se han relativizado con los de *UBC*. Significación: ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y 95%, respectivamente. El doble mutante es significativamente diferente a sus parentales pero igual a Col.

Los resultados obtenidos confirman que las semillas de los mutantes *ebs* y *sdg8* muestran un nivel de expresión de *AGL67* inferior al detectado en las semillas de Col. En cambio, el doble mutante *ebs sdg8* presenta niveles de expresión de *AGL67* significativamente diferentes a los mutantes sencillos, pero similares a los de semillas de Col. Estos datos indican que la pérdida de función de ambos remodeladores de cromatina restaura los niveles de expresión de *AGL67*, y por tanto, un nivel de dormición de la semilla similar al del tipo silvestre. Experimentos adicionales serán necesarios para determinar la base molecular de la interacción entre ambos loci implicados en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*, aunque estas observaciones son consistentes con que *AGL67* tenga un papel central en mediar los defectos en dormición observados en los mutantes *ebs* y *sdg8*.

6.4. Análisis del posible papel de otros complejos remodeladores de cromatina en la regulación de la dormición.

6.4.1 Análisis del papel de SWR1-C en la regulación de la dormición de semillas.

Nuestros resultados confirman el papel central que tienen los procesos de remodelación de cromatina en la regulación de la dormición de la semilla, ya que los diversos remodeladores analizados en este trabajo resultaron estar implicados en el control de este proceso. Para ampliar este análisis, decidimos estudiar el posible papel de otros complejos implicados en la reorganización de la cromatina y el control

transcripcional de la expresión génica. Por ese motivo, analizamos el comportamiento de dormición de semillas procedentes de mutantes del SWR1-C, como *photoperiod independent early flowering 1 (pie1)*, *early in short days 1 (esd1)*/*actin-related protein 6 (arp6)*/*supressor of frigida 3 (suf3)* y *swc6*/*serrated leaves and early flowering (sef)* (Noh y Amasino, 2003; Martin-Trillo et al., 2006; Lázaro et al., 2008).

Este complejo remodelador de cromatina cataliza el intercambio de la histona H2A por la variante histónica H2A.Z, y se ha demostrado que tiene un papel esencial en la regulación del tiempo de floración y en otros procesos de desarrollo en *Arabidopsis* (Choi et al., 2007; March-Díaz y Reyes, 2009).

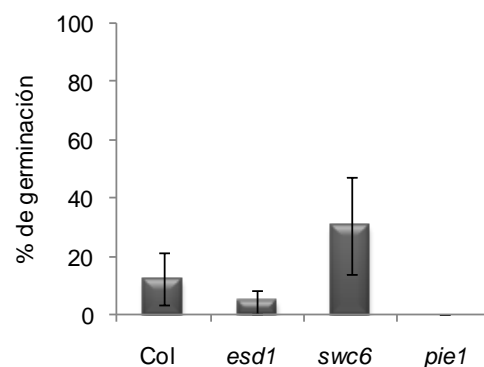


Figura 66. Fenotipo de dormición de mutantes en componentes del SWR1-C. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col, y de los mutantes *esd1/arp6/suf3*, *pie1* y *swc6/sef*, a los 5 DDI.

Como se muestra en la Figura 66, ninguno de los mutantes del SWR1-C estudiados muestra alteraciones significativas de la dormición, lo que sugiere que al menos en las condiciones ensayadas, SWR1-C no es necesario para la regulación de la dormición de semillas frescas. Estas observaciones nos permiten concluir que si bien determinados complejos remodeladores de la cromatina tienen un papel esencial para la correcta regulación de la dormición, no existe este requerimiento para otras actividades encargadas de reorganizar la cromatina.

6.4.2 Análisis del posible papel en dormición de ELF6 Y JMJ4, otros remodeladores de la cromatina relacionados con EBS.

Resultados previos de nuestro laboratorio ha establecido que EBS reconoce las marcas H3K4me3/2 de la cromatina (López-González, 2010. Tesis doctoral). Además se ha demostrado que las proteínas ELF6 y JMJ4 se unen a la región de inicio de la transcripción del locus *FT*, y actúan eliminando la metilación del residuo H3K4, para mantener la cromatina en un estado transcripcionalmente inactivo, y evitar que ocurra

RESULTADOS

la floración de forma precoz (Jeong et al., 2009). Puesto que EBS regula el proceso de dormición de la semilla, y que ELF6 y JMJ4 actúan sobre la misma marca de cromatina que reconoce EBS, podría ocurrir que estas proteínas que modifican esta marca implicada en el control de la transcripción, también fuesen necesarias para modular la dormición de la semilla, por lo que nos propusimos estudiar el fenotipo de dormición de los mutantes *elf6* y *jmj4*.

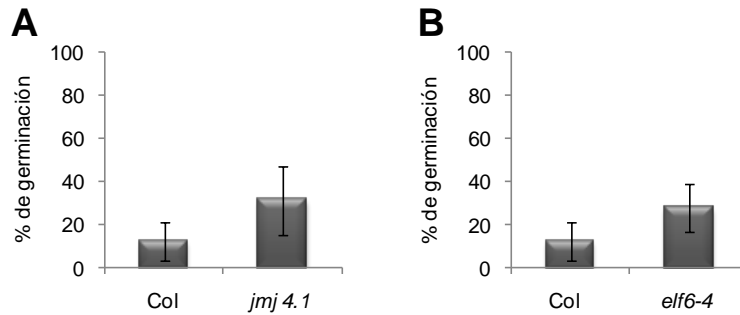


Figura 67. Fenotipo de dormición de los mutantes *jmj4* y *elf6*. Cuantificación de la germinación de semillas frescas de Col y del mutante *elf6-4*, a los 5 DDI.

Como se puede observar en la Figura 67, la dormición de semillas frescas de los mutantes *jmj4* y *elf6* no está alterada significativamente, siendo similar a la observada en semillas del tipo silvestre, lo que sugiere que este proceso tiene lugar independientemente de la actividad de estas demetilinas de histonas, al menos en las condiciones ensayadas. Todas estas observaciones nos permiten concluir que la remodelación de cromatina tiene un papel central en la regulación de la dormición, aunque determinados mecanismos tienen un impacto más notable sobre el control de este proceso.

7. Identificación de otros reguladores transcripcionales que podrían participar en la regulación de la dormición.

Además de los reguladores analizados hasta ahora, y que hemos descrito en los apartados anteriores de esta memoria, en el curso de este trabajo nos hemos interesado también en la identificación de factores de transcripción (FT) que pudieran estar implicados en controlar la germinación de semillas de *Arabidopsis* durante el periodo de dormición. Esta parte del trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto Consolider-TRANSPLANTA, donde se ha generado una colección de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan de forma inducible alrededor de 1000 factores transcripcionales. Esta colección es una herramienta potente para identificar factores de transcripción implicados en diversos aspectos del desarrollo y la biología

de *Arabidopsis* (Coego et al., 2014). En particular, nuestro grupo se centró en la búsqueda de factores transcripcionales que regularan la dormición de semillas.

En el genoma de las plantas aproximadamente el 7% de las secuencias codificantes corresponde a FTs (Udvardi et al., 2007). Los FTs son los principales reguladores de la actividad genética en todos los organismos. En eucariotas, a menudo forman parte de familias de genes en las que los distintos miembros pueden presentar redundancia funcional (Riechmann et al., 2000), siendo difícil en ocasiones inferir el papel que desempeñan. Para hacer frente a esta limitación, la sobreexpresión de genes que codifican FTs es una estrategia útil para revelar la función biológica de estos factores. Sin embargo, la sobreexpresión constitutiva de FTs a menudo resulta en letalidad o fenotipos extremos que dificultan su caracterización funcional (Kasuga et al., 1999). Como una herramienta básica en el Proyecto Transplanta se generó una colección de líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan individualmente FTs bajo el control de un promotor inducible. El uso de un sistema de sobreexpresión condicional de FTs permite evitar los potenciales efectos deletéreos que la sobreexpresión constitutiva de FTs puede causar en el desarrollo y la fisiología de las plantas transformadas. Para ello, se partió de una colección de cDNAs de FTs en el vector pER8GW (Zuo et al., 2000), que contiene un casete con la construcción XVE, similar al presente en el vector pMDC7 previamente descrito en el apartado 1.3.2, y donde los FTs están bajo el control de un sistema inducible por β -estradiol. Algunas de las familias de FTs más importantes como AP2/EREBP, ABI3/VP1, Alfin-like, BZR, C2C2 CO-like, DOF, YABBY, CCAAT, E2F-DP, G2-like, GRAS, HSF, MADS, MYB, NAC, RAV, TCP, WRKY y bZIP están representadas con más del 50% de sus miembros en la colección Transplanta. Se produjeron alrededor de 2400 líneas transgénicas homocigotas independientes portadoras de la construcción pER8::FTs, que representan a unos 1000 FTs de *Arabidopsis*.

7.1 Diseño y optimización del procedimiento de identificación de reguladores transcripcionales implicados en el control de la dormición de semillas.

Para identificar FT potencialmente implicados en el control de la dormición, las líneas transgénicas portadoras de la construcción inducible por β -estradiol se cultivaron en cámaras de cultivo en condiciones de DL, y se recolectaron las semillas frescas al final de la maduración. Estas semillas frescas se sembraron en placas en presencia o ausencia del agente inductor, y en cuatro condiciones experimentales de luz y temperatura diferentes. Tres de ellas (1, 2 y 3) nos sirvieron para seleccionar

RESULTADOS

genes candidatos a participar en la modulación de la dormición, y la cuarta para confirmar la viabilidad de las semillas. Las condiciones ambientales empleadas fueron:

1. Luz blanca y temperatura de 22°C.
2. Oscuridad y temperatura de 22°C.
3. Luz blanca y temperatura de 16°C.
4. Oscuridad y temperatura de 4°C durante 3 días, y transferencia posterior a condiciones idénticas a las descritas en 1.

En el caso de cultivo en luz blanca y en oscuridad (condiciones 1 y 2) a 22°C, seleccionamos líneas que mostraran una reducción de la dormición respecto a semillas de tipo silvestre Col a los 5 DDI (luz) y a los 7 DDI (oscuridad). En el caso de la selección en condiciones de LB a 16°C (3), seleccionamos líneas en las que aumentase la dormición respecto a semillas de Col a los 15 días, ya que en estas condiciones las semillas de Col germinan totalmente. Finalmente, la incubación de semillas en condiciones de 4°C y oscuridad, y posterior transferencia a luz blanca, nos permitió corroborar que las semillas empleadas en el cribado de la colección eran viables. En la Figura 68 se muestra un esquema del proceso de selección.

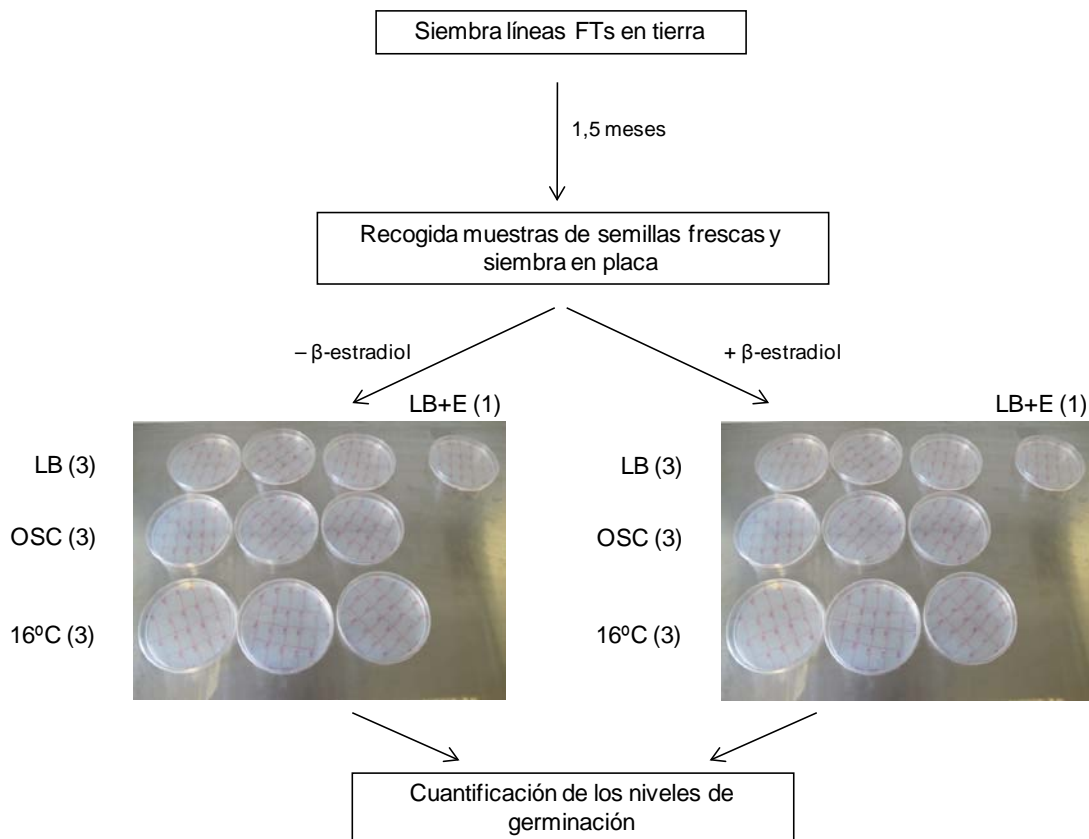


Figura 68. Diseño experimental para la identificación de FTs implicados en el proceso de dormición dentro de la colección TRANSPLANTA. LB: condiciones de crecimiento de luz blanca y

22°C; OSC: condiciones de crecimiento de oscuridad y 22°C; 16°C: condiciones de crecimiento de luz blanca y 16°C; LB+E: estratificación durante 3 días a 4°C y posterior crecimiento en condiciones de luz blanca y 22°C. Entre paréntesis se indica el número de placas en cada condición.

Con anterioridad al inicio del rastreo de la colección TRANSPLANTA realizamos diversos experimentos que nos permitieran establecer las condiciones óptimas para los ensayos. La concentración óptima de β -estradiol para inducir la expresión de FTs en semillas frescas se determinó mediante experimentos con semillas frescas de una línea *pER8GW::GUS*, en la que el gen reportador *GUS* se expresa bajo el control de un promotor que responde al factor de transcripción quimérico XVE cuya actividad depende de la presencia de β -estradiol (véase sección 1.3.2). Las semillas de esta línea se tiñeron con sustrato para actividad GUS tras la imbibición en presencia de diferentes concentraciones de la hormona y en condiciones de LB.

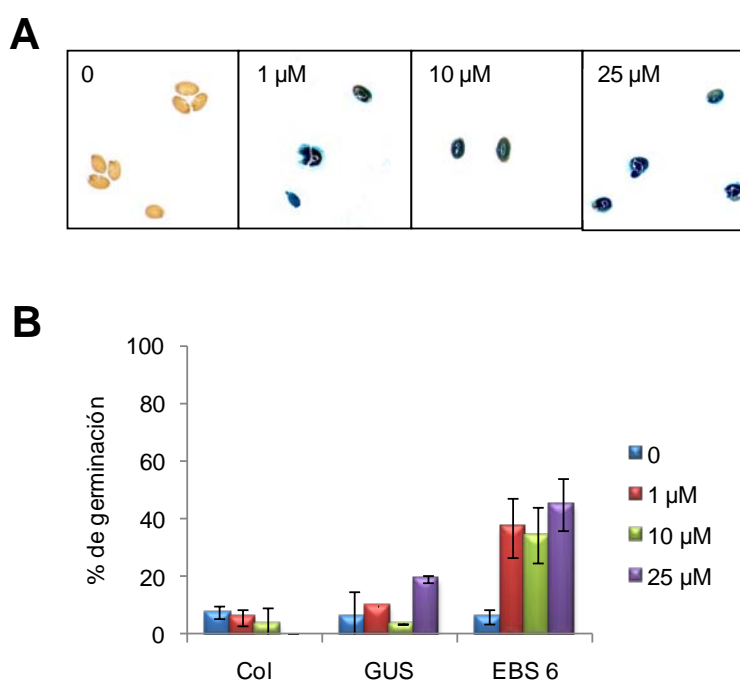


Figura 69. Determinación de la concentración óptima de uso de β -estradiol para el cribado de líneas de la colección TRANSPLANTA. A. Tinción GUS de semillas de líneas *pER8GW::GUS* embebidas durante 1 día en placas con papel humedecido con una solución conteniendo la hormona, a diferentes concentraciones de β -estradiol (0, 1, 10 y 25 μ M). B. Germinación de semillas frescas de tipo silvestre Col, de líneas transgénicas con la construcción *pER8::GUS* y de líneas de sobreexpresión de *EBS* inducible por β -estradiol, a los 5 DDI. Las semillas se cultivaron en condiciones de LB a 22°C.

RESULTADOS

Como se observa en la Figura 69A, la actividad β -glucuronidasa se induce en las semillas en cualquiera de las concentraciones de β -estradiol utilizadas, pero no en su ausencia. Esta observación demuestra que e β -estradiol es capaz de atravesar la cubierta de la semilla e inducir la expresión del gen reportador *GUS* tras un periodo de imbibición de 1 día en presencia del agente inductor. Además, los resultados mostrados en la Figura 69B muestran que el tratamiento con β -estradiol no altera el nivel de dormición de las semillas, ya que tanto las semillas frescas de Col como las provenientes de plantas transgénicas portadoras del vector pER8GW::*GUS* no presentan cambios significativos en su germinación con las diferentes concentraciones de la hormona esteroide empleadas. Sin embargo, las semillas frescas de la línea XVE::*EBS* 6, generada anteriormente en el laboratorio y utilizada aquí como control positivo de la inducción con β -estradiol, responden al tratamiento con la hormona, induciendo la germinación prematura de semillas durmientes, tal y como habíamos demostrado anteriormente (Figura 23). Estos ensayos previos nos permitieron establecer una concentración de uso de 10 μ M de β -estradiol para llevar a cabo los rastreos de dormición planteados con las líneas de la colección TRANSPLANTA.

Todos estos resultados nos permiten concluir que el sistema de sobreexpresión con XVE es funcional en semillas frescas de *Arabidopsis* y es dependiente de β -estradiol, y por tanto, podría ser una herramienta de utilidad en la búsqueda de FTs que estén implicados potencialmente en la regulación de la dormición.

7.2. Identificación de líneas de la colección TRANSPLANTA con respuesta alterada durante la dormición de la semilla.

Una vez establecidas las condiciones experimentales idóneas para la búsqueda de líneas de la colección de FTs que presenten alteraciones de la dormición dependientes de la inducción por β -estradiol, procedimos a evaluar las líneas disponibles en el consorcio. Hasta el momento hemos analizado 839 líneas que correspondían a 327 factores de transcripción diferentes, cada una de ellas en las distintas condiciones de cultivo establecidas para la selección. En un primer cribado, identificamos 145 líneas correspondientes a diferentes FTs que mostraron una alteración de la dormición. Estos ensayos se volvieron a repetir con estas posibles líneas positivas, y se confirmaron los resultados de dormición alterada en 42 de los casos. Estas 42 líneas que mostraron alteraciones en la dormición en presencia de β -estradiol corresponden a un total de 26 factores de transcripción. Entre ellas encontramos 25 líneas correspondientes a 16 FTs que mostraron una reducción de la

dormición en la condición 1 (LB, 22°C), 21 líneas correspondientes a 12 FTs en la condición 2 (OSC, 22°C), y 10 líneas correspondientes a 6 FTs en la condición 3 (LB, 16°C). Cabe resaltar que entre las líneas seleccionadas por su menor dormición en las condiciones experimentales 1 y 2, 14 líneas correspondientes a 8 FTs fueron comunes.

Como se observa en la Tabla 8, para varios de los FT analizados se han identificado más de una línea con dormición alterada de manera independiente. La disponibilidad de varias líneas XVE::FT independientes proporciona robustez al cribado, motivo por el cual la colección TRANSPLANTA se diseñó para disponer de más de una línea portadora de cada uno de los FT (al menos 2 y un máximo de 3). La identificación de un mismo FT en varias líneas independientes reduce las posibilidades de seleccionar falsos positivos, por lo que aquellos FT aislados repetidamente en todas las líneas disponibles para ese FT son buenos candidatos para representar reguladores transcripcionales implicados en el control de la dormición.

La Tabla 8 muestra los FTs identificados en base a los defectos en dormición observados en las líneas correspondientes en respuesta a la sobreexpresión inducida por β -estradiol. Estas proteínas pertenecen a diferentes familias de FTs, y algunos de ellos ya habían sido relacionados previamente con algún aspecto relacionado con la dormición de semillas, como es el caso de TTG1 y LEC2 (Debeaujon et al., 2000; Western et al., 2001; Finkelstein et al., 2008). La Tabla 8 muestra también las condiciones de selección en las que se identificaron los distintos FTs y cuáles de ellos fueron aislados en condiciones de luz (1), oscuridad (2) y a 16°C (3).

Serán necesarios experimentos adicionales para confirmar la implicación de estos FTs en el control de la dormición de semillas. En el transcurso de este trabajo ha sido imposible abordar sistemáticamente el estudio de todos los FTs identificados en nuestros rastreos, pero sí que hemos podido iniciar la caracterización funcional preliminar de algunos de ellos en relación con la regulación de la dormición. A continuación se muestran los resultados obtenidos con el análisis funcional inicial realizado con dos de los FTs seleccionados.

RESULTADOS

	Gen	Nombre	Condición de cultivo
1	At5g55690	AGL47	1
2	At4g17500	ERF1	1
3	At3g07650	COL9	1
4	At3g07650	COL9	1 y 2
5	At1g66350	RGL1	1 y 2
6	At1g66350	RGL1	1 y 2
7	At1g66350	RGL1	1 y 2
8	At3g10760	MYB DOMAIN	1 y 2
9	At3g10760	MYB DOMAIN	1 y 2
10	At1g68520	BBX14	1
11	At1g68520	BBX14	1
12	At3g13540	MYB5	1
13	At3g13540	MYB5	1
14	At1g75510	Transcription initiation factor IIF, beta subunit	1
15	At3g21270	DOF2	1
16	At1g09530	PIF3	1
17	At5g49520	WRKY48	1 y 2
18	At5g49520	WRKY48	1 y 2
19	At5g49520	WRKY48	1 y 2
20	At5g24520	TTG1	1 y 2
21	At1g49720	ABF1	1 y 2
22	At1g49720	ABF1	1 y 2
23	At1g05805	bHLH	1 y 2
24	At1g28300	LEC2	1
25	At1g01260	bHLH	2
26	At4g01250	WRKY22	2
27	At3g30530	BZIP42	2
28	At2g30250	WRKY25	2
29	At2g30250	WRKY25	2
30	At2g40950	BZIP17	2
31	At2g40950	BZIP17	2
32	At2g40950	BZIP17	1 y 2
33	At5g45150	RTL3	3
34	At3g46600	SCL30	3
35	At3g46600	SCL30	3
36	At3g46600	SCL30	3
37	At1g35560	TCP23	3
38	At1g35560	TCP23	3
39	At1g35560	TCP23	3
40	At1g67260	TCP1	3
41	At4g18770	MYB98	3
42	At5g10380	RING1	3

Tabla 8. Líneas portadoras de FT cuya sobreexpresión inducida por β -estradiol origina una alteración en la respuesta de dormición de las semillas. Se indican las condiciones de cultivos en la que se identificaron las líneas anteriores: 1: Luz blanca y temperatura 22°C, 2: Oscuridad y temperatura 22°C, 3: Luz blanca y 16°C.

7.3 Aproximación a la caracterización funcional de COL9, cuya sobreexpresión inducible provoca una reducción de la dormición.

Uno de los factores seleccionados para abordar su estudio funcional en la modulación de la dormición de semillas fue *CONSTANS-LIKE 9 (COL9)*, perteneciente

a la familia de proteínas de Arabidopsis que presentan alto nivel de homología con CONSTANS (CO) y de la que forman parte 16 miembros (Cheng y Wang, 2005). En la colección de líneas transgénicas generadas en el proyecto TRANSPLANTA, existían dos líneas de sobreexpresión inducibles para este gen, a las que denominamos COL9-1 y COL9-2. Ambas líneas de sobreexpresión presentaron una reducción en la dormición de sus semillas frescas al incubarlas con β -estradiol, en condiciones de luz y de oscuridad, como se muestra en la Tabla 8. En la Figura 70 se muestra la cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col, de las líneas control XVE-EBS 6 inducibles por β -estradiol (C.I.), y de las líneas COL9-1 y COL9-2. En condiciones de LB, las semillas de todas las líneas presentaron un comportamiento similar en ausencia de β -estradiol (-E), con unos niveles de germinación muy bajos y similares a los de las semillas del tipo silvestre Col. Al exponer las semillas de estas líneas a 10 μ M de β -estradiol (+E), el porcentaje de germinación de las semillas frescas de COL9-1, COL9-2 y de las líneas C.I. aumenta significativamente, pero no el de semillas Col. Estos datos confirman que la inducción por β -estradiol de COL9 es capaz de reducir de manera drástica la dormición de las semillas frescas, aliviando la represión de la germinación de las semillas durante el periodo de dormición. En condiciones de oscuridad (B), los resultados obtenidos son cualitativamente similares, aunque los niveles de germinación alcanzados por las líneas inducibles del FT COL9 son considerablemente menores que los obtenidos en presencia de luz, al igual que las del control positivo (XVE-EBS 6).

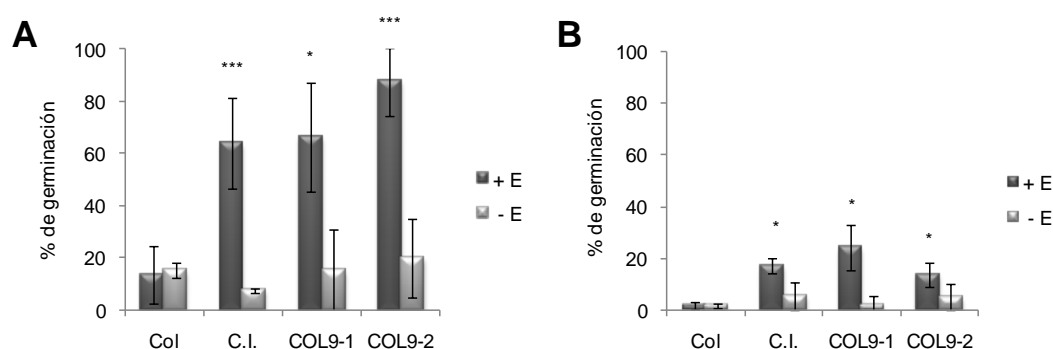


Figura 70. Fenotipo de dormición de semillas de líneas COL9 inducibles por β -estradiol. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col, de las líneas control EBS inducibles (C.I.) por β -estradiol, y de las líneas COL9-1 y COL9-2, en condiciones de LB a los 5 DDI (A) y de oscuridad, a los 7 DDI (B). Las barras identificadas con +E son las inducidas con β -estradiol, y las -E las que se incubaron sin β -estradiol. Significación ***= $p \leq 0,005$, *= $p \leq 0,05$, que establece un nivel de confianza del 99,5% y 95%, respectivamente.

Con el fin de caracterizar a nivel molecular las líneas de COL9 aisladas, comprobamos los niveles de inducción de este gen en dichas líneas, en respuesta al

RESULTADOS

tratamiento con β -estradiol. Como se observa en la Figura 71, el tipo silvestre Col así como las líneas COL9-1 y COL9-2 presentan niveles muy bajos de expresión de *COL9* en ausencia de β -estradiol (-E). Sin embargo, al incubar las semillas con β -estradiol, los niveles de expresión de *COL9* en las líneas COL9-1 y COL9-2 aumentan de manera considerable, pero no en las semillas del tipo silvestre. Estas observaciones confirman que la sobreexpresión de *COL9* en las líneas transgénicas seleccionadas de *COL9* es totalmente dependiente de β -estradiol en ambas líneas analizadas.

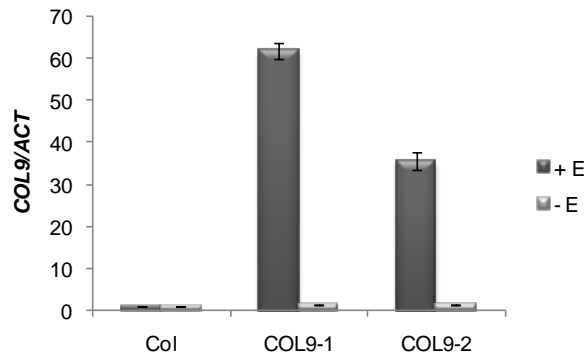


Figura 71. Expresión de *COL9* en las líneas de sobreexpresión inducibles COL9-1 y COL9-2 identificadas. Análisis de expresión por qRT-PCR de *COL9* en plántulas de 11 días de Col y en las líneas inducibles por β -estradiol COL9-1 y COL9-2, cultivadas en presencia (+E) y ausencia (-E) de la hormona a una concentración 10 μ M. Los valores de expresión se han relativizado con los de *ACT2*.

CO es un regulador central de la ruta de la floración dependiente de fotoperiodo (Andres y Coupland, 2012), y promueve la floración induciendo directamente la expresión del integrador floral *FT* (Castillejo y Pelaz, 2008). Por su parte, *COL9* es un represor floral que participa también en la ruta del fotoperiodo, ya que su sobreexpresión conlleva un retraso de la transición floral en *Arabidopsis*, mientras que alelos de pérdida de función muestran una aceleración de la floración (Cheng y Wang, 2005). Se ha propuesto que *COL9* posiblemente retrase la floración reprimiendo la expresión de *CO*, y como consecuencia, reduciendo la expresión de *FT* (Cheng y Wang, 2005). Estos datos indican que *COL9* está implicado en la represión de la transición floral en *Arabidopsis*, aunque no se ha descrito la posible implicación de este locus en la regulación de la dormición o la germinación de la semilla. Consistente con la sobreexpresión de *COL9* observada en las líneas inducibles COL9-1 y COL9-2, pudimos comprobar que ambas sufren un retraso considerable de la floración en presencia de β -estradiol, tal como cabía esperar con líneas que acumulan niveles altos de mensajero de *COL9* (Cheng y Wang, 2005). En ausencia de la hormona, dichas plantas florecen de forma similar a las plantas del tipo silvestre (Figura 72).

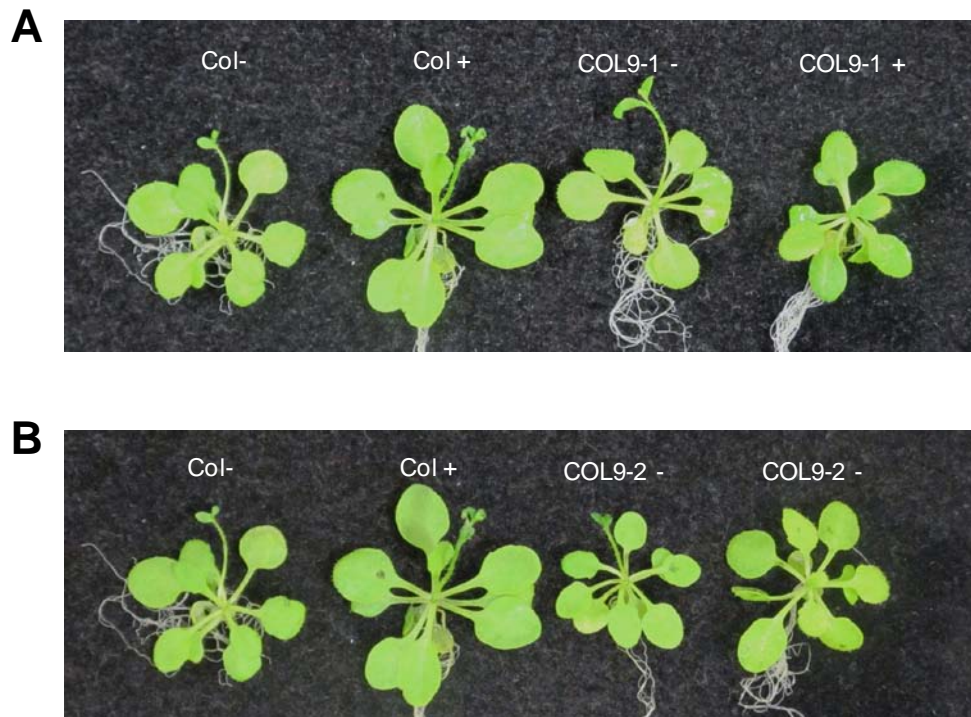


Figura 72. La sobreexpresión inducida de *COL9* causa un retraso en la floración. Fenotipo de floración de plántulas del tipo silvestre Col, y de líneas transgénicas COL9-1 (A) y COL9-2 (B) que presentan expresión inducida por β -estradiol de *COL9*, inducidas con β -estradiol (+) y sin inducir (-).

Con el fin de confirmar el papel de *COL9* en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*, decidimos analizar el efecto de la pérdida de función de este locus sobre dicho proceso. Para ello, aislamos mutantes de inserción de este gen (*col9*) y cuantificamos tanto su tiempo de floración como la capacidad de germinación de semillas frescas del mutante *col9*. Como se observa en la figura 73A, y de acuerdo con resultados previos (Cheng y Wang, 2005), las plantas mutantes *col9* presentan una reducción moderada del tiempo de floración en condiciones de DL. Sin embargo, como observamos en la Figura 73B, el mutante *col9* no presenta diferencias significativas en la dormición de sus semillas respecto a las del tipo silvestre Col. Este resultado no nos permite concluir que *COL9* no esté implicado en la regulación de la dormición ya que es posible que la redundancia funcional con otros miembros de la familia CO enmascare el requerimiento de este gen para el control de la dormición. Serán necesarios experimentos adicionales para confirmar la implicación de *COL9* en la regulación de la dormición, tal como sugieren las alteraciones observadas en las líneas de sobreexpresión inducibles.

RESULTADOS

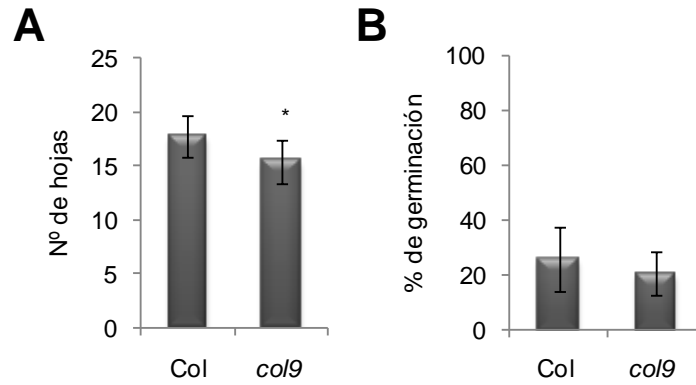


Figura 73. El mutante *col9* florece de forma temprana, pero no muestra alteraciones en la respuesta de dormición de sus semillas. Caracterización fenotípica de los mutantes *col9*. A. Cuantificación de la floración de Col y *col9* en condiciones de día largo. B. Cuantificación de la dormición de semillas frescas de Col y de *col9* a los 5 días después de imbibición.

7.4 Aproximación a la caracterización funcional de *SCL30*, cuya sobreexpresión inducible provoca un aumento de la dormición.

Otras líneas de sobreexpresión de FTs que identificamos en las condiciones de ensayo de tipo 3 por presentar alteraciones en el proceso de la dormición fueron aquellas que sobreexpresaban *SCARECROW LIKE 30 (SCL30)* (Pysh et al., 1999). La colección de líneas de sobreexpresión generadas por el consorcio del proyecto TRANSPLANTA contenía 3 líneas para este FT, a las que denominamos SCL30-1, SCL30-2 y SCL30-3. Todas ellas mostraron un aumento significativo de los niveles de la dormición, que se muestra como una disminución de la germinación de semillas frescas, respecto a los que presentaron las semillas frescas del tipo silvestre Col, incluso en ausencia de tratamientos con β -estradiol (Figura 74).

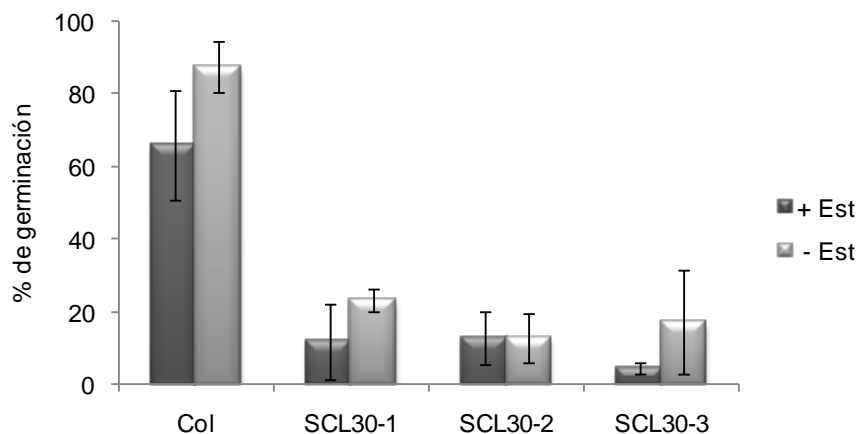


Figura 74. Las líneas XVE-SCL30 presentan un aumento de los niveles de dormición de semillas. Cuantificación de la germinación de semillas frescas de Col y de las líneas transgénicas SCL30-1, SCL30-

2 y SCL30-3 en condiciones de crecimiento de LB y 16°C, inducidas con β -estradiol (+Est) y en ausencia de este (-Est).

Puesto que la reducción de los niveles de germinación de semillas frescas en las líneas SCL30 de TRANSPLANTA también se observa en ausencia de β -estradiol, nos propusimos generar líneas de sobreexpresión constitutiva con un promotor 35S que nos permitiera analizar el efecto de la sobreexpresión de SCL30 en dormición. SCL30 es parte de una familia de homólogos de SCARECROW (SCR) con más de 30 miembros entre los que se encuentran las proteínas DELLA, y que se han agrupado en ocho subfamilias (Figura 75). La subfamilia II, donde se encuentra SCL30, contiene varias proteínas SCL entre las cuales el homólogo más próximo en secuencia es SCL11 (Pysh et al., 1999) (Figura 75). Por ello, además de líneas de sobreexpresión de SCL30, decidimos generar también líneas 35S::SCL11.

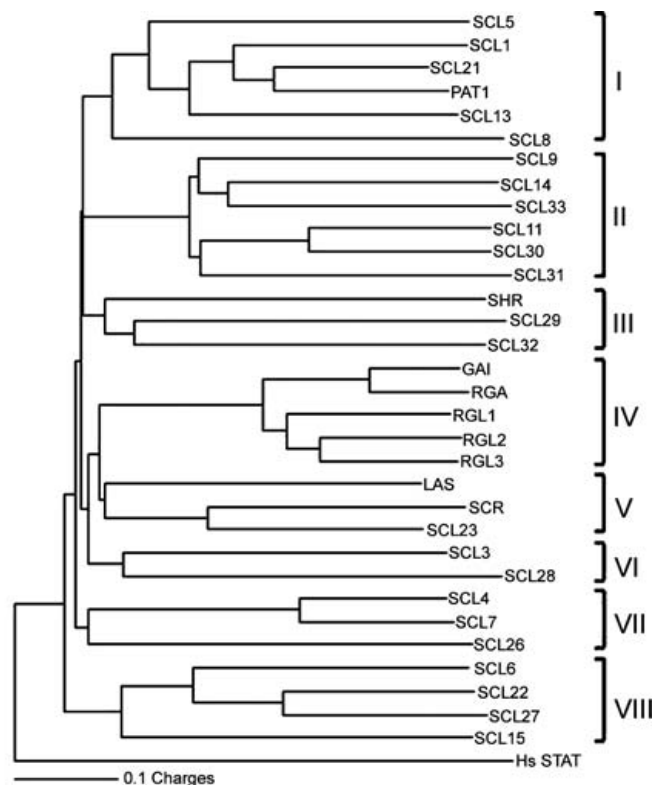


Figura 75. Análisis filogenético de la familia de proteínas SCL de Arabidopsis. Estos factores SCL se agrupan en 8 subfamilias (I-VIII)s, englobándose SCL30 y SCL11 en la subfamilia II junto a otros 5 miembros. Adaptado de Pysh et al., 1999.

De entre las líneas generadas seleccionamos dos líneas representativas de cada uno de los SCL analizados para llevar a cabo los ensayos de dormición. Todas las líneas de sobreexpresión constitutiva seleccionadas mostraron niveles de

RESULTADOS

expresión del gen correspondiente, *SCL30* o *SCL11*, muy superiores a los detectados en las líneas de tipo silvestre (Figura 76).

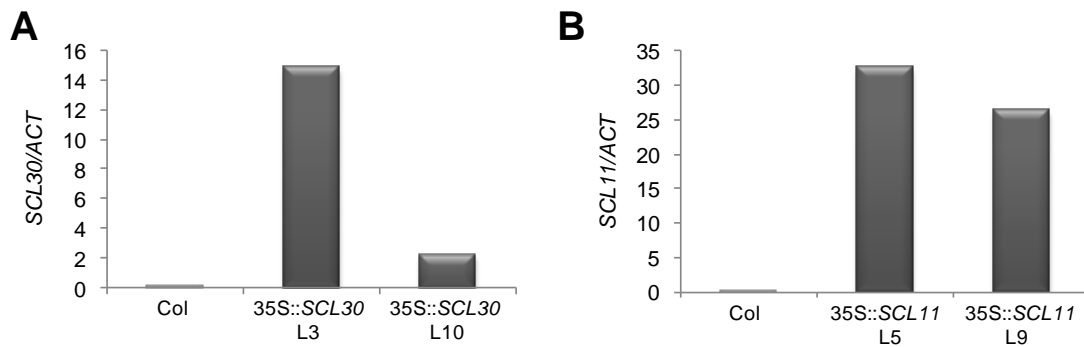


Figura 76. Expresión de *SCL30* (A) y de *SCL11* (B), en líneas sobreexpresión constitutiva 35S::*SCL30* y 35S::*SCL11*, respectivamente. Análisis de expresión por qRT-PCR de *SCL30* (A) y *SCL11* (B) en plántulas de 10 días en Col de las líneas de sobreexpresión constitutiva 35S::*SCL30*, L3 y L10, y 35S::*SCL11*, L4 y L5. Los valores de expresión se han relativizado con los de *ACT2*.

A continuación, analizamos el fenotipo de dormición de las líneas de sobreexpresión constitutiva de *SCL30* y *SCL11*. Como se observa en la Figura 77, semillas de estas líneas mostraron mayores niveles de dormición que las del tipo silvestre, corroborando los resultados obtenidos con las líneas de sobreexpresión inducible XVE-*SCL30* generadas en el proyecto TRANSPLANTA. De hecho, los niveles de aumento de la dormición medidos a 5 DDI para la línea 3 de 35S::*SCL30* y la línea 4 de 35S::*SCL11* en comparación con plantas del tipo silvestre Col son similares a los obtenidos anteriormente para las líneas de sobreexpresión inducible XVE-*SCL30* (Figura 74). Estos datos son consistentes con que ambos genes *SCL* estén implicados en la regulación de la dormición.

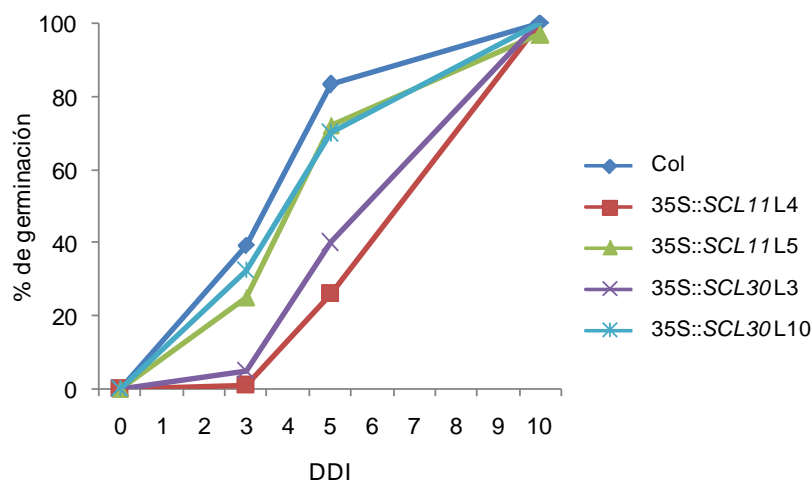


Figura 77. La sobreexpresión de *SCL11* y de *SCL30* provoca un aumento de los niveles de dormición de las semillas. Dormición estimada como germinación de semillas frescas del tipo silvestre Col

Col y de las líneas de sobreexpresión 35S::*SCL11*, L4 y L5, y 35S::*SCL30*, L3 y L10. Cuantificación del porcentaje de germinación del experimento en condiciones de LB y 16°C.

A continuación analizamos el fenotipo de dormición mostrado por semillas de los mutantes *scl11* y *scl30*, así como del doble mutante *scl11 scl30*. En la Figura 78E se muestran las cuantificaciones de la dormición de estas semillas en condiciones de LB y 22°C, mientras que en la Figura 78F se muestran las cuantificaciones en LB y 16°C, en los que no se observan diferencias entre los niveles de dormición de las semillas de tipo silvestre y las de los mutantes sencillos. Estos resultados podrían deberse a la posible redundancia funcional de los factores *SCL30* y *SCL11* como represores de la germinación durante la dormición. La pequeña diferencia observada en los porcentajes de germinación con semillas del doble mutante *scl30 scl11* podría también explicarse a que otros miembros de la familia actúen redundantemente con *SCL30* y *SCL11*, en el control de este proceso. De hecho, *SCL3*, se ha implicado previamente en el control de la germinación de semillas (Zhang et al., 2010), posiblemente contrarrestando el papel de las proteínas DELLA en este proceso.

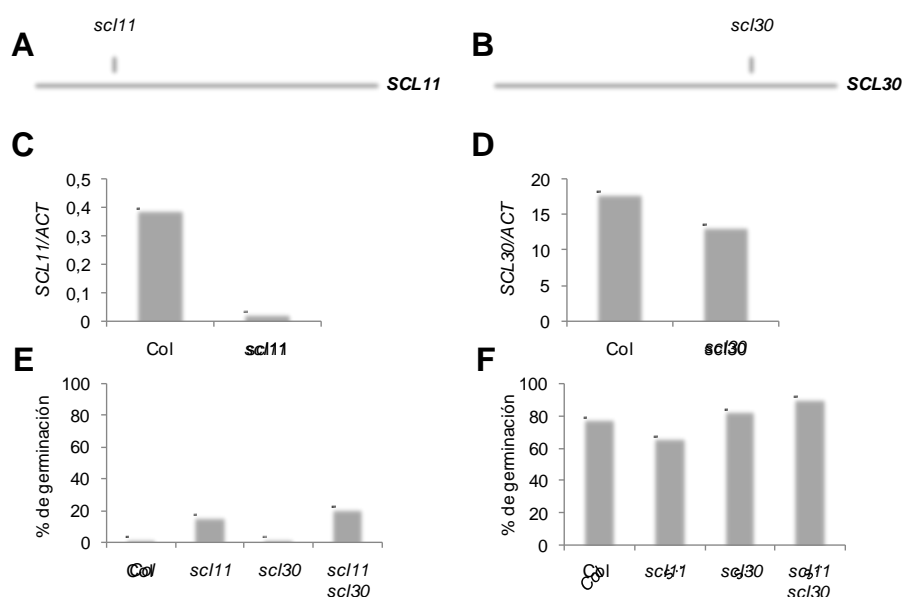


Figura 78. Los mutantes *scl11* y *scl30* muestran un ligero aumento de los niveles de dormición de semillas. A y B. Esquema de la inserción de T-DNA en el mutante *scl11* (A) y en el mutante *scl30* (B). C y D. Determinación por qRT-PCR de los niveles de expresión de *SCL11* (C) y *SCL30* (D) en plántulas de 10 días de Col y de los mutantes *scl11* y *scl30*, respectivamente. E y F. Cuantificación de la germinación de semillas frescas del tipo silvestre Col y de los mutantes *scl11*, *scl30* y del doble mutante *scl11 scl30* en condiciones de LB y 22°C a 5 DDI (E) y en condiciones de LB y 16°C a los 15 DDI (F).

Serán necesarios análisis experimentales adicionales para poder desvelar el papel que *SCL30* juega en la regulación de la dormición en Arabidopsis, si bien los

RESULTADOS

datos mostrados sugieren la participación tanto de SCL30 como de SCL11 en dicho proceso.

Además de estos dos FT cuyo análisis hemos iniciado, el escrutinio de las líneas de la colección TRANSPLANTA nos ha permitido desvelar una posible función en la regulación de la dormición para diversos FTs que hasta el momento no se habían implicado en el control de este proceso. Estas observaciones demuestran la utilidad de la colección de líneas TRANSPLANTA para identificar genes implicados en este o en otros procesos de desarrollo. Es de esperar que la caracterización funcional futura de dichos FTs permita corroborar su participación en el control de la dormición y revelar su papel en la regulación de este importante carácter con evidentes implicaciones en la capacidad de adaptación de las plantas así como en el rendimiento de especies cultivadas.

DISCUSIÓN



El desarrollo de las plantas atraviesa diversas fases, cada una de las cuales está caracterizada por patrones de expresión génica específicos. El cambio de una etapa de desarrollo a la siguiente supone, por tanto, una reprogramación de patrones transcripcionales que promueven los procesos de organogénesis y diferenciación característicos de cada fase del desarrollo vegetal. Además, las plantas son capaces de modular su desarrollo en respuesta a las condiciones ambientales, lo que les proporciona una gran ventaja adaptativa al tratarse de organismos sésiles. La información procedente de factores medioambientales se integra con señales endógenas para determinar el momento preciso en que tiene lugar la transición de una fase de desarrollo a la siguiente. Esta plasticidad del desarrollo vegetal requiere que los patrones de expresión génica asociados a las distintas fases de desarrollo respondan también a cambios medioambientales y permitan a las plantas adaptar el momento en que tienen lugar los cambios de fase del desarrollo a las condiciones ambientales.

Los factores de transcripción desempeñan un papel clave en la regulación de la actividad génica así como de redes reguladoras que controlan una gran variedad de procesos biológicos en plantas, incluyendo aquellos relacionados con el desarrollo. Sin embargo, la regulación de la expresión génica no depende exclusivamente de factores transcripcionales, y un gran número de trabajos han demostrado que los procesos de remodelación de cromatina tienen un papel central en el establecimiento y también en el mantenimiento de patrones de expresión génica que controlan el desarrollo de plantas (Graeber et al., 2012; He, 2012; Zhao y Zhou, 2012; Gentry y Hennig, 2014). De hecho, resultados recientes han puesto de manifiesto que la interacción entre factores de transcripción y complejos proteicos que actúan modulando la expresión génica a través de la reorganización de la cromatina es esencial para una apropiada regulación de genes maestros del desarrollo en plantas, y más concretamente en *Arabidopsis* (Smaczniak et al., 2012).

La dormición de la semilla consiste en la ausencia de germinación aún en condiciones que sean favorables (Bewley, 1997; Finkelstein et al., 2008; Bentsink y Koornneef, 2009). Este estado quiescente es un proceso de desarrollo que permite a la semilla modular el momento de la germinación para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, y asegurar así que la planta a la que dará lugar se establece en un entorno adecuado para completar de manera óptima su crecimiento y desarrollo post-germinativo. Diversos factores endógenos y medioambientales modulan la adquisición de la dormición por la semilla en desarrollo así como la salida de la

DISCUSIÓN

dormición una vez que la semilla se separa de la planta madre. Aunque diversos estudios han desvelado algunos de los mecanismos moleculares que regulan la dormición de la semilla, a diferencia de lo que ocurre con otros procesos de desarrollo vegetal, como el tiempo de floración o la diferenciación de órganos florales, muchos aspectos del control de este proceso de desarrollo permanecen en gran medida desconocidos.

En este trabajo nos hemos propuesto profundizar en el conocimiento de los circuitos reguladores que controlan la dormición de la semilla. Para ello, nos hemos centrado fundamentalmente en el papel que desempeñan los procesos de remodelación de cromatina, y en concreto, en el de una pequeña familia de proteínas de *Arabidopsis* con un dominio PHD, en la regulación de la dormición. Estas proteínas, EBS y SHL, pertenecen a una familia de reguladores transcripcionales específicos de plantas que actúan a través de cambios en la organización de la cromatina. Asimismo, nos hemos interesado en la identificación de nuevos reguladores transcripcionales de *Arabidopsis* implicados en el control de este proceso.

Análisis de los mecanismos moleculares que median la función de *EBS* en el control de la dormición

La arquitectura funcional de las proteínas EBS y SHL sugiere que actúan modulando la expresión de sus genes diana a través de la interacción con otras proteínas que formen parte de complejos remodeladores de cromatina. El estudio del fenotipo de mutantes *ews* y *shl* mostró que estos genes participan en la regulación de varios procesos del desarrollo de la planta (Gómez-Mena et al., 2001; Müssig et al., 2003; Piñeiro et al., 2003; López-González, Tesis Doctoral 2010). Entre ellos el más estudiado es el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*. *EBS* es necesario para reprimir al integrador floral *FT* (Piñeiro et al., 2003) y *SHL* al integrador floral *SOC1*, uniéndose *in vivo* a secuencias reguladoras de *FT* y *SOC1*, respectivamente (López-González, Tesis Doctoral 2010). En nuestro laboratorio se ha comprobado además que EBS y SHL reconocen *in vitro* las modificaciones de histonas H3K4me3/2, y que el dominio PHD presente en ambas proteínas es el responsable de esta interacción. Además, regiones discretas de la cromatina de los loci *FT* y *SOC1* se encuentran enriquecidas en histonas H3K9K14 acetiladas en los mutantes *ews* y *shl-2* respectivamente, lo que sugiere que EBS y SHL son necesarios para reclutar complejos remodeladores de cromatina relacionados con la desacetilación de histonas y silenciar la expresión de ambos integradores florales a nivel transcripcional (López-

González, Tesis Doctoral 2010). Además de desempeñar un papel central en el control de la floración, EBS participa en el control de otros procesos de desarrollo (Gómez-Mena et al., 2001). En este trabajo hemos demostrado que EBS es también un regulador clave de la dormición de semillas, y que es necesario para la represión de la germinación durante el periodo de dormición.

Estudios genéticos y bioquímicos adicionales han identificado otros factores relacionados con la cromatina necesarios para la regulación de la dormición de la semilla, como RDO4/HUB1 y su homólogo HUB2, así como RDO2 (Liu et al., 2007), ATXR7 (Tamada et al., 2009) y SDG8 (Bassel et al., 2011). Todas estas observaciones confirman que los procesos de remodelación de la cromatina son esenciales para la regulación de la dormición.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran que *EBS* se expresa en la semilla, tanto durante el desarrollo de las mismas en la silicua como durante la imbibición de la semilla y los primeros estadios de la germinación (Figura 12). La expresión de *EBS* no parece responder a tratamientos con hormonas como GA y ABA, reguladores centrales de la dormición y la germinación (Fig. 10), aunque hemos observado una clara disminución de la expresión de este gen durante el proceso de germinación, tanto en presencia como en ausencia de GA. Esta observación es consistente con una función represora de la germinación para *EBS* en la regulación de la dormición. Los estudios que hemos realizado con el mutante *ebs*, nos han permitido concluir que EBS actúa como un regulador positivo de la dormición, tanto en condiciones de luz como de oscuridad (Fig. 13A). Además hemos comprobado que la sobreexpresión de *EBS* provoca un fenotipo de reducción de la dormición similar a las líneas mutantes *ebs* (Fig. 15). La disminución de la dormición de semillas de plantas 35S::*EBS* se observa tanto en accesiones de *Arabidopsis* poco durmientes como Ler o Col y también en ecotipos altamente durmientes como Cvi (Figuras 15, 16 y 19), confirmando que EBS está implicado en la regulación de la dormición independientemente del fondo genético. En este trabajo hemos comprobado que líneas de sobreexpresión de *EBS* inducibles por β -estradiol también producen un fenotipo de dormición similar a las anteriores (Fig. 23). Esta observación indica que la sobreexpresión de *EBS* durante la imbibición es suficiente para reducir el nivel de dormición de semillas frescas y que por tanto, la función de EBS en promover la dormición es necesaria tras el desarrollo de la semilla en la silicua. Sin embargo, no podemos descartar que EBS tenga también funciones en el establecimiento de la dormición durante el desarrollo de la semilla en la planta madre.

DISCUSIÓN

El fenotipo similar de las líneas mutantes *ebs* y de la sobreexpresión constitutiva 35S::*EBS*, ya se había observado en nuestro laboratorio al estudiar la implicación de EBS en el control de la floración (Piñeiro et al., 2003). En este trabajo hemos comprobado que la aceleración de la floración que se produce en mutantes *ebs* y en plantas con la construcción 35S::*EBS* también se produce en plantas que sobreexpresan *EBS* inducidas por β -estradiol.

La similitud de los fenotipos observados entre mutantes *ebs* y líneas de sobreexpresión de *EBS*, tanto en dormición como en floración, podría deberse a que la proteína EBS participe en complejos remodeladores de la cromatina que median la regulación de la expresión de genes implicados en la regulación de diversos aspectos del desarrollo. La sobreacumulación de uno de los componentes del complejo podría alterar la estequiometría entre sus subunidades, impidiendo su correcto funcionamiento y por tanto la regulación de sus genes diana (Piñeiro et al., 2003).

Además, la proteína EBS reprime la germinación de semillas frescas en respuesta a las bajas temperaturas durante la estratificación. Esta función de EBS se ha observado tanto en semillas frescas de accesiones de *Arabidopsis* que presentan bajos niveles de dormición, como Col y Ler (Fig. 15B y 16), como en Cvi (Fig. 19), altamente durmiente, lo que demuestra que EBS desempeña un papel esencial en la regulación de la dormición de la semilla en *Arabidopsis*, independientemente del fondo genético. Igualmente, EBS ejerce un papel represor de la germinación en respuesta a la luz. Por tanto, se puede concluir que EBS regula la dormición de la semilla en respuesta a las principales condiciones ambientales que favorecen la germinación en *Arabidopsis*.

Todos estos resultados indican un papel para EBS como represor de la germinación durante la dormición e imbibición de la semilla fresca, así como en la post-maduración, si bien no podemos descartar que EBS esté también implicado en la inducción de la dormición durante el desarrollo de la semilla.

Al igual que *EBS*, *SHL* también se expresa durante el desarrollo y la imbibición de la semilla, aunque a niveles inferiores que *EBS*. La expresión de *SHL* aumenta durante el desarrollo de la semilla, hasta el final de la maduración, y su expresión se observa principalmente en el embrión, y también en el endospermo (Fig. 12). Tanto la homología de *SHL* con *EBS* como el patrón de expresión observado durante el desarrollo de la semilla, similar al de *EBS*, sugieren que *SHL* también podría participar en el control de la dormición. La caracterización de mutantes *shl* indica que estos no

muestran ninguna alteración fenotípica a nivel de dormición (Fig. 24), aunque esto podría deberse a la redundancia funcional con *EBS* en la regulación de este proceso. Para profundizar en esta posibilidad, analizamos el fenotipo de dormición de semillas del doble mutante *ebs shl*, tanto en fondo Col como en fondo Ler. La reducción de la dormición observada en el doble mutante *ebs shl* es significativamente mayor que la del mutante sencillo *ebs*, tanto en luz como en oscuridad, lo que reveló que *SHL* desempeña funciones en el control de la dormición de *Arabidopsis*, si bien su papel únicamente es apreciable en el doble mutante *ebs shl* (Fig. 24). Estos resultados sugieren que *SHL* tiene una función redundante con la de *EBS* en el control de la dormición de semillas, tanto en luz como en oscuridad. Estas observaciones son compatibles con que estos remodeladores de cromatina estén implicados en la regulación de la expresión génica en la semilla y modulen procesos como la dormición y/o la germinación.

Durante el desarrollo de este trabajo, también hemos observado que las semillas frescas del mutante *ebs* tienen un menor requerimiento de GAs exógenas para germinar, ya que en ausencia de esta hormona, los niveles de germinación de *ebs* son elevados (Fig. 26A). De hecho, las semillas frescas del doble mutante *ebs shl* germinan en su práctica totalidad en ausencia de tratamientos con GA, mientras que las semillas del tipo silvestre y del mutante *shl* muestran solo un 50% de germinación con una concentración de GA entre 10 y 100 μ M (Fig. 26A). De acuerdo con resultados anteriores descritos en Gómez-Mena et al. (2001), semillas frescas de *ebs* y del doble mutante *ebs shl* muestran mayor resistencia a PAC (Fig. 26B), así como a concentraciones crecientes de ABA (Fig. 27). Estas observaciones son consistentes con la redundancia funcional que hemos observado entre *EBS* y *SHL* en el control de la dormición de la semilla, ya que los defectos en dormición causados por la pérdida de función de *SHL* solo son observables en plantas portadoras de alelos no funcionales de *EBS*. Estos datos podrían explicarse en base a un mayor nivel de GA en las semillas de *ebs*, o una hipersensibilidad de éstas a dicha hormona, y/o también por una menor concentración de ABA en las semillas del mutante *ebs* o a una menor sensibilidad a esta hormona promotora de la dormición. Además, los resultados previos descritos en Gómez-Mena et al. sugerían una posible interacción de *EBS* con *GA1* en el control de la dormición, ya que el mutante *ga1-3* suprime totalmente el fenotipo de dormición reducida de los mutantes *ebs*, y el doble mutante *ebs ga1-3* sólo germina en presencia de GA exógena. Los mutantes de pérdida de función *ga1-3* presentan una deficiencia en GA y son incapaces de germinar en ausencia de GAs exógenas (Koornneef y Vanderveen, 1980, Sun y Kamiya, 1994). Estos resultados

DISCUSIÓN

podrían sugerir que las GAs median el papel de *EBS* en la regulación de la dormición. Sin embargo, la carencia total de GAs causada por la pérdida de función de *GA1* impone un fuerte bloqueo de la germinación de semillas de *Arabidopsis*, lo que puede complicar la interpretación de estas observaciones, por lo que únicamente podemos concluir que *EBS* regularía procesos del desarrollo también modulados por GAs (Piñeiro et al., 2003).

Los datos disponibles acerca de la función de *EBS* indican que esta proteína puede estar implicada en la regulación de la expresión génica a través de cambios en la organización de la cromatina en genes reguladores del desarrollo. Por tanto, es posible que *EBS* participe en la regulación de la dormición controlando la expresión de genes implicados en la modulación de este proceso. Las aproximaciones transcriptómicas proporcionan una perspectiva global de los cambios de expresión génica que tienen lugar asociados a procesos de desarrollo u otras respuestas biológicas y también de cómo afecta la pérdida de función de genes a los perfiles de expresión de mutantes (Movahedi et al., 2012). Por ello, en este trabajo decidimos abordar la caracterización molecular de *EBS* en la regulación de la dormición siguiendo una estrategia de transcriptómica. Para ello, analizamos el transcriptoma de semillas frescas del mutante *ebs*. Puesto que los datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio sugieren la existencia de un posible vínculo entre *EBS* y GAs en la regulación de la dormición, decidimos incluir en este análisis transcriptómico comparativo al mutante *spt-10*, al igual que *ebs* en fondo *Ler*, con el fin de determinar si existían relaciones funcionales en el control de la dormición entre *EBS* y *SPT*. *SPT* codifica un factor de transcripción de tipo bHLH, que inicialmente se propuso como necesario para reprimir la germinación de semillas frescas, y que mediaba la respuesta de germinación a la luz y la temperatura (Penfield et al., 2005). Además, se demostró que la proteína *SPT* era necesaria en semillas durmientes para mantener la represión de la transcripción de genes *GA3OX* (Penfield et al., 2005). Estas conclusiones se obtuvieron con estudios que empleaban el mutante *spt-10*, que de acuerdo con estos autores representaría un alelo de pérdida de función (Penfield et al., 2005). Sin embargo, la observación de que este alelo mutante muestra mayores niveles de expresión de *SPT* que el tipo silvestre (Vaistij et al., 2013; este trabajo), y que pudiera ser un alelo de ganancia de función, puede dificultar la interpretación de los resultados obtenidos con dicho alelo mutante. Sin embargo, hasta el momento no se disponen de datos que muestren que la sobreexpresión del mensajero de *SPT* que se produce en *spt-10* se traduzca en una acumulación de una proteína *SPT* funcional, por lo que serán necesarios datos adicionales a nivel molecular para concluir la

naturaleza de dicho alelo. Por otra parte, resultados recientes obtenidos con el alelo de pérdida de función *spt-2*, también en fondo *Ler*, indican que SPT funcionaría como un represor de la dormición (Vaistij et al., 2013), lo que contrasta con la función inicialmente propuesta para SPT. Por otro lado, estudios recientes muestran que SPT desempeña papeles opuestos en la regulación de la dormición en distintos ecotipos de *Arabidopsis*. Todas estas observaciones subrayan la complejidad de los circuitos reguladores de la dormición en los que participa este factor de transcripción, por lo que serán necesarios datos adicionales para concluir cual es la función de SPT en el control de este proceso. Por ello, en este trabajo nos hemos centrado fundamentalmente en profundizar en la caracterización de los mecanismos que median la función de EBS en el control de la dormición.

Nuestros análisis transcriptómicos, confirmados mediante experimentos de qRT-PCR en los que analizamos la expresión de algunos de los genes diferencialmente expresados en la hibridación de cristales de DNA, han puesto de manifiesto que SPT controla a un gran número de genes, en comparación con EBS. Esto sugiere que SPT tendría un efecto más general sobre la expresión de genes durante el proceso de la dormición de la semilla, mientras que EBS actuaría sobre un grupo más específico de genes, a pesar de tratarse de un factor implicado en procesos de remodelación de cromatina. Sin embargo, es posible que el aumento de expresión de SPT en *spt-10* provoque una desregulación mayor que la que pueda estar asociada a una pérdida de función de este gen. Al realizar una clasificación funcional de los genes desregulados, encontramos que tanto en *spt-10* como en *ebs*, la mayoría corresponden a genes de respuesta a estímulos abióticos y bióticos y respuesta a estrés, a genes que codifican para actividades enzimáticas del tipo hidrolasas en *ebs* y transferasas en *spt-10*, y a genes relacionados con la remodelación de la pared celular (Fig 32). La presencia de enzimas hidrolasas y de modificación de la pared se ha relacionado más con la salida de la dormición que con la inducción de la germinación (Cadman et al., 2006). Estas proteínas son necesarias para la movilización de reservas y para el debilitamiento de la pared celular o el crecimiento de las células para el crecimiento del embrión. Por otro lado, la coexpresión de genes relacionados con dormición y con estrés podría suponer una ventaja evolutiva, ya que la dormición es un mecanismo que permite sobrevivir a la semilla durante periodos prolongados de estrés ambiental que son desfavorables para el crecimiento (Cadman et al., 2006).

La presencia de un número significativo de genes expresados diferencialmente tanto en el mutante *ebs* como en *spt-10* podría deberse, al menos en algunos casos, a

DISCUSIÓN

que en ambos mutantes se producen procesos metabólicos similares, asociados a la germinación prematura observada en ambos mutantes, respecto a la ausencia de germinación mostrada por las semillas del tipo silvestre. Sin embargo, la ausencia de desregulación en el mutante *ebs* de genes como *GA3OX*, que podrían mediar el papel de *SPT* en el control de la dormición (Penfield et al., 2005), sugiere que *EBS* y *SPT* podrían desempeñar funciones al menos parcialmente independientes en la regulación de este proceso.

Además de *GA3OX1* y *2*, otros genes relacionados con respuestas hormonales, así como genes implicados en modular la estructura de cubiertas de la semilla, se encuentran diferencialmente expresados únicamente en el mutante *spt-10* y podrían contribuir al fenotipo de dormición reducida del mutante (Fig. 30). Entre ellos está *GA20OX1*, sobreexpresado en semillas del mutante *spt-10*. Asimismo, disminuye la expresión de *ABA1/ZEP*, que participa en la síntesis de ABA, mientras que aumenta la de importantes reguladores de la señalización de ABA como *ABI1*. Además, en el análisis de perfiles transcriptómicos del mutante *spt-10*, hemos desvelado que la expresión de los genes *TT4*, *TT5* y *TT7*, que participan en la síntesis de flavonoides en la testa de las semillas y modulan sus niveles de dormición (Debeaujon et al., 2000), y *MUM4* y *GLABRA2 (GL2)*, implicados en la síntesis completa de mucílago (Western et al., 2004), está alterada. Estos cambios podrían contribuir también a explicar los defectos en dormición de estos mutantes. A parte de estas funciones mediadas por *SPT*, el análisis conjunto llevado a cabo con los mutantes *spt-10* y *ebs* ha revelado que *SPT* podría compartir con *EBS* circuitos reguladores comunes en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*. Entre los genes desregulados en ambos mutantes y que podrían explicar a nivel molecular el defecto en dormición observado, encontramos algunos que median procesos como la hidrólisis de componentes de la pared y con la expansión celular, así como genes relacionados con la respuesta a ABA y GAs. Genes reprimidos en los dos mutantes incluyen a *ABI5*, *ASG1*, *SOM*, *BRG3*, *MFT*, *XERICO* y *AGL67*. Por el contrario, loci como *GASA4*, *GASA6*, *GASA14*, *MUM1*, *EGL3*, *CP1*, *EXP1*, *EXP2*, *EXP3*, *EXP4*, *EXP8*, *EXP9*, *EXP10*, *EXP15* Y *EXP20* están sobreexpresados tanto en *ebs* como en *spt-10* (Fig. 36). Por su parte, entre los genes con expresión desregulada en mutantes *ebs*, se han identificado loci implicados relacionados con la regulación del proceso de maduración (*AMP1*) y con el metabolismo de ABA (*SCL14*), y que podrían contribuir al fenotipo de reducción de la dormición observado en los mutantes *ebs*. Asimismo, hemos observado que genes de función desconocida, como *AGP31*, también se encuentran desregulados en el

mutante *ebs* (Fig. 33). Una caracterización funcional de estos genes será necesaria para determinar cuáles de ellos podrían mediar el control de EBS sobre la dormición.

EBS también activa la expresión de *AMP1*, quien participa en la regulación de la adquisición y/o mantenimiento de la dormición de semillas (Saibo et al., 2007; Griffiths et al., 2011). En mutantes *amp1* aparecen sobreexpresados los genes *CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2 (CRF2)*, y *CYP78A5*, que, entre otros papeles, determinan el potencial de crecimiento de la semilla (Adamski et al., 2009). Por el contrario, la expresión de *GASA2* disminuye en *amp1* (Griffiths et al., 2011). Alteraciones en la expresión de estos genes también ocurren en *ebs*, lo que sugiere que EBS y AMP1 podrían participar en una ruta común de regulación de la dormición de la semilla mediadora de la expresión de *CRF2*, *CYP78A5* y *GASA2*. La expresión de *GASA2* también la encontramos desregulada en mutantes de genes que participan en la regulación de la dormición como *phyA* y en el triple mutante *snrk2.2/2.3/2.6* (Nakashima et al., 2009; Ibarra et al., 2013). Esto sugiere un papel de *GASA2* en la regulación de la dormición de semillas, si bien no podemos descartar que la desregulación de su expresión sea consecuencia de otros mecanismos, como una respuesta a la disminución del nivel de ABA que se produce en los mutantes *amp1* y *snrk2.2/2.3/2.6*. Dado que la expresión de *GASA2* en el doble mutante *ebs shl* es significativamente mayor que la detectada en *ebs* (Fig. 39), *SHL* también participaría en el control de la expresión de *GASA2*. Se requerirán estudios genéticos y moleculares adicionales para delimitar el papel de *GASA2* en el control de la dormición de semillas frescas, así como su interacción con EBS y SHL.

Otros genes relacionados con dormición, y cuya expresión está desregulada en *ebs*, no están regulados por SHL, ya que en ausencia de SHL, en el doble mutante *ebs shl*, no se ve un aumento de su expresión. Así, la regulación ABI5, MFT y AGL67 estaría únicamente regulada por EBS (Figura 39). La expresión alterada de estos genes podría explicar el fenotipo de dormición de semillas *ebs*, ya que todos ellos promueven dicha respuesta.

El análisis de la relación genética de EBS con genes relacionados con la dormición cuya expresión está desregulada en *ebs*, ha puesto de manifiesto la posible interacción entre ellos. Además el estudio de mutantes en otros genes desregulados en *ebs*, ha desvelado el papel de *AGP31* en la regulación de la dormición, no descritos hasta el momento. Por otra parte, hemos observado que genes como *At3g60520* y su homólogo, *At1g02070*, *ATS1* y *WRK23*, cuya expresión está alterada en el mutante *ebs*, no participan en el control de la dormición. En nuestras condiciones, la dormición

DISCUSIÓN

del mutante *mft* tampoco presenta diferencias respecto a las semillas de tipo silvestre, en contraste con observaciones recientes (Vaistij et al., 2013), donde sí que observan un ligero efecto de dicha mutación a nivel de la respuesta de dormición. La transcripción de *MFT* está directamente reprimida por *ABI3* y promovida por *ABI5*, mientras que la transcripción de *ABI5* está directamente reprimida por *MFT*, al unirse al promotor de *ABI5* para reprimir su expresión en semillas no durmientes, regulando así negativamente la señalización de ABA (Xi et al., 2010), y promoviendo la germinación de semillas post-maduras. Nuestros resultados indican que la expresión de *MFT*, está reducida en los mutantes *ebs* y *spt-10* respecto a la de *Ler*, y son consistentes con datos recientes que muestran que la expresión de *MFT* aumenta en alelos de pérdida de función de *SPT*, como *spt-2* (Vaistij et al., 2013) y con el fenotipo de dormición reducida observado en los mutantes *ebs* y *spt-10* ya que los mutantes *mft* muestran menores niveles de dormición (Vaistij et al., 2013).

Por otra parte, la testa, que es un tejido metabólicamente inactivo implicado en la protección del embrión, también afecta a la dormición de las semillas (Debeaujon y Koornneef, 2000; Debeaujon et al., 2000; Holdsworth et al., 2008). Al estudiar el fenotipo que presenta la testa de las semillas de mutantes de la familia EBS-LIKE, hemos observado que en el mutante *shl* muestra un fenotipo similar al de las semillas de tipo silvestre *Ler*. Sin embargo, en cierta medida los mutantes *ebs*, pero particularmente los dobles mutantes *ebs shl*, muestran una testa alterada, donde se aprecian células cuadradas o pentagonales en lugar de las hexagonales presentes en las semillas del tipo silvestre, así como defectos en la columela (Fig. 28). Como comentamos anteriormente, una especialización de la testa es la producción del mucílago (Frey-Wyssling, 1976; Grubert, 1981; Boesewinkel y Bouman, 1995). Mediante la tinción con rojo de rutenio, observamos que las semillas del doble mutante *ebs shl* apenas presentaban mucílago (Fig 29). Por otro lado, en *ebs* observamos un aumento de la expresión de genes que codifican proteínas y enzimas que contribuyen en la síntesis de componentes de la testa. Entre los genes diferencialmente expresados en el mutante *ebs* se encuentran *MUM1* y *EGL3*, cuya expresión está aumentada, los cuales podrían desregular la composición del mucílago y los complejos que regulan la diferenciación celular de la testa, provocando las alteraciones fenotípicas observadas. En mutantes *aba1* se ha observado que, debido a la falta de ABA, se produce una cantidad reducida de mucílago (Karssen et al., 1983). Los mutantes *aba1* presentan alteraciones en la producción de mucílago, si bien el tratamiento con ABA exógeno estimula su síntesis (Karssen et al., 1983). Por lo tanto, podría ser que la menor presencia de mucílago en los dobles mutantes *ebs shl* se

debiera que contienen bajos niveles de ABA. En ambos caracteres estudiados, la morfología de la testa y la presencia de mucílago, el fenotipo del doble mutante *ebs shl* está más alterado que en el mutante *ebs*, por lo que *SHL* ejercería un papel parcialmente redundante con *EBS* en el control de estos aspectos.

Por su parte, *AGP31* pertenece a la familia de proteínas *AGP* (arabinogalactanos), que se han descrito como proteínas con un papel en la división celular, expansión celular y muerte celular (Nothnagel, 1997; Schultz et al., 1998). Sin embargo, *AGP30*, otra proteína de esta familia, entre otras funciones, regula la germinación de las semillas en respuesta a ABA (Hengel y Roberts, 2003). Los mutantes *agp30* presentan un aumento de la germinación en presencia de ABA respecto a las semillas de tipo silvestre, probablemente debido a la fuerza ejercida por la radícula gracias a la elongación celular (Hengel y Roberts, 2003). En nuestros análisis hemos observado que *AGP31* también ejerce un papel reprimiendo la dormición de las semillas. *AGP31* actuaría independientemente de *EBS*, en la represión de la dormición, ya que tienen efectos aditivos en el control de esta respuesta.

Otro de los genes relacionados con ABA con expresión alterada en *ebs* es *SCL14*. Se ha descrito que la expresión de *SCL14* es muy alta en semillas secas (Fode et al., 2008), y se ha visto que el mutante acumula *ABI3* y *ABI5*, por lo que inhibe la represión de la germinación por ABA (Bassel et al., 2011). Además, se ha observado una reducción de la dormición de semillas frescas del mutante *sc14*, por lo que *SCL14* podría estar implicado también en la regulación de la dormición. Al analizar la interacción entre *EBS* y *SCL14*, se ha revelado que la presencia de *SCL14* funcional es necesaria para observar el fenotipo de pérdida de dormición en semillas *ebs*, por lo que será necesario profundizar en este estudio para desenmascarar el mecanismo de acción de estos dos genes relacionados con la dormición.

Por otra parte, *RGL2* reprime la respuesta a GA en la imbibición de la semilla, y así la germinación (Lee et al., 2002; Piskurewicz et al., 2008; Lee et al., 2010; Stamm et al., 2012), ya que las semillas de los mutantes *rgl2* presentan reducción de la dormición cuando se embeben en condiciones de luz. Los análisis realizados de relación genética entre *EBS* y *RGL2* sugieren una posible interacción de estos dos genes en la represión de la germinación durante el periodo de dormición, ya que el doble mutante presenta una dormición similar a la de los parentales. Por otra parte, en el mutante *ebs*, la expresión de *RGL2* está aumentada. Por tanto, podría existir una regulación de *EBS* sobre *RGL2*, reprimiéndolo. Sin embargo, el fenotipo de dormición

DISCUSIÓN

del mutante *ebs*, no concuerda con lo esperado, si EBS reprimiera *RGL2*, por lo que probablemente deban estar ocurriendo otras interacciones genéticas que alteran este fenotipo. Además EBS regula positivamente la expresión de *BRG3*, perteneciente a la familia BOIs (BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR (BOI), BOI-RELATED GENE1 (BRG1), BRG2 y BRG3), y que codifica una proteína que interacciona con proteínas DELLA. Este complejo reprime algunas de las respuestas a GA, incluyendo la germinación de semillas (Park et al., 2013). Así, según los datos del análisis transcriptómico, EBS reprimiría a genes que codifican DELLA y activaría a *BRG3*, lo que muestra la complejidad de la regulación de la dormición mediada por EBS y las cascadas de señalización de hormonas. Además en semillas, la proteína RGL2 se une directamente al promotor de *XERICO* para promover el aumento del ABA endógeno durante la germinación de esta (Piskurewicz et al., 2008). En el mutante *ebs* disminuye la expresión de *XERICO*, lo que sugiere que EBS podría estar promoviendo la síntesis de ABA a través de *XERICO* y potenciando así la dormición de semillas. Esta regulación de *XERICO* por EBS podría ser independiente de la regulación de las proteínas DELLA, ya que EBS está reprimiendo la expresión de los genes que codifican proteínas DELLA como *RGL2*, *RGL3* y *RGA*.

El análisis transcriptómico realizado con *ebs* ha revelado que genes que codifican factores de transcripción con diversos papeles en la regulación del desarrollo también presentan alteraciones en su expresión. Entre ellos hemos identificado dos genes MADS-box, *FLC* y *AGL67*, descritos previamente por su participación en la regulación de la floración y la germinación, y en la dormición de la semilla, respectivamente. *FLC* se describió inicialmente como un represor central de la floración en *Arabidopsis* que media la respuesta de vernalización (Crevillén y Dean, 2011). Recientemente se ha descrito un papel para *FLC* en la germinación (Chiang et al., 2009), mediando la respuesta de las semillas a la temperatura. Esta regulación de la germinación por *FLC* se controla en gran medida a nivel materno, y se produce en las etapas posteriores de la maduración de la semilla, regulando en último término los niveles de ABA y GA de las semillas (Chiang et al., 2009). Los niveles de *FLC* aumentan durante la maduración de la semilla, siendo máximos al final de la maduración y en la imbibición a temperatura baja, mientras que los de *FT* y *SOC1* son altos al principio de la formación de la semilla y son prácticamente nulos en semillas frescas y en imbibición (Chiang et al., 2009). Además, *FLC* promueve la degradación de ABA y la síntesis de GA, mediante la inducción de *CYP707A2*, *Ga20ox1* y *Ga3ox1* en semillas embebidas a bajas temperaturas. Igualmente *FLC* es una diana de PRC2 en semillas, y su expresión aumenta en mutantes *fie*, afectados en un componente del

complejo PRC2, lo que sugiere que *FLC* podría ser reprimido por PRC2 en respuesta a frío en la semilla (Bouyer et al., 2011), produciéndose un reemplazo de la marca H3K4me3 por H3K27me3 en su cromatina, como consecuencia de la exposición a bajas temperaturas (Müller et al., 2012). La necesidad de estratificación en frío para la salida de la dormición de semillas en *Arabidopsis*, y la observación de que *FLC* juega un papel en este proceso, ha llevado a proponer un mecanismo regulador común en semillas, para pasar de dormición a germinación, y en plantas, para la transición desde la fase vegetativa a la reproductiva, ambas mediadas por *FLC* (Bouyer et al., 2011). En los perfiles transcriptómicos de *ebs*, *FLC* aparece sobreexpresado, lo que indica que EBS reprimiría la expresión de *FLC* en semillas. Sin embargo, nuestros análisis fenotípicos muestran que los mutantes *flc* no presentan alteración de la dormición de sus semillas. Estos mismos resultados fueron reportados por Liu et al., 2011, por lo que se puede concluir que el fenotipo de reducción de la dormición de los mutantes *ebs* no está relacionado en principio con cambios en la expresión de *FLC*. Igualmente, hemos analizado el posible papel de *FT* en la regulación de la dormición, ya que EBS es necesario para la represión de este integrador floral durante el desarrollo vegetativo. Nuestros resultados muestran la ausencia de defectos en la dormición de semillas del mutante *ft*. Aunque no podemos descartar que efectos de redundancia funcional con otros miembros de la familia enmascaren el papel de *FT* en el control de este proceso, los resultados obtenidos indican que este regulador de la floración no estaría implicado en la germinación de semillas frescas de *Arabidopsis* (Fig. 45).

Por su parte, *AGL67* se ha descrito como un factor de transcripción específico de semillas con un papel central promoviendo la dormición de estas en *Arabidopsis* (Bassel et al., 2011). La expresión de *AGL67* está altamente coordinada con muchos otros genes relacionados con la dormición y su transcripción disminuye antes de la germinación (Bassel et al., 2011). Este patrón de expresión es similar al que hemos descrito en este trabajo para *EBS* (Fig. 12). Además, las semillas de mutantes *agl67* muestran una reducción de la dormición (Bassel et al., 2011), tanto en luz como en oscuridad, igual que los mutantes *ebs*, por lo que ambos genes promoverían la dormición de las semillas. Así, *AGL67* y *EBS* tienen papeles similares en el control de la dormición de semillas frescas. La relación genética de epistasia existente entre *EBS* y *AGL67* sugiere que en ausencia de un gen *AGL67* funcional, las mutaciones en *EBS* no provocan una disminución adicional de la dormición, y por ello *AGL67* sería esencial para que se manifieste el fenotipo de dormición reducida de mutantes *ebs*. Puesto que la expresión de *AGL67* disminuye en semillas de este mutante, estas observaciones son consistentes con que *EBS* actúe en la misma ruta de control de la

DISCUSIÓN

dormición que este regulador central de la dormición. Por tanto, *EBS* es necesario para regular la expresión de *AGL67* durante el periodo de dormición de la semilla, y esta proteína MADS-box a su vez, podría mediar el efecto de *EBS* sobre otros genes implicados en la regulación de la dormición de la semilla.

Nuestros experimentos de ChIP parecen evidenciar que no hay una interacción directa entre la proteína *EBS* y *AGL67*, al menos en los fragmentos genómicos estudiados, por lo que esto puede evidenciar una relación indirecta entre ellos. Dado que en floración se ha observado que *EBS* es un represor del integrador floral *FT*, la posible regulación indirecta de *AGL67* por *EBS* estaría de acuerdo con que este último reprimiera a un represor de *AGL67*. Alternativamente, *EBS* podría ejercer un papel como activador transcripcional en los procesos que regula (Figura 79). En base a nuestras observaciones, la hipótesis más plausible estaría de acuerdo con la activación indirecta de *AGL67* por *EBS*.

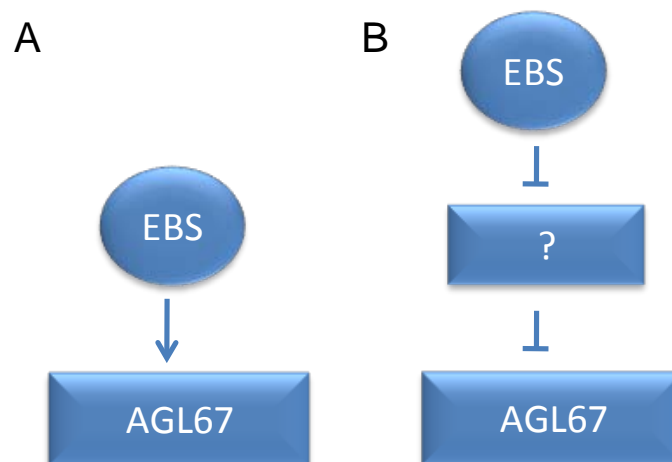


Figura 79. Posibles modelos de regulación de la expresión de *AGL67* por *EBS* A. Modelo de activación directa, donde *EBS* mediaría la regulación positiva de *AGL67*. B. Modelo de activación indirecta donde *EBS* regularía la expresión de *AGL67* a través de la represión de uno o varios intermediarios.

Algunos de los genes diferencialmente expresados en el mutante *ebs*, no se ven afectados por la pérdida de función de *AGL67*. Este es el caso de *RGL2*, *AGP31* y *At3g60520*, que además muestran un nivel de expresión similar en *ebs* y en el doble mutante *ebs agl67*, lo que sugiere que la expresión de estos tres genes estaría regulada por *EBS* de manera independiente de *AGL67*. Sin embargo, para los genes *ATS3*, *MFT*, *SCL14*, *SOM* y *ABI5*, los niveles de expresión están también alterados en el mutante *agl67*, lo que indica que este MADS box sería necesario para su correcta regulación. Serán necesarios experimentos adicionales para determinar cuáles de

esos genes desregulados en los mutantes *ebs* y *agl67* median el papel de estos dos reguladores transcripcionales sobre la dormición, así como para comprender la relación funcional existente entre *EBS* y *AGL67* en la regulación de este proceso. Estas observaciones sugieren que *AGL67* podría mediar la regulación de *EBS* sobre determinados genes, pero no sobre todos los que se encuentran desregulados en el mutante *ebs*. Por tanto, *EBS* regularía la expresión de muchos de estos genes independientemente de *AGL67*, aunque desconocemos todavía la relevancia de dichos loci en la regulación de la dormición mediada por *EBS*.

A modo de conclusión, podemos decir que todas las observaciones descritas anteriormente son consistentes con que *EBS* esté implicado en la regulación de los circuitos génicos necesarios para la regulación de la germinación durante el periodo de dormición, mediando distintos aspectos del control de este proceso en los que estarían implicados factores hormonales, ambientales y metabólicos (Figura 80).

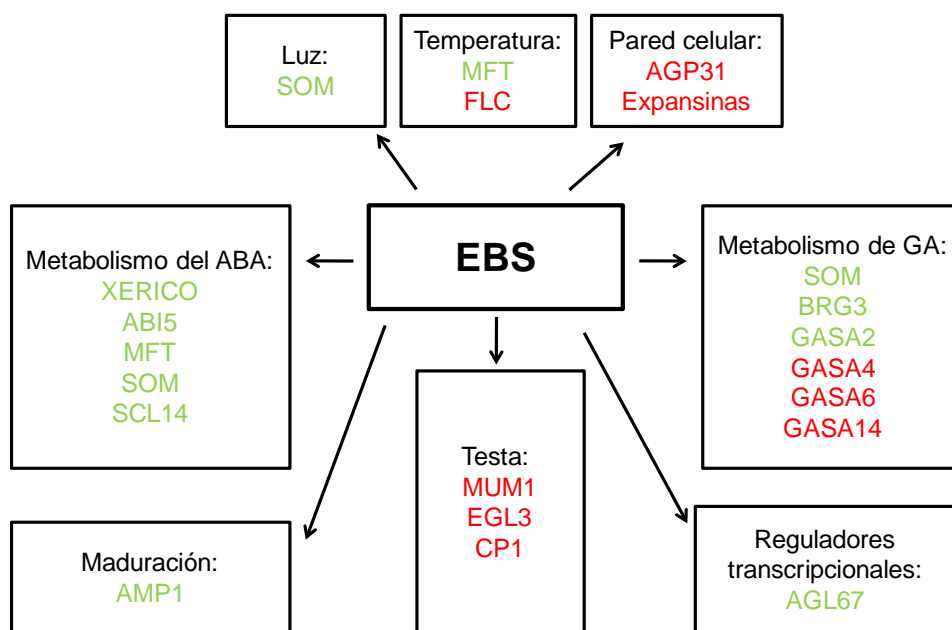


Figura 80. Regulación mediada por *EBS* de genes que participan a diferentes niveles en el control de la dormición de semillas. Se muestran los genes alterados en el análisis de perfiles transcriptómicos del mutante *ebs* que podrían explicar el fenotipo de reducción de la dormición observado en este mutante. En verde, genes inducidos por *EBS*; en rojo, genes activados por *EBS*.

Muchos de los genes implicados en el control de la dormición y la germinación de la semilla en *Arabidopsis* también participan en el control de la floración. Entre ellos, además de *EBS*, se encuentran genes relacionados con remodelación de cromatina como *HUB* y *ATX*, genes del reloj circadiano, etc., lo que podría sugerir que determinados circuitos génicos reguladores median el control de ambas

DISCUSIÓN

transiciones de fase del desarrollo en plantas. Además de los datos de perfiles globales de expresión de semillas frescas del mutante *ebs* generados en este trabajo, en nuestro laboratorio disponemos de datos transcriptómicos obtenidos con plantas de dicho mutante durante el periodo de crecimiento vegetativo que precede al inicio de la floración. La comparación de ambas bases de datos indica que el solapamiento de genes diferencialmente expresados en el mutante *ebs* durante los dos estadios de desarrollo es escaso (Fig. 35) y que, por tanto, las rutas genéticas que median el papel de EBS en la regulación de estos dos procesos de desarrollo son fundamentalmente independientes, por lo que EBS actuaría a través de circuitos génicos diferentes en ambos procesos.

Análisis de procesos de remodelación de la cromatina funcionalmente relacionados con EBS en el control de la dormición de la semilla

La proteína EBS, y su homólogo SHL, contienen un dominio PHD, responsable del reconocimiento de versiones modificadas de la histona H3, en concreto H3K4me2/3 (López-González, Tesis Doctoral, 2010). Además de EBS, diferentes factores remodeladores de la cromatina se han implicado en la regulación de la dormición de la semilla en *Arabidopsis* (Liu et al, 2007; Liu et al., 2011), y algunos de ellos desempeñan funciones relacionadas con la modulación de los niveles de dicha marca de la cromatina, que tiene un papel central en la regulación de la expresión génica en eucariotas. Por ello, analizamos la relación de EBS con otros remodeladores de la cromatina que pudieran mediar el papel de EBS en la regulación de la dormición centrándonos fundamentalmente en modificadores de la cromatina relacionados con la modulación de la marca activadora transcripcional H3K4me3, reconocida por EBS. Inicialmente estudiamos la posible relación de *EBS* con los genes HUBs, remodeladores de la cromatina descritos por participar en el control de la dormición de semillas. Las proteínas HUBs participan en la monoubiquitinación de la histona H2B, un requisito previo para la trimetilación de H3K4, y se ha demostrado que controlan la activación transcripcional de genes relacionados con el metabolismo de ABA (Liu et al., 2007). A pesar de que tanto los mutantes *hub* como *ebs* presentan fenotipo de reducción de la dormición, nuestros análisis genéticos con dobles y triples mutantes, no revelaron la existencia de relación genética entre ellos para la regulación de la dormición. Al estudiar la expresión de diversos genes desregulados en *ebs* de acuerdo con los resultados obtenidos el análisis de perfiles transcriptómicos, observamos que el nivel de expresión de los genes *At3g60520*, *AGP31*, *TSO2*, *ABI5*, *SOM*, *SCL14*, *MFT*, *AGL67* y *ATS3* en los mutantes *hub1* y *hub2* presenta la misma tendencia que

en *ebs*, lo que podría sugerir que EBS y las proteínas HUBs regulan a estos genes de manera independiente, confirmando que sus funciones son aditivas. Además, el fenotipo de menor dormición de los dobles mutantes así como del triple mutante, podría deberse al efecto aditivo que ejercen los genes HUB y EBS sobre genes descritos como reguladores de la dormición como *AGL67*, *MFT* y *ABI5*.

Al igual que *EBS*, los genes *HUB* están implicados en la regulación del tiempo de floración, y son necesarios para la expresión del represor floral *FLC*. Puesto que nuestro laboratorio está interesado en el control de otras transiciones de fase del desarrollo vegetal como la transición floral, decidimos analizar una posible interacción genética entre estos genes en la regulación del tiempo de floración. Los resultados obtenidos indican igualmente una ausencia de interacción entre *EBS* y *HUB* en el control de este proceso. Estas observaciones son consistentes con la función descrita para estos genes en la regulación del inicio de la floración, ya que mientras que las proteínas HUB son necesarias para la activación de *FLC*, EBS se requiere para reprimir la expresión de *FT*. Por tanto, las proteínas EBS y HUBs actúan en rutas genéticas independientes tanto en el control de la floración como de la dormición.

Además, analizamos posibles interacciones genéticas de *EBS* con genes que codifican proteínas remodeladoras de cromatina implicadas en la deposición de la marca epigenética H3K4me3. Por ello estudiamos la implicación de las metiltransferasas de tipo ATX, *ATX1*, *ATX2* y *ATXR7* en el control de la dormición de semillas (Fig. 57). Entre ellas, observamos que únicamente *ATXR7* está implicada en promover la dormición de semillas frescas. Estos resultados han sido confirmados por otros autores (Liu et al., 2009), quienes también mostraron datos indicativos de una reducción de la dormición de semillas frescas en mutantes *atxr7*. La utilización de dobles mutantes en este trabajo, así como el análisis de genes diferencialmente expresados en semillas del mutante *ebs* en los perfiles transcriptómicos, como *AGL67*, *MFT*, *ATS3*, *LEA*, *ABI5*, *SOM* y *TSO2*, mostró que los efectos de EBS y *ATXR7* eran aditivos. La expresión de *AGL67* y *MFT* en los dobles mutantes pone de manifiesto que estos genes podrían ser responsables del fenotipo de reducción de la dormición en estos. Igualmente analizamos la interacción de *EBS* y *ATXR7* en el control de la floración, y de nuevo observamos una regulación independiente. Por tanto, todos estos resultados permiten concluir que EBS y *ATXR7* regulan procesos del desarrollo como la dormición y la floración de manera independiente.

A pesar de que tanto las proteínas EBS como HUB1, HUB2 y *ATXR7* están implicados en mecanismos relacionados con la marca H3K4me3, y que todos ellos

DISCUSIÓN

están implicados en la regulación de la dormición de semillas frescas en *Arabidopsis*, a la vista de nuestros análisis genéticos y moleculares se puede concluir que todos ellos regulan la dormición de manera independiente a *EBS*.

Igualmente, hemos demostrado que otros remodeladores de cromatina, relacionados con la deposición de la marca H3K4me3, e implicados en floración, también participan en el control de la dormición de semillas, como es el caso de componentes del complejo Paf1 (Fig. 56). Dichas observaciones fueron corroboradas durante el transcurso de nuestro trabajo (Liu et al., 2011), revelando la función de este complejo implicado en el control de la elongación transcripcional en la dormición de la semilla,

SDG8/EFS, otro remodelador de cromatina funcionalmente relacionado con el complejo Paf1, también es necesario para la correcta regulación de la dormición ya que los mutantes *sdg8* muestran un fenotipo de reducción en la dormición de las semillas (Bassel et al., 2011; este trabajo) (Fig. 62). Con el fin de identificar posibles dianas comunes con *EBS*, hemos analizado en el mutante *sdg8* genes que se encontraron expresados diferencialmente en el análisis transcriptómico del mutante *ebs* (Fig. 63). Este análisis nos permitió comprobar que *SDG8* es necesario para la expresión de *FLC* y de *AGL67*. Esta observación es consistente con datos previos que han mostrado que el fenotipo de floración temprana presente en los mutantes *sdg8/efs* se debe a niveles de expresión reducida del represor floral *FLC* (Xu et al., 2008). Nuestros resultados muestran que este remodelador de cromatina es también necesario para la expresión de *FLC* en semilla, aunque de acuerdo con nuestras observaciones y con datos publicados (Bassel et al., 2011), es improbable que los defectos en la expresión de *FLC* en el mutante *sdg8* sean responsables de su fenotipo de dormición reducida. Puesto que *SDG8* está implicada principalmente en la deposición de H3K36me2 y H3K36me3, marcas de transcripción activa, es posible que sea necesario para establecer estas marcas en la cromatina de *FLC* y *AGL67*, para su activación. La expresión de *MFT*, por el contrario, está incrementada en *sdg8*, lo que contrasta con la función descrita para este gen en la inducción de la dormición (Vaistij et al., 2013). Puesto que *SDG8* está implicado en la deposición de marcas activadoras de la transcripción en la cromatina de sus genes diana, es posible que *MFT* no sea una diana directa de *SDG8* y que el cambio en la expresión de *MFT* observado en el mutante *sdg8* esté mediado por la actividad de otros genes. Alternativamente, se ha descrito que *SDG8* actúa sinérgicamente con *PRC2* en la represión de genes de maduración de semilla (Tang et al., 2012), y podría ocurrir que un mecanismo similar

mediara la represión de *MFT* por *SDG8* en la semilla fresca de *Arabidopsis*. Serán necesarios estudios adicionales para confirmar la existencia de este mecanismo de regulación.

El estudio de la relación genética entre *SDG8* y *EBS* mediante el uso de dobles mutantes *ebs sdg8* reveló que la falta de función conjunta de estos dos remodeladores suprime sus efectos en dormición, de manera que el doble mutante presenta una dormición similar a las semillas del tipo silvestre. Además, los mutantes *ebs sdg8* presentaban un nivel de expresión de *AGL67* más elevado que el detectado en los mutantes sencillos, por lo que la pérdida de función de *SDG8* y *EBS* restaura los niveles de expresión de *AGL67*, a los detectados en semillas del tipo silvestre (Fig. 65). Estas observaciones son consistentes con que *AGL67* medie el fenotipo de reducción de la dormición observado en ambos mutantes. Se requerirán experimentos adicionales para determinar la base molecular de la interacción entre *EBS* y *SDG8* en el control de la dormición de la semilla de *Arabidopsis*.

Puesto que diversos aspectos de la reorganización de la cromatina relacionados con la deposición y el reconocimiento de residuos metilados de la histona H3 parecen desempeñar un papel esencial en la regulación de la dormición, decidimos analizar si otras actividades de remodelación de la cromatina podrían también estar implicadas en este proceso. Analizamos mutantes de componentes del complejo SWR1, que cataliza el intercambio de la histona H2A por la variante histónica H2A.Z y que es necesario para la correcta regulación del tiempo de floración y de la regulación de *FLC* en *Arabidopsis* (Choi et al., 2007; March-Díaz y Reyes, 2009). También analizamos mutantes afectados en los genes *ELF6* y *JMJ4*, que participan junto a *EBS* en el control de la expresión de *FT* para regular la transición floral, demetilando residuos metilados de H3K4me3 en la cromatina de este locus (Jeong et al., 2009; López-González, 2010. Tesis doctoral). Los resultados que hemos obtenido indican que en nuestras condiciones experimentales estos complejos de remodelación de la cromatina no afectan a la regulación de la dormición, lo que demuestra que sólo determinados procesos de remodelación de cromatina participan en la regulación de este proceso de desarrollo, lo que implica una especificidad en la regulación de la dormición.

Todas estas observaciones nos permiten concluir que la remodelación de cromatina tiene un papel central en la regulación de la dormición, aunque determinados mecanismos tienen un impacto más notable sobre el control de este proceso.

Identificación de nuevos factores potencialmente implicados en la regulación de la dormición de la semilla

La participación de nuestro grupo durante la realización de este trabajo en el proyecto TRANSPLANTA nos ha permitido acometer la identificación de nuevos genes implicados en el control de la dormición de semillas de *Arabidopsis*. Para ello, hemos utilizado una herramienta desarrollada en dicho proyecto consistente en una colección de plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan factores de transcripción en respuesta a la inducción por β -estradiol. Después de realizar diferentes pruebas de optimización de los ensayos, determinamos que una concentración de β -estradiol de 10 μ M era adecuada para la inducción de los factores de transcripción (FT) en semillas frescas de *Arabidopsis*. Con el fin de identificar FT potencialmente implicados en la regulación de la dormición, las semillas recién cosechadas de líneas capaces de sobreexpresar FT individuales en presencia del agente inductor fueron sometidas a diferentes condiciones de iluminación (luz y oscuridad), y de temperatura (22°C y 16°C), para observar su fenotipo de dormición.

De las 839 líneas analizadas correspondientes a 327 FT diferentes, identificamos 26 FT potencialmente relacionados con el control de la dormición. Entre estos identificamos 16 FTs cuya sobreexpresión confería una reducción de la dormición en condiciones de luz y 22°C (condición 1), 12 FTs lo hacían en condiciones de oscuridad y 22°C (condición 2), y 6 FTs cuya sobreexpresión provocaba alteraciones en la dormición en condiciones de luz y 16°C (condición 3). De los FT identificados a 22°C, 8 fueron comunes en luz y oscuridad.

Por limitaciones de tiempo, en este trabajo hemos iniciado la caracterización funcional de dos FT identificados como reguladores de la dormición de semillas frescas: *COL9*, identificado en las condiciones experimentales de rastreo 1 y 2, y *SCL30*, identificado en la condición experimental 3. Ninguno de estos dos genes se habían relacionado previamente con la regulación de la dormición, lo que confirma la utilidad de la colección de plantas generadas en el proyecto TRANSPLANTA para identificar nuevos componentes reguladores del proceso de la dormición de semilla, así como de otros procesos biológicos.

COL9 se había identificado previamente como un represor de la floración perteneciente a la familia de factores CO-LIKE (Cheng y Wang, 2005). De hecho, al analizar la floración de las líneas sobreexpresoras de *COL9* en respuesta a β -estradiol generadas en el proyecto TRANSPLANTA, observamos un retraso de la floración

respecto a las líneas silvestres. Nuestros resultados han revelado un papel de *COL9* como represor de la dormición de semillas. El hecho de que se obtuvieran resultados similares con las dos líneas sobreexpresoras independientes de *COL9* existentes en la colección TRANSPLANTA, corrobora el papel de *COL9* en el control de la dormición, tanto en condiciones de luz como de oscuridad. El estudio del fenotipo del mutante *col9* mostró que este no presenta alteraciones significativas en la respuesta de dormición, lo cual podría deberse a la existencia de redundancia funcional de *COL9* con otros miembros de la familia de CO. En el futuro se requerirán estudios adicionales que permitan desvelar el modo de participación de *COL9*, y de otros genes CO-LIKE, en la represión de la dormición, así como los genes diana sobre los que actúan para mediar dicha regulación.

Por su parte, *SCL30* fue identificado como otro FT cuya sobreexpresión confiere un aumento de la dormición de las semillas en condiciones de 16°C, lo que evidencia un papel de *SCL30* en regulación de la dormición. Esta reducción de la germinación se observó en todas las líneas disponibles para este FT en el proyecto TRANSPLANTA y está presente incluso en ausencia de β -estradiol (Fig. 74). Por ello, decidimos generar líneas transgénicas adicionales que expresaran constitutivamente *SCL30*, así como su homólogo más cercano *SCL11* (Fig. 75). Los resultados obtenidos corroboraron que tanto la sobreexpresión de *SCL30* como de *SCL11*, conllevaban una disminución de los niveles de germinación de semillas frescas (Fig. 76), por lo que se puede concluir que ambos factores se requieren para la modulación de la dormición. *SCL30* pertenece a la familia de proteínas SCR, donde otros miembros, como *SCL3*, *SCL13* y *SCL14* han sido implicados en el control hormonal de la regulación de la dormición de semillas (Torres-Galea et al., 2006; Bassel et al., 2011; Zhang et al., 2011). Por ello, sería interesante analizar si *SCL30* pudiera estar relacionado con la ruta hormonal mediada por GA y ABA en el control de la dormición de semillas. Además, estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Salomé Prat (CNB, Madrid) han mostrado una interacción entre *SCL30* y *SCL11* con *RGL2* mediante aproximaciones de doble híbrido (no mostrado), lo que sugiere que estas proteínas SCL podrían regular conjuntamente con *RGL2* la respuesta de dormición en la semilla. Observaciones previas han demostrado que otros miembros de la familia SCL como *SCL3*, implicado en el control de la germinación de semillas, interacciona con *RGA*, (Zhang et al., 2010), posiblemente antagonizando el papel de las proteínas DELLA en este proceso.

DISCUSIÓN

El análisis del fenotipo de germinación mostrado por semillas de mutantes *scl11* y *scl30* y del doble *scl11scl30* no reveló diferencias significativas en los niveles de dormición, con respecto al silvestre. Este resultado podría explicarse por una posible redundancia funcional de los factores *SCL30* y *SCL11* con otros miembros de la familia como *SCL3* como represores de la germinación durante la dormición. Serán necesarios análisis adicionales para profundizar en la función de las proteínas SCL en el control de la dormición, y concluir si la interacción con las proteínas DELLA podría modular la dormición de la semilla. Sin embargo, los datos obtenidos hasta ahora en la caracterización preliminar de estos factores confirman que la colección de plantas que sobreexpresan condicionalmente FT de *Arabidopsis* es una herramienta poderosa para la caracterización funcional de reguladores transcripcionales. De hecho, los análisis realizados hasta ahora han abierto una vía de investigación con enormes posibilidades para profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la dormición de la semilla.

CONCLUSIONES



Hemos abordado la regulación de la dormición analizando el papel de diversos reguladores transcripcionales relacionados con mecanismos mediados por reorganización de la cromatina, y en particular EBS, pero también identificando nuevos FT con un posible papel en el control de este proceso. Los resultados que hemos obtenido confirman que los procesos de remodelación de la cromatina son esenciales para el control de la dormición, y entre ellos, los complejos donde participa EBS tienen un papel central en dicha regulación y podrían actuar a varios niveles en las rutas que controlan este proceso. Asimismo hemos abierto una nueva vía para la caracterización molecular de este proceso, aislando diversos FT cuyo estudio será relevante para establecer su implicación en el control de la dormición.

1. EBS actúa como un represor de la germinación durante la dormición de semillas frescas de *Arabidopsis*, que promueve la dormición en respuesta a luz y temperatura. Además EBS reprime la germinación en semillas post-maduras.
2. EBS se expresa durante todo el desarrollo de la semilla, y su expresión disminuye durante la germinación, independientemente de la adición de hormonas como GA y ABA.
3. SHL, homólogo a EBS, también se expresa durante todo el desarrollo de la semilla, y desempeña funciones parcialmente redundantes con EBS en el control de la dormición de semillas frescas.
4. La sobreexpresión de *EBS* durante la imbibición de la semilla es suficiente para reducir el nivel de dormición de semillas frescas y por tanto, la función de EBS en promover la dormición es necesaria al menos tras el desarrollo de la semilla en la silicua.
5. Entre los genes desregulados en los mutantes *ews* y *spt* y que podrían explicar a nivel molecular el defecto en dormición observado, encontramos algunos que median procesos como la hidrólisis de componentes de la pared y con la expansión celular, así como genes relacionados con la respuesta a ABA y GAs.
6. *EBS* es necesario para regular la expresión de *AGL67* durante el periodo de dormición de la semilla, y esta proteína MADS-box a su vez, podría mediar el efecto de *EBS* sobre otros genes implicados en la regulación de la dormición de la semilla.

CONCLUSIONES

7. La comparación de perfiles transcriptómicos del mutante *ebs* en dos estadios diferentes del desarrollo de la planta, en semilla fresca y en planta en crecimiento vegetativo, indica que la regulación ejercida por *EBS* sobre estos procesos es independiente, actuando a través de circuitos génicos diferentes.
8. *EBS* regula importantes procesos del desarrollo, como la dormición de semillas frescas y la floración, de manera independiente a como lo hacen otros modificadores de la cromatina relacionados también con la marca H3K4me3 como HUB1, HUB2 y ATX7. Además el PAF1-C también participa en la regulación de la dormición.
9. *SDG8*, remodelador de cromatina funcionalmente relacionado con el complejo Paf1, también es necesario para la correcta regulación de la dormición. El estudio de la relación genética entre *SDG8* y *EBS* reveló que la falta de función conjunta de estos dos remodeladores de cromatina suprime sus efectos en dormición, de manera que el doble mutante presenta una dormición similar a las semillas del tipo silvestre. Además, los mutantes *ebs sdg8* presentaban un nivel de expresión de *AGL67* más elevado que el detectado en los mutantes sencillos, por lo que la pérdida de función de *SDG8* y *EBS* restaura los niveles de expresión de *AGL67*, a los detectados en semillas del tipo silvestre. Estas observaciones son consistentes con que *AGL67* medie el fenotipo de reducción de la dormición observado en ambos mutantes.
10. En la colección de líneas de sobreexpresión de FT generadas en el proyecto Transplanta hemos identificado 26 factores de transcripción como potenciales implicados en la dormición de semillas frescas. La caracterización preliminar de la función de dos de ellos, *COL9* y *SCL30*, ha revelado su implicación en la regulación de la germinación de semillas frescas.

BIBLIOGRAFÍA



- Aalfs, J. D.; Kingston, R. E.** (2000). What does 'chromatin remodeling' mean? Trends in biochemical sciences. 25(11):548-555.
- Adamski, N.M.; Anastasiou, E.; Eriksson, S.; O'Neill, C.M.; Lenhard, M.**(2009). Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.106(47):20115-20.
- Ahn, Y.O.; Shimizu, B.; Sakata, K.; Gantulga, D.; Zhou, C.; Bevan, D.R.; Esen, A.** (2010). Scopolin-hydrolyzing beta-glucosidases in roots of Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 51(1):132-43.
- Akamatsu, T.; Hanzawa, Y.; Ohtake, Y.; Takahashi, T.; Nishitani, K.; Komeda, Y.** (1999). Expression of endoxyloglucan transferase genes in acaulis mutants of Arabidopsis. Plant Physiol. 121(3):715-22.
- Alboresi, A.; Gestin, C.; Leydecker, M.T.; Bedu, M.; Meyer, C.; Truong, H.N.** (2005). Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. Plant Cell Environ. 28:500-512.
- Ali-Rachedi, S.; Bouinot, D.; Wagner, M.H.; Bonnet, M.; Sotta, B. et al.**(2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of Arabidopsis thaliana. Planta. 219:479-88.
- Alonso-Blanco, C.; Bentsink, L.; Hanhart, C.J.; Blankestijn-de Vries, H.; Koornneef, M.**(2003). Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of Arabidopsis thaliana. Genetics. 164(2):711-29.
- Alvarez-Venegas, R.** (2010). Regulation by polycomb and trithorax group proteins in Arabidopsis. The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists. 8:e0128.
- Alvarez-Venegas, R.; Avramova, Z.** (2005). Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive Arabidopsis genes and in atx1 mutants. Nucleic Acids Res. 33:5199-5207.
- Alvarez-Venegas, R.; Pien, S.; Sadler, M.; Witmer, X.; Grossniklaus, U.; Avramova, Z.** (2003). ATX-1, an Arabidopsis homolog of trithorax, activates flower homeotic genes. Current biology. 13(8):627-637.
- Andrés, F.; Coupland, G.** (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. Nature Reviews Genetics. 13(9):627-639.
- Arc, E.; Galland, M.; Godin, B.; Cueff, G.; Rajjou, L.** Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. Frontiers in plant science. 4(346).
- Arc, E.; Sechet, J.; Corbineau, F.; Rajjou, L.; Marion-Poll, A.** (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. Frontiers in plant science. 4(63).
- Ariizumi, T.; Hauvermale, A.; Nelson, S.; Hanada, A.; Yamaguchi, S.; Steber, C.** (2013). Lifting DELLA repression of Arabidopsis seed germination by non-proteolytic GA signaling. Plant physiology. 162(4):2125-39.
- Ariizumi, T.; Steber, C.** (2007). Seed germination of GA-insensitive sleepy1 mutants does not require RGL2 protein disappearance in Arabidopsis. The Plant cell. 19(3):791-804.
- Ariizumi, T.; Murase, K.; Sun, T.P.; Steber, C.M.** (2008). Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. Plant Cell. 20(9):2447-59.
- Arsovski, A.; Haughn, G.; Western, T.** (2010). Seed coat mucilage cells of Arabidopsis thaliana as a model for plant cell wall research. Plant signaling & behavior. 5(7):796-801.
- Arsovski, A.; Villota, M.; Rowland, O.; Subramaniam, R.; Western, T.** (2009). MUM ENHANCERS are important for seed coat mucilage production and mucilage secretory cell differentiation in Arabidopsis thaliana. Journal of experimental botany. 60(9):2601-2612.

BIBLIOGRAFÍA

- Aubert, D.; Chevillard, M.; Dorne, A.M.; Arlaud, G.; Herzog, M.** (1998). Expression patterns of GASA genes in *Arabidopsis thaliana*: the GASA4 gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant. Mol. Biol.* 36:871–883.
- Avranova, Z.** (2009). Evolution and pleiotropy of trithorax function in *Arabidopsis*. *Int. J. Dev. Biol.* 53(2-3):371-81.
- Bailly, C.** (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. 14(02):93-107.
- Bailly, C.; El-Maarouf-Bouteau, H.; Corbineau, F.** (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331:806–814.
- Barrero, J.M.; Millar, A.A.; Griffiths, J.; Czechowski, T.; Scheible, W.R.; Udvardi, M.; Reid, J.B.; Ross, J.J.; Jacobsen, J.V.; Gubler, F.** (2010). Gene expression profiling identifies two regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Journal*. 61:611–622.
- Barua, D.; Butler, C.; Tisdale, T.E.; Donohue, K.** (2011). Natural variation in germination responses of *Arabidopsis* to seasonal cues and their associated physiological mechanisms. *Annals of Botany*. 109.
- Baskin, C.C.; Baskin, J.M.** (1998). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, Academic Press.
- Baskin, J.M.; Baskin, C.C.** (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14:1–16.
- Bassel, G. W.; Mullen, R. T.; Bewley, J. D.** (2006). ABI3 expression ceases following, but not during, germination of tomato and *Arabidopsis* seeds. *Journal of experimental botany*. 57(6):1291-1297.
- Bassel, G.; Lan, H.; Glaab, E.; Gibbs, D.; Gerjets, T.; Krasnogor, N.; Bonner, A.; Holdsworth, M.; Provart, N.** (2011). Genome-wide network model capturing seed germination reveals coordinated regulation of plant cellular phase transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(23):9709-9714.
- Baumbusch, L.O.; Thorstensen, T.; Krauss, V.; Fischer, A.; Naumann, K.; Assalkhou, R.; Schulz, I.; Reuter, G.; Aalen, R.B.** (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. *Nucleic Acids Res.* 29:4319–4333.
- Bazin, J.; Langlade, N.; Vincourt, P.; Arribat, S.; Balzergue, S.; El-Maarouf-Bouteau, H., et al.** (2011). Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *Plant Cell*. 23:2196–2208.
- Beaudoin, N.; Serizet, C.; Gosti, F.; Giraudat, J.** (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell*. 12(7):1103–1116.
- Beligni, M.V.; Lamattina, L.** (2000). Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyle elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*. 210:215–221.
- Bentsink, L.; Hanson, J.; Hanhart, C.J.; Blankestijn-de Vries, H.; Coltrane, C.; Keizer, P.; El-Lithy, M.; Alonso-Blanco, C.; de Andrés, M.T.; Reymond, M.; van Eeuwijk, F.; Smeeckens, S.; Koornneef, M.** (2010). Natural variation for seed dormancy in *Arabidopsis* is regulated by additive genetic and molecular pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(9):4264-4269.
- Bentsink, L.; Jowett, J.; Hanhart, C. J.; Koornneef, M.** (2006). Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(45):17042-17047.
- Bentsink, L.; Koornneef, M.** (2008). Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, 6.

- Bentsink, L.; Soppe, W.; Koornneef, M.** (2007). Genetics aspects of seed dormancy. In KJ Bradford, H Nonogaki, eds, *Seed Development, Dormancy and Germination*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 113–127.
- Berger, N.; Dubreucq, B.; Roudier, F.; Dubos, C.; Lepinsiec, L.** (2010). Transcriptional regulation of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 involves RLE, a cis-element that regulates trimethylation of histone H3 at lysine-27. *The Plant cell*. 23(11):4065-4078.
- Berger, S.L.** (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447:407–412.
- Bernatzky, R.; Tanksley, S.D.** (1986). Toward a Saturated Linkage Map in Tomato Based on Isozymes and Random CDNA Sequences. *Genetics*. 112(4):887-898.
- Berr, A.; McCallum, E. J.; Alioua, A.; Heintz, D.; Heitz, T.; Shen, W. H.** (2010). Arabidopsis histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant physiology*. 154(3):1403-1414.
- Berr, A.; Shafiq, S.; Shen, W.** (2011). Histone modifications in transcriptional activation during plant development. *Biochimica et biophysica acta*. 1809(10):567-576.
- Berr, A.; Xu, L.; Gao, J.; Cognat, V.; Steinmetz, A.; Dong, A.; Shen, W.** (2009). SET DOMAIN GROUP25 encodes a histone methyltransferase and is involved in FLOWERING LOCUS C activation and repression of flowering. *Plant physiology*. 151(3):1476-1485.
- Bethke, P.C.; Libourel, I. G.; Jones, R.L.** (2006). Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 57:517–526.
- Bethke, P.C.; Libourel, I.G.; Aoyama, N.; Chung, Y.Y.; Still, D.W.; Jones, R.L.** (2007). The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol.* 143:1173–1188.
- Bethke, P.C.; Gubler, F.; Jacobsen, J.V.; Jones, R.L.** (2004). Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta*. 219(5):847-55.
- Bewley, J.** (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*. 9:1055-1066.
- Bewley, J.D.; Black, M.** (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. Plenum Press, New York.
- Boesewinkel, F. D.; Bouman, F.** (1984). "The seed: structure." *Embryology of angiosperms*. Springer Berlin Heidelberg 567-610.
- Bolsrad, B.M.; Irizarry, R.A.; Astrand, M.; Speed, T.P.** (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 19(2):185-93.
- Bolstad, B.M.; Irizarry, R.A.; Astrand, M.; Speed, T.P.** (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 19(2):185-93.
- Bouman, F.** (1975). Integument initiation and testa development in some Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 70(3):213-229.
- Bouyer, D.; Roudier, F.; Heese, M.; Andersen, E.; Gey, D.; Nowack, M.; Goodrich, J.; Renou, J.; Grini, P.; Colot, V.; Schnittger, A.** (2011). Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS genetics*. 7, 3.
- Bove, J.; Lucas, P.; Godin, B.; Oge L.; Jullien, M.; Grappin, P.** (2005). Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signalling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana glauca*. *Plant Molecular Biology*. 57:593–612.
- Bowen, A.J.; Gonzalez, D.; Mullins, J.G.L.; Bhatt, A.M.; Martinez, A.; Conlan, R.S.** (2010). PAH-domain-specific interactions of the Arabidopsis transcription coregulator SIN3-LIKE1 (SNL1) with

BIBLIOGRAFÍA

- telomere-binding protein 1 and ALWAYS EARLY2 Myb-DNA binding factors. *J. Mol. Biol.* 395:937–949.
- Brand, L.; Hörler, M.; Nüesch, E.; Vassalli, S.; Barrell, P.; Yang, W.; Jefferson, R.A.; Grossniklaus, U.; Curtis, M.D.** (2006). A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141(4):1194-204.
- Bratzel, F.; Lopez-Torrejon, G.; Koch, M.; Del Pozo, J.C.; Calonje, M.** (2010). Keeping cell identity in *Arabidopsis* requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr. Biol.* 20:1853-1859.
- Buer, C.; Djordjevic, M.** (2009). Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany.* 60(3):751–763.
- Cadman, C.; Toorop, P.; Hilhorst, H.; Finch-Savage, W.** (2006). Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 46(5):805-822.
- Cao, D.; Hussain, A.; Cheng, H.; Peng, J.** (2005). Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin independent seed germination in *Arabidopsis*. *Planta.* 223:105–113.
- Cao, Y.; Dai, Y.; Cui, S.; Ma, L.** (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS C regulates flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant cell.* 20(10):2586-2602.
- Carrera, E.; Holman, T.; Medhurst, A.; Dietrich, D.; Footitt, S.; Theodoulou, F.L.; Holdsworth, M.J.** (2008). Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 53:214–224.
- Carrera, E.; Holman, T.; Medhurst, A.; Peer, W.; Schmutz, H.; Footitt, S.; Theodoulou, F.L.; Holdsworth, M.J.** (2007). Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiol.* 143(4):1669–1679.
- Castillejo, C.; Pelaz, S.** (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Curr Biol.* 9;18(17):1338-43.
- Chapman, E.J.; Estelle, M.** (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Genet.* 43:265–285.
- Chen, L. T.; Luo, M.; Wang, Y. Y.; Wu, K.** (2010). Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. *Journal of experimental botany.* 61(12):3345-3353.
- Chen, L.; Wu, K.** (2010). Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant signaling & behavior.* 5(10):1318-1320.
- Cheng, X.; Wang, Z.** (2005). Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 43(5):758-768.
- Chiang, G.; Barua, D.; Kramer, E.; Amasino, R.; Donohue, K.** (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106(28):11661-11666.
- Chiang, G.C.; Bartsch, M.; Barua, D.; Nakabayashi, K.; Debieu, M.; Kronholm, I.; Koornneef, M.; Soppe, W.J.J.; Donohue, K.; De Meaux, J.** (2011). DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Ecol.* 20:3336–3349.
- Chibani, K.; Ali-Rachedi, S.; Job, C.; Job, D.; Jullien, M.; Grappin, P.** (2006). Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology.* 142:1493–1510.
- Chiwocha, S.D.S.; Cutler, A.J.; Abrams, S.R.; Ambrose, S.J.; Yang, J.; Ross, A.R.S.; Kermode, A.R.** (2005). The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and

- gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J.* 42(1):35–48.
- Cho, J.; Ryu, J.; Jeong, Y.; Park, J.; Song, J.; Amasino, R.; Noh, B.; Noh, Y.** (2012). Control of seed germination by light-induced histone arginine demethylation activity. *Developmental cell.* 22(4):736-748.
- Choi, K.; Park, C.; Lee, J.; Oh, M.; Noh, B.; Lee, I.** (2007). Arabidopsis homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development.* 134(10):1931-41.
- Clough, S.; Bent, A.** (2000). Vapor-phase sterilization of Arabidopsis seed. 2006—03—17] <http://plantpath.wise.edu/afb/vapster.htm>.
- Clough, S.J.; Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant Journal.* 16(6):735-43.
- Coego, A.; Brizuela, E.; Castillejo, P.; Ruiz, S.; Koncz, C.; del Pozo, J.C.; Piñeiro, M.; Jarillo, J.A.; Paz-Ares, J.; León, J.; The TRANSPLANTA Consortium.** (2014). The TRANSPLANTA Collection of Arabidopsis Lines: A resource for Functional Analysis of Transcription Factors based on their conditional overexpression. *The Plant Journal.* Online.
- Comai, L.; Harada, J.J.** (1990). Transcriptional activities in dry seed nuclei indicate the timing of the transition from embryogeny to germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2671-2674.
- Courey, A. J.; Jia, S.** (2001). Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes & development.* 15(21):2786-2796.
- Covington, M.F.; Maloof, J.N.; Straume, M.; Kay, S.A.; Harmer, S.L.** (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.* 9:R130.
- Crevillén, P.; Dean, C.** (2011). Regulation of the floral repressor gene FLC: the complexity of transcription in a chromatin context. *Current opinion in plant biology.* 14: 38-44.
- Crevillén, P.; Sonmez, C.; Wu, Z.; Dean, C.** (2013). A gene loop containing the floral repressor FLC is disrupted in the early phase of vernalization. *EMBO J.* 32(1):140-8.
- Curaba, J.; Moritz, T.; Blervaque, R.; Parcy, F.; Raz, V.; Herzog, M.; Vachon, G.** (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136:3660–3669.
- Curtis, M.; Grossniklaus, U.** (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology.* 133(2):462-469.
- Da Silva, E.A.A.; Toorop, P.E.; van Aelst, A.C.; Hilhorst, H.W.M.** (2004). Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta.* 220:251–261.
- Davière, J. M.; de Lucas, M.; Prat, S.** (2008). Transcriptional factor interaction: a central step in DELLA function. *Current opinion in genetics & development.* 18(4):295-303.
- De Napolés, M.; Mermoud, J.E.; Wakao, R.; Tang, Y. A.; Endoh, M.; Appanah, R.; Nesterova, T.B.; Silva, J.; Otte, A.P.; Vidal, M.; Koseki, H.; Brockdorff, N.** (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell.* 7:663-676.
- Dean Rider, S. Jr.; Henderson, J.T.; Jerome, R.E.; Edenberg, H.J.; Romero-Severson, J.; Ogas, J.** (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by PICKLE during germination in Arabidopsis. *Plant J.* 35(1):33-43.
- Debeaujon, I.; Lepiniec, L.; Pourcel, L.; Routaboul, J.M.** (2007). Seed coat development and dormancy. *Seed Development, Dormancy and Germination*, eds Bradford K, Nonogaki H (Blackwell, Oxford, UK), pp 25–43.

BIBLIOGRAFÍA

- Debeaujon, I.; Koornneef, M.** (2000). Gibberellin requirement for Arabidopsis seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol.* 122(2):415-24.
- Debeaujon, I.; Léon-Kloosterziel, K.M.; Koornneef, M.** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122(2):403-14.
- Derkacheva, M.; Steinbach, Y.; Wildhaber, T.; Mozgová, I.; Mahrez, W.; Nanni, P.; Bischof, S.; Gruissem, W.; Hennig, L.** (2013). Arabidopsis MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *EMBO J.* 32(14):2073-85.
- Derkx, M.P.M.; Karszen, C.M.** (1993). Changing sensitivity to light and nitrate but not to gibberellins regulates seasonal dormancy patterns in *Sisymbrium officinale* seeds. *Plant Cell Environ.* 16:469-479.
- Derkx, M.P.M.; Vermeer, E.; Karszen, C.M.** (1994). Gibberellins in seeds of *Arabidopsis thaliana*: Biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. *Plant Growth Regul.* 15:223-234.
- Dill, A.; Jung, H-S.; Sun, T-P.** (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:14162-14167.
- Dodd, A.N.; Salathia, N.; Hall, A.; Kévei, E.; Tóth, R.; Nagy, F.; Hibberd, J.M.; Millar, A.J.; Webb, A.A.** (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science.* 309:630-633.
- Donohue, K.; Dorn, L.; Griffith, C.; Kim, E.; Aguilera, A.; Polisetty, C.R.; Schmitt, J.** (2005). Environmental and genetic influences on the germination of *Arabidopsis thaliana* in the field. *Evolution.* 59:740-757.
- Donohue, K.; Heschel, M. S.; Chiang, G. C.; Butler, C. M.; Barua, D.** (2007). Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant, cell & environment.* 30(2):202-212.
- Donohue, K.; Heschel, M.S.; Butler, C.M.; Baura, D.; Sharrock, R.A.; Whitelam, G.C.; Chiang, G.C.** (2008). Diversification of phytochrome contribution to germination as a function of seed-maturation environment. *New Phytologist.* 177:367-379.
- Dover, J.; Schneider, J.; Tawiah-Boateng, M.; Wood, A.; Dean, K.; Johnston, M.; Shilatifard, A.** (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *Journal Biol Chem.* 277(32):28368-71.
- EI-Maarouf-Bouteau, H.; Bailly, C.** (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal. Behav.* 3:175-182.
- EI-Maarouf-Bouteau, H.; Meimoun, P.; Job, C.; Job, D.; Bailly, C.** (2013). Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science.* 4, 77.
- Farrona, S.; Coupland, G.; Turck, F.** (2008). The impact of chromatin regulation on the floral transition. In *Seminars in cell & developmental biology.* Academic Press. 19(6):560-573.
- Feinbaum, R.L.; Storz, G.; Ausubel, F.M.** (1991). High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Mol Gen Genet.* 226(3):449-56.
- Feinberg, A.P.; Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132(1):6-13.
- Feurtado, J.; Huang, D.; Wicki-Stordeur, L.; Hemstock, L.; Potentier, M.; Tsang, E.; Cutler, A.** (2011). The Arabidopsis C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *The Plant cell.* 23(5):1772-1794.
- Finch-Savage, W.; Leubner-Metzger, G.** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *The New phytologist.* 171(3):501-523.

- Finch-Savage, W.E.; Cadman, C.S.; Toorop, P.E.; Lynn, J.R.; Hilhorst, H.W.** (2007). Seed dormancy release in *Arabidopsis* Cvi by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant Journal*. 51:60–78.
- Finkelstein, R.; Reeves, W.; Ariizumi, T.; Steber, C.** (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annual review of plant biology*. 59:387-415.
- Finkelstein, R.; Wang, M.; Lynch, T.; Rao, S.** (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an *APETALA2* domain protein. *The Plant Cell*. 10:1043–1054.
- Finkelstein, R.R.** (1994). Mutations at 2 New *Arabidopsis* ABA Response Loci Are Similar to the *Abi3* Mutations. *Plant J*. 5:765–771.
- Finkelstein, R.R.; Somerville, C.R.** (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology*. 94:1172–1179.
- Fischle, W.; Wang, Y.; Allis, C. D.** (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*, 15(2):172-183.
- Flintham, J. E.** (2000). Different genetic components control coat-imposed and embryo-imposed dormancy in wheat. *Seed Science Research*. 10(1):43-56.
- Focks, N.; Sagasser, M.; Weisshaar, B.; Benning, C.** (1999). Characterization of *tt15*, a novel transparent testa mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*. 208(3):352-7.
- Fode, B.; Siensen, T.; Thurow, C.; Weigel, R.; Gatz, C.** (2008). The *Arabidopsis* GRAS protein *SCL14* interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *The Plant cell*. 20(11):3122-3135.
- Footitt, S.; Douterelo-Soler, I.; Clay, H.; Finch-Savage, W.** (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(50):20236-20241.
- Footitt, S.; Huang, Z.; Clay, H.; Mead, A.; Finch-Savage, W.** (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 74(6):1003-1015.
- Franklin, K.A.; Quail, P.H.** (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J. Exp. Bot.* 61(1):11-24.
- Fransz, P.; de Jong, H.** (2011). From nucleosome to chromosome: A dynamic organization of genetic information. *Plant J*. 66:4–17.
- Frey, A.; Godin, B.; Bonnet, M.; Sotta, B.; Marion-Poll, A.** (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca*. *Planta*. 218(6): 958-964.
- Frey-Wyssling, A.** (1976). *The plant cell wall*. No. Ed. 3. Gebrüder Borntraeger.
- Fujii, H.; Zhu, J.K.** (2009). *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 106, 8380–8385.
- Gabriele, S.; Rizza, A.; Martone, J.; Circelli, P.; Costantino, P.; Vittorioso, P.** (2010). The Dof protein *DAG1* mediates *PIL5* activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 61(2):312-323.
- Gallego-Bartolomé, J.; Minguet, E.; Marín, J. Prat, S; Blázquez, M.; Alabadí, D.** (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between *DELLA* proteins in *Arabidopsis*. *Molecular biology and evolution*. 27(6):1247-1256.

BIBLIOGRAFÍA

- Gao, H.; Brandizzi, F.; Benning, C.; Larkin, R.M.** (2008). A membrane-tethered transcription factor defines a branch of the heat stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(42):16398-403.
- Gentry, M.; Hennig, L.**(2014). Remodelling chromatin to shape development of plants. *Exp. Cell Res.* 321(1):40-6.
- Ghassemian, M.; Nambara, E.; Cutler, S.; Kawaide, H.; Kamiya, Y.; McCourt, P.**(2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *PlantCell.* 12(7):1117–1126
- Giraudat, J.; Hauge, B.M.; Valon, C.; Smalle, J.; Parcy, F.; Goodman, H.M.** (1992). Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4:1251–1261.
- Godfray, H.; Beddington, J.; Crute, I.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.; Pretty, J.; Robinson, S.; Thomas, S.; Toulmin, C.** (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science.* 327(5967):812-818.
- Gomez-Mena, C.; Piñeiro, M., Franco-Zorrilla, J.M.; Salinas, J; Coupland, G.; Martínez-Zapater, J.M.** (2001). Early bolting in short days: An *Arabidopsis* Mutation That Causes Early Flowering and Partially Suppresses the Floral Phenotype of leafy. *The Plant Cell.* 13:1011–1024.
- González, A.; Mendenhall, J.; Huo, Y.; Lloyd, A.** (2009). TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation. *Dev. Biol.* 325:412–421.
- González-Guzman, M.; Pizzio, G. A.; Antoni, R.; Vera-Sirera, F.; Merilo, E.; Bassel, G. W.; Rodriguez, P. L.** (2012). *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *The Plant Cell Online.* 24(6):2483-2496.
- Goodrich, J.; Tweedie, S.** (2002). Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development. *Annual review of cell and developmental biology.* 18(1):707-746.
- Graeber, K.; Linkies, A.; Müller, K.; Wunchova, A.; Rott, A.; Leubner-Metzger, G.**(2010). Cross-species approaches to seed dormancy and germination: Conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol. Biol.* 73:67–87.
- Graeber, K.; Nakabayashi, K.; Miatton, E.; Leubner-Metzger, G.; Soppe, W.J.** (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, cell & environment.* 35(10):1769-1786.
- Graeber, K.; Voegele, A.; Büttner-Mainik, A.; Sperber, K.; Mummenhoff, K.; Leubner-Metzger, G.**(2013). Spatiotemporal seed development analysis provides insight into primary dormancy induction and evolution of the lepidium delay of germination 1 genes. *Plant physiology.* 161(4):1903-1917.
- Griffiths, J.; Barrero, J.; Taylor, J.; Helliwell, C.; Gubler, F.** (2011). ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PloS one.* 6 (5).
- Griffiths, J.; Murase, K.; Rieu, I.; Zentella, R.; Zhang, Z.L.; Powers, S.J.; Gong, F.; Phillips, A.L.; Hedden, P.; Sun, T.P. et al.**(2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18:3399–3414.
- Grubert, M.** (1981). Mucilage or gum in seeds and fruits of Angiosperms: a review. Minerva-Publikation.
- Grzenda, A.; Lomberk, G.; Zhang, J.S.; Urrutia, R.** (2009). Sin3: Master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1789:443–450.
- Gualberti, G.; Papi, M.M.; Bellucci, L.; Ricci, I.; Bouchez, D.; Camilleri, C.; Costantino, P.; Vittorioso, P.** (2002). Mutations in the Dof Zinc Finger Genes DAG2 and DAG1 Influence with Opposite Effects the Germination of *Arabidopsis* Seeds. *The plant cell.* 14:1253–1263.
- Gubler, F.; Millar, A.A.; Jacobsen, J. V.** (2005). Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current opinion in plant biology.* 8(2):183-7.

- Gutiérrez, L.; Van Wuytswinkel, O.; Castelain, M.; Bellini, C.** (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends in plant science*. 12(7):294-300.
- Gutiérrez, R.A.; Stokes, T.L.; Thum, K.; Xu, X.; Obertello, M.; Katari, M.S.; Tanurdzic, M.; Dean, A.; Nero, D.C.; McClung, C.R.; Coruzzi, G.M.** (2008). Systems approach identifies anorganic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:4939–4944.
- Gutterman, Y.; Shem-Tov, S.** (1996). Structure and function of the mucilaginous seed coats of *Plantago coronopus* inhabiting the Negev desert of Israel. *Israel Journal of Plant Sciences*. 44(2/3):125-133.
- Haughn, G.; Chaudhury, A.** (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*. 10(10):472-7.
- Hauvermale, A.L.; Ariizumi, T.; Steber, C.M.** (2012). Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol*. 160(1):83-92.
- He, H.; Lehming, N.** (2003). Global effects of histone modifications. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2(3):234-243.
- He, Y.** (2012). Chromatin regulation of flowering. *Trends in plant science*. 17(9):556-562.
- He, Y.** (2012). Chromatin regulation of flowering. *Trends Plant Sci*. 17(9):556-62.
- Hedden, P.; Thomas, S.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *The Biochemical journal*. 444(1):11-25.
- Hennig, L.; Stoddart, W.; Dieterle, M.; Whitelam, G.; Schäfer, E.** (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant physiology*. 128(1):194-200.
- Herzog, M.; Dorne, A.M.; Grellet, F.** (1995). GASA, a gibberellin-regulated gene family from Arabidopsis thaliana related to the tomato GAST1 gene. *Plant. Mol. Biol*. 27:743-752.
- Hilhorst, H.W.M.** (1995). A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research*. 5:61–73.
- Hilhorst, H.W.M.** (2007). Definitions and hypotheses of seed dormancy. pp. 50–71
- Hilhorst, H.W.M.; Derkx, M.P.M.; Karssen, C.M.** (1995). An integrating model for seed dormancy cycling: characterization of reversible sensitivity. In G Lang, ed, *Plant Dormancy: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. CAB International, Wallingford, UK.
- Hilhorst, H.W.M.; Finch-Savage, W.E.; Buitink, J.; Bolingue, W.; Leubner-Metzger, G.** (2010). Dormancy in Plant Seeds. *Topics in Current Genetics*. 21:43-67.
- Hilhorst, H.W.M.; Karssen, C.M.** (1992). Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regul*. 11:225–238.
- Hilhorst, H.W.M.** (1998). The regulation of secondary dormancy. The membrane hypothesis revisited. *Seed Science Research*. 8:77–90.
- Höfgen, R.; Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res*. 16(20):9877.
- Holdsworth, M.J.; Bentsink, L.; Soppe, W.J.** (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol*. 179(1):33-54.
- Hollender, C.; Liu, Z.** (2008). Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *J. Integr. Plant Biol*. 50(7):875-85.
- Hoppmann, V.; Thorstensen, T.; Kristiansen, P.E.; Veiseth, S.V.; Rahman, M.A.; Finne, K.; Aalen, R.B.; Aasland, R.** (2011). The CW domain, a new histone recognition module in chromatin proteins. *EMBO J*. 18:1939–1952.

BIBLIOGRAFÍA

- Hou, X.; Lee, L. Y. C.; Xia, K.; Yan, Y.; Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental cell*. 19(6):884-894.
- Ibarra, S.; Auge, G.; Sánchez, R.; Botto, J. (2013). Transcriptional Programs Related to Phytochrome A Function in Arabidopsis Seed Germination. *Molecular plant*. 6(4):1261-73.
- Iizuka, M.; Smith, M.M. (2003). Functional consequences of histone modifications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13:154–160.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B.; Collin, F.; Beazer-Barclay, Y.D.; Antonellis, K.J.; Scherf, U.; Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4(2):249-64.
- Irizarry, R.A.; Hobbs, B.; Collin, F.; Beazer-Barclay, Y.D.; Antonellis, K.J.; Scherf, U.; Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. (2):249-64.
- Irshad, M.; Canut, H.; Borderies, G.; Pont-Lezica, R.; Jamet, E. (2008). A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of Arabidopsis thaliana: Confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biol.* 8: 94.
- Iuchi, S.; Suzuki, H.; Kim, Y.C.; Iuchi, A.; Kuromori, T., et al. (2007). Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J.* 50:958–66
- Jackson, J.P.; Lindroth, A.M.; Cao, X.; Jacobsen, S.E. (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*. 416:556–560
- Jacobsen, J.V.; Pearce, D.W.; Poole, A.T.; Pharis, R.P.; Mander, L.N. (2002). Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiol. Plant.* 115:428–41.
- Jang, I.C.; Chung, P.J.; Hemmes, H.; Jung, C.; Chua, N.H. (2011). Rapid and reversible light-mediated chromatin modifications of Arabidopsis phytochrome A locus. *Plant Cell*. 23: 459–470.
- Janiak, A.; Piórko, S.; Matros, A.; Mock, H.; Kwaśniewski, M.; Chwiałkowska, K.; Chmielewska, B.; Szarejko, I. (2012). A comparative analysis of proteins that accumulated during the initial stage of root hair development in barley root hair mutants and their parent varieties. *J Appl Genetics*. 53:363–376.
- Jarillo, J. A.; Piñeiro, M.; Cubas, P.; Martínez-Zapater, J. M. (2009). Chromatin remodeling in plant development. *Int. J. Dev. Biol.* 53(8-10):1581-96.
- Jeong, J.; Song, H.; Ko, J.; Jeong, Y.; Kwon, Y.E.; Seol, J.H.; Amasino, R.; Noh, B.; Noh, Y. (2009). Repression of FLOWERING LOCUS T Chromatin by Functionally Redundant Histone H3 Lysine 4 Demethylases in Arabidopsis. *PLoS One*. 4(11): e8033.
- Johnson, R.; Wagner, R.; Verhey, S.; Walker-Simmons, M. (2002). The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant physiology*. 130(2):837-846.
- Johnson, L.; Cao, X.; Jacobsen, S. (2002). Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Curr Biol*. 12(16):1360-7.
- Jung, J.H.; Park, C.M. (2014). HOS1-mediated activation of FLC via chromatin remodeling under cold stress. *Plant Signal Behav.* 8(12).
- Karssen, C.M.; Brinkhorst-van der Swan, D.L.C.; Breekland, A.E.; Koornneef, M. (1983). Induction of dormancy during seed development by endogenous abscisic acid: studies on abscisic acid deficient genotypes of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Planta*. 157:158–165.
- Karssen, C.M.; Lacka, E. (1986). A revision of the hormone balance theory of seed dormancy: studies on gibberellin and/or abscisic acid-deficient mutants of Arabidopsis thaliana. pp. 315–323 in Bopp, M. (Ed.) *Plant growth substances*. Berlin, Springer-Verlag.

- Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.** (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature biotechnology*. 17(3):287-291.
- Kawakatsu, T.; Taramino, G.; Itoh, J.I.; Allen, J.; Sato, Y., Hong, S.K.; Yule, R.; Nagasawa, N.; Kojima, M.; Kusaba, M.; Sakakibara, H.; Sakai, H.; Nagato, Y.** (2009). PLASTOCHRON3/GOLIATH encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *Plant J*. 58:1028–1040.
- Kendall, S.; Hellwege, A.; Marriot, P.; Whalley, C.; Graham, I.; Penfield, S.** (2011). Induction of dormancy in Arabidopsis summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *The Plant cell*. 23(7):2568-2580.
- Kende, H.; Bradford, K.; Brummell, D.; Cho, H.T.; Cosgrove, D.; Fleming, A.; Gehring, C.; Lee, Y.; McQueen-Mason, S.; Rose, J.; Voeselek, L.A.** (2004). Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol*. 55(3):311-4.
- Kilian, B.; Özkan, H.; Pozzi C.; Salamini, F.** (2009). Domestication of the Triticeae in the fertile crescent. In *Genetics and Genomics of the Triticeae*. *Plant Genetics and Genomics: Crops and Models 7* (eds C. Feuillet & G.J. Muehlbauer), pp. 81–119. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- Kim, D.; Yamaguchi, S.; Lim, S.; Oh, E.; Park, J.; Hanada, A.; Kamiya, Y.; Choi, G.** (2008). SOMNUS, a CCH-type zinc finger protein in Arabidopsis, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *The Plant cell*. 20(5):1260-1277.
- Kim, J.; Guermah, M.; Roeder, R.G.** (2010). The human PAF1 complex acts in chromatin transcription elongation both independently and cooperatively with SII/TFIIS. *Cell* 140: 491–503.
- Kim, S.; Lee, J.; Eshed-Williams, L.; Zilberman, D.; Sung, Z.** (2012). EMF1 and PRC2 cooperate to repress key regulators of Arabidopsis development. *PLoS genetics*. 8(3).
- Kim, S.Y.; He, Y.; Jacob, Y.; Noh, Y.S.; Michaels, S.; Amasino, R.** (2005). Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis requires a putative histone H3 methyltransferase. *Plant Cell*. 17:3301–3310.
- Kim, W.; Lee, Y.; Park, J.; Lee, N.; Choi, G.** (2013). HONSU, a protein phosphatase 2C, regulates seed dormancy by inhibiting ABA signaling in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*. 54(4):555-572.
- Ko, J.H.; Mitina, I.; Tamada, Y.; Hyun, Y.; Choi, Y.; Amasino, R.M.; Noh, B.; Noh, Y.S.** (2010). Growth habit determination by the balance of histone methylation activities in Arabidopsis. *EMBO J*. 29:3208–3215.
- Ko, J.H.; Yang, S.H.; Han, K.H.** (2006). Upregulation of an Arabidopsis RING-H2 gene, XERICO, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis. *Plant Journal*. 47:343–355.
- Kobayashi, Y.; Kaya, H.; Goto, K.; Iwabuchi, M.; Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*. 286:1960–1962.
- Koornneef, M.; Bentsink, L.; Hilhorst, H.** (2002). Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*. 5(1):33–36.
- Koornneef, M.; Karssen, C.M.** (1994). Seed dormancy and germination. In *EM Meyerowitz, CR Somerville, eds, Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 313–334.
- Koornneef, M.; Reuling, G.; Karssen, C.M.** (1984). The isolation and characterization of Abscisic-Acid Insensitive Mutants of Arabidopsis-Thaliana. *Physiol. Plantarum* 61:377–383.
- Koornneef, M.; Vanderveen, J.H.** (1980). Induction and Analysis of Gibberellin Sensitive Mutants in Arabidopsis-Thaliana (L) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 58:257–263.

BIBLIOGRAFÍA

- Kotak, S.; Vierling, E.; Bäumlein, H.; von Koskull-Döring, Pascal.**(2007). A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *The Plant cell*.19(1):182-195.
- Kucera, B.; Cohn, M.A.; Leubner-Metzger, G.** (2005).Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15: 281-307.
- Kushiro, T.; Okamoto, M.; Nakabayashi, K.; Yamagishi, K.; Kitamura, S.; Asami, T.; Hirai, N.; Koshiba, T.; Kamiya, Y.; Nambara, E.** (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* 23(7):1647-56.
- Laherty, C.D.; Yang, W.M.; Sun, J.M.; Davie, J.R.; Seto, E.; Eisenman, R.N.** (1997). Histone deacetylases associated with the Sin3 corepressor mediate transcriptional repression. *Cell*. 89:349–356.
- Lázaro, A.; Gómez-Zambrano, A.; López-González, L.; Piñeiro, M.; Jarillo, J.A.** (2008). Mutations in the Arabidopsis SWC6 gene, encoding a component of the SWR1 chromatin remodelling complex, accelerate flowering time and alter leaf and flower development. *J Exp Bot.* 59(3):653-66.
- Le, B.; Cheng, C.; Bui, A.; Wagmaister, J.; Henry, K.; Pelletier, J.; Kwong, L.; Belmonte, M.; Kirkbride, R.; Horvath, S.; Drews, G.; Fischer, R.; Okamoto, J.; Harada, J.; Goldberg, R.** (2010).Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.107(18):8063-8070.
- Lee, J.S.; Shukla, A.; Schneider, J.; Swanson, S.K.; Washburn, M.P.; Florens, L.; Bhaumik, S.R.; Shilatifard, A.** (2007). Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*. 131:1084–1096
- Lee, K.; Piskurewicz, U.; Turecková, V.; Carat, S.; Chappuis, R.; Strnad, M.; Fankhauser, C.; Lopez-Molina, L.** (2012).Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes & development*. 26(17):1984-1996.
- Lee, K.; Piskurewicz, U.; Turecková, V.; Strnad, M.; Lopez-Molina, L.** (2010).A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(44):19108-19113.
- Lee, S.; Cheng, H.; King, K.; Wang, W.; He, Y.; Hussain, A.; Lo, J.; Harberd, N.; Peng, J.** (2002).Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & development*.16(5):646-658.
- Lee, Y.; Choi, D.; Kende, H.** (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4(6):527-32.
- Lefebvre, V.; North, H.; Frey, A.; Sotta, B.; Seo, M.; Okamoto, M.; Nambara, E.; Marion-Poll, A.** (2006). Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 45(3):309-319.
- Léon-Kloosterziel, K.M.; Keijzer, C.J.; Koornneef, M.** (1994). A seed shape mutant of Arabidopsis that is affected in integument development. *Plant Cell*. 6:385-392.
- LePage-Degivry, M.T., Garello, G.**(1992).In situ abscisic acid synthesis. A requirement for induction of embryo dormancy in *Helianthus annuus*. *Plant Physiol.* 98:1386-1390.
- Leubner-Metzger, G.** (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I β -1, 3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta*. 215(6):959-968.
- Leubner-Metzger, G.** (2005). Beta-1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J.* 41:133-145.
- Leubner-Metzger, G.**(2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*. 13:17-34.

- Leubner-Metzger, G.** (2001). Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta*. 213:758–63.
- Leymarie, J.; Bruneaux, E.; Gibot-Leclerc, S.; Courbineau, F.** (2007). Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *Journal of Experimental Botany*. 58:425–437.
- Li, S.F.; Milliken, O.N.; Pham, H.; Seyit, R.; Napoli, R.; Preston, J.; Koltunow, A.M.; Parish, R.W.** (2009). The Arabidopsis MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis. *Plant Cell*. 21:72–89.
- Lim, S.; Park, J.; Lee, N.; Jeong, J.; Toh, S.; Watanabe, A.; Kim, J.; Kang, H.; Kim, D.; Kawakami, N.; Choi, G.** (2013). ABA-INSENSITIVE3, ABA-INSENSITIVE5, and DELLAs Interact to Activate the Expression of SOMNUS and Other High-Temperature-Inducible Genes in Imbibed Seeds in Arabidopsis. *The Plant Cell Preview* (online).
- Linkies, A.; Leubner-Metzger, G.** (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant cell reports*. 31(2):253-270.
- Linkies, A.; Müller, K.; Morris, K.; Tureckovac, V.; Cadman, C.S.C.; Corbineau, F.; Strnad, M.; Lynn, J.R.; Finch-Savage, W.E.; Leubner-Metzger, G.** (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*. 21:3803–3822.
- Liu, A.; Gao, F.; Kanno, Y.; Jordan, M.; Kamiya, Y.; Seo, M.; Ayele, B.** (2013). Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS one*. 8(2):e56570.
- Liu, C.; Chen, H.; Er, H.L.; Soo, H.M.; Kumar, P.P.; Han, J.H.; Liou, Y.C.; Yu, H.** (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development*. 135(8):1481-91.
- Liu, C.; Mehdy, M.** (2007). A nonclassical arabinogalactan protein gene highly expressed in vascular tissues, AGP31, is transcriptionally repressed by methyl jasmonic acid in Arabidopsis. *Plant physiology*. 145(3):863-874.
- Liu, P.; Koizuka, N.; Martin, R.; Nonogaki, H.** (2005). The BME3 (Blue Micropylar End 3) GATA zinc finger transcription factor is a positive regulator of Arabidopsis seed germination. *The Plant journal: for cell and molecular biology*. 44(6):960-971.
- Liu, X.; Chen, C.; Wang, K.; Luo, M.; Tai, R.; Yuan, L.; Zhao, M.; Yang, S.; Tian, G.; Cui, Y.; Hsieh, H.; Wu, K.** (2013). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 Associates with the Histone Deacetylase HDA15 in Repression of Chlorophyll Biosynthesis and Photosynthesis in Etiolated Arabidopsis Seedlings. *The Plant cell*. 25(4):1258-1273.
- Liu, X.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Feng, Z.; Li, Q.; Yang, H.; Luan, S.; Li, J.; He, Z.** (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(38):15485-90.
- Liu, Y.; Geyer, R.; Brambilla, V.; Nakabayashi, K.; Soppe, W.J.** (2011). Chromatin Dynamics During Seed Dormancy. *Methods in Molecular Biology*. 773:239-57.
- Liu, Y.; Geyer, R.; van Zanten, M.; Carles, A.; Li, Y.; Hörold, A.; van Nocker, S.; Soppe, W.J.** (2011). Identification of the Arabidopsis REDUCED DORMANCY 2 gene uncovers a role for the polymerase associated factor 1 complex in seed dormancy. *PLoS one*. 6(7).
- Liu, Y.; Koornneef, M.; Soppe, W.J.** (2007). The absence of histone H2B monoubiquitination in the Arabidopsis hub1 (rdo4) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *The Plant cell*. 19(2):433-444.
- Liu, Y.; Shi, L.; Ye, N.; Liu, R.; Jia, W.; Zhang, J.** (2009). Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in Arabidopsis. *New Phytol*. 183:1030–1042.

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, Y.; Ye, N.; Liu, R.; Chen, M.; Zhang, J.** (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of experimental botany*. 61(11):2979-2990.
- Loidl, P.** (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science*. 9(2):84-90.
- Long, J.A.; Ohno, C.; Smith, Z.R.; Meyerowitz, E.M.** (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science*. 312(5779):1520-3.
- López-González, L.** (2010). Represión floral mediada por la cromatina en *Arabidopsis thaliana*: el papel de las proteínas homólogas ebs y shl. Tesis Doctoral.
- Lopez-Molina, L.; Mongrand, S.; Chua, N. H.** (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(8):4782-4787.
- Lopez-Molina, L.; Mongrand, S.; McLachlin, D. T.; Chait, B. T.; Chua, N. H.** (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J*. 32:317-328.
- Lu, F.; Cui, X.; Zhang, S.; Liu, C.; Cao, X.** (2010). JMJ14 is an H3K4 demethylase regulating flowering time in Arabidopsis. *Cell research*. 20(3):387-390.
- Ma, Y.; Szostkiewicz, I.; Korte, A.; Moes, D.; Yang, Y.; Christmann, A., et al.** (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*. 324:1064-1068.
- Macquet, A.; Ralet, M.C.; Oudet, O.; Kronenberger, J.; Mouille, G.; Marion-Poll, A.; et al.** (2007). A naturally occurring mutation in an Arabidopsis accession affects a beta-D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan in seed mucilage. *Plant Cell*. 19:3990-4006.
- March-Díaz, R.; Reyes, J.C.** (2009). The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. *Mol Plant*. 2(4):565-77.
- Marmorstein, R.; Roth, S.Y.** (2001). Histone acetyltransferases: Function, structure, and catalysis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:155-161.
- Martin-Trillo, M.; Lázaro, A.; Poethig, R.S.; Gómez-Mena, C.; Piñeiro, M.A.; Martínez-Zapater, J.M.; Jarillo, J.A.** (2006). EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1) encodes ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (AtARP6), a putative component of chromatin remodelling complexes that positively regulates FLC accumulation in Arabidopsis. *Development*. 133(7):1241-52.
- Matakiadis, T.; Alboresi, A.; Jikumaru, Y.; Tatematsu, K.; Pichon, O.; Renou, J. P. et al.** (2009). The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol*. 149:949-960.
- Matilla, A.J.; Matilla-Vázquez, M.A.** (2008). Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci*. 175(1-2):87-97.
- McCabe, J.M.; Hill, T.A.; Skinner, D.J.; Izhaki, A.; Hauser, B.A.; Meister, R.J.; Reddy, G.V.; Meyerowitz, E.M.; Bowman, J.L.; Gasser, C.S.** (2006). ABERRANT TEST A SHAPE encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of Arabidopsis ovule integuments. *Plant J*. 46:522-531.
- McClung, C.R.** (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell*. 18:792-803.
- Meinke, D. W.; Franzmann, L. H.; Nickle, T. C.; Yeung, E. C.** (1994). Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell Online*. 6(8):1049-1064.
- Mersereau, M.; Pazour, G.J.; Das, A.** (1990). Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *Gene*. 31, 90(1):149-51.

- Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C., Kay, S.A., and Chory, J.** (2008). A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol.* 6:e225.
- Michaels, S.D.; Amasino, R.M.** (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell.* 13:935–941.
- Millar, A.A.; Jacobsen, J.V.; Ross, J.J.; Helliwell, C.A.; Poole, A.T.; Scofield, G.; Reid, J.B.; Gubler, F.** (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: The role of ABA' 8-hydroxylase. *Plant J.* 45:942–954.
- Miller, T.; Krogan, N.J.; Dover, J.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Johnston, M.; Greenblatt, J.F.; Shilatifard, A.** (2001). COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98(23):12902-7.
- Mortensen, S.A.; Grasser, K.D.** (2013). The seed dormancy defect of Arabidopsis mutants lacking the transcript elongation factor TFIIS is caused by reduced expression of the DOG1 gene. *FEBS Letters* (online).
- Movahedi, S.; Van Bel, M.; Heyndrickx, K.S.; Vandepoele, K.** (2012). Comparative co-expression analysis in plant biology. *Plant Cell Environ.* 35(10):1787-98.
- Müller, K.; Bouyer, D.; Schnittger, A.; Kermodé, A.** (2012). Evolutionarily conserved histone methylation dynamics during seed life-cycle transitions. *PLoS one.* 7(12):e51532.
- Müller, K.; Job, C.; Belghazi, M.; Job, D.; Leubner-Metzger, G.** (2010). Proteomics reveal tissue-specific features of the cress (*Lepidium sativum* L.) endosperm cap proteome and its hormone-induced changes during seed germination. *Proteomics.* 10(3):406-16.
- Müller, K.; Tintelnot, S.; Leubner-Metzger, G.** (2006). Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 47:864–877.
- Murase, K.; Hirano, Y.; Sun, T.; Hakoshima, T.** (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature.* 456:459–463.
- Murashige, T.; Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum.* 15: 473-497.
- Müssig, C.; Kauschmann, A.; Clouse, S.D.; Altmann, T.** (2000). The Arabidopsis PHD-finger protein SHL is required for proper development and fertility. *Mol. Gen. Genet.* 264(4):363-70.
- Nakabayashi, K.; Bartsch, M.; Xiang, Y.; Miatton, E.; Pellengahr, S.; Yano, R.; Mitsunori; Soppe, W.J.** (2012). The time required for dormancy release in Arabidopsis is determined by DELAY OF GERMINATION1 protein levels in freshly harvested seeds. *The Plant cell.* 24(7):2826-2838.
- Nakajima, M.; Shimada, A.; Takashi, Y.; Kim, Y. C.; Park, S. H.; Ueguchi-Tanaka, M.; Yamaguchi, I.** (2006). Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *The Plant Journal.* 46(5):880-889.
- Nakamura, S.; Abe, F.; Kawahigashi, H.; Nakazono, K.; Tagiri, A.; Matsumoto, T.; Utsugi, S.; Ogawa, T.; Handa, H.; Ishida, H.; Mori, M.; Kawaura, K.; Ogihara, Y.; Miura, H.** (2011). A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *The Plant cell.* 23(9):3215-3229.
- Nakashima, K.; Fujita, Y.; Kanamori, N.; Katagiri, T.; Umezawa, T.; Kidokoro, S.; Maruyama, K.; Yoshida, T.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant & cell physiology.* 50(7):1345-1363.
- Nambara, E.; Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:165–185.

BIBLIOGRAFÍA

- Nambara, E.; Naito, S.; Mccourt, P.**(1992). A Mutant of Arabidopsis Which Is Defective in Seed Development and Storage Protein Accumulation Is a New *Abi3* Allele. *Plant J.* 2:435–441.
- Nambara, E.; Okamoto, M.; Tatematsu, K.; Yano, R.; Seo, M. et al.** (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci. Res.* 20:55–67.
- Nambara, E.; Marion-Poll, A.**(2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* 8(5):213-7.
- Ng, D. W.; Wang, T.; Chandrasekharan, M. B.; Aramayo, R.; Kertbundit, S.; Hall, T. C.** (2007). Plant SET domain-containing proteins: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression.* 1769(5):316-329.
- Nguyen, T.; Keizer, P.; van Eeuwijk, F.; Smeekens, S.; Bentsink, L.** (2012). Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant physiology.* 160(4):2083-2092.
- Nikolaeva, M.G.** (1969). Physiology of deep dormancy in seeds. Leningrad, Russia, Izdatel'stvo 'Nauka'. (Translated from Russian by Z. Shapiro, National Science Foundation, Washington, DC.)
- Nishimura, N.; Sarkeshik, A.; Nito, K.; Park, S. Y.; Wang, A.; Carvalho, P. C.; Schroeder, J. I.** (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal.* 61(2):290-299.
- Nishimura, N.; Yoshida, T.; Kitahata, N.; Asami, T.; Shinozaki, K.; Hirayama, T.** (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. *The Plant Journal.* 50(6):935-949.
- Nishizawa, A.; Yabuta, Y.; Yoshida, E.; Maruta, T.; Yoshimura, K.; Shigeoka, S.** (2006). *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant Journal.* 48(4):535-47.
- Noh, Y.S.; Amasino, R.M.** (2003). *PIE1*, an ISWI family gene, is required for FLC activation and floral repression in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 15(7):1671-82.
- Nonogaki, H.; Bassel, G. W.; Bewley, J. D.** (2010). Germination—still a mystery. *Plant Science.* 179(6):574-581.
- North, H.; Baud, S.; Debeaujon, I.; Dubos, C.; Dubreucq, B.; Grappin, P.; Jullien, M.; Lepiniec, L.; Marion-Poll, A.; Miquel, M.; Rajjou, L.; Routaboul, J.; Caboche, M.**(2010). *Arabidopsis* seed secrets unravelled after a decade of genetic and omics-driven research. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 61(6):971-981.
- Nothnagel, E.A.** (1997). Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174:195-291.
- Ogawa, M.; Hanada, A.; Yamauchi, Y.; Kuwahara, A.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.** (2003). Gibberellin Biosynthesis and Response during *Arabidopsis* Seed Germination. *The Plant Cell.* 15:1591–1604.
- Oh, E.; Kang, H.; Yamaguchi, S.; Park, J.; Lee, D.; Kamiya, Y.; Choi, G.** (2009). Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant cell.* 21(2):403-419.
- Oh, E.; Kim, J.; Park, E.; Kim, J.; Kang, C.; Choi, G.** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell.* 16(11):3045-3058.
- Oh, E.; Yamaguchi, S.; Hu, J.; Yusuke, J.; Jung, B.; Paik, I.; Lee, H.; Sun, T.; Kamiya, Y.; Choi, G.** (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in *Arabidopsis* seeds. *The Plant cell.* 19(4):1192-1208.
- Oh, E.; Yamaguchi, S.; Kamiya, Y.; Bae, G.; Chung, W.; Choi, G.** (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 47(1):124-139.

- Ohgishi, M.; Saji, K.; Okada, K.; Sakai, T.** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:2223–2228.
- Okamoto, M.; Kuwahara, A.; Seo, M.; Kushiro, T.; Asami, T.; Hirai, N.; Kamiya, Y.; Koshiba, T.; Nambara, E.** (2006). CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 141(1):97-107.
- Okamoto, M.; Kuwahara, A.; Seo, M.; Kushiro, T.; Asami, T.; Hirai, N.; Kamiya, Y.; Koshiba, T.; Nambara, E.** (2008). CYP707A1 and CYP707A2, Which Encode Abscisic Acid 8'-Hydroxylases, Are Indispensable for Proper Control of Seed Dormancy and Germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 141:97–107.
- Oliverio, K.A.; Crepy, M.; Martin-Tryon, E.L.; Milich, R.; Harmer, S.L.; Putterill, J., Yanovsky, M.J.; Casal, J.J.** (2007). GIGANTEA regulates phytochrome A-mediated photomorphogenesis independently of its role in the circadian clock. *Plant Physiol*. 144:495–502.
- Olszewski, N.; Sun, T.P.; Gubler, F.** (2002). Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell*. 14:61–80.
- Oracz, K.; Bouteau, H. E. M.; Farrant, J. M.; Cooper, K.; Belghazi, M.; Job, C.; Bailly, C.** (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal*. 50(3):452-465.
- Page-Degivry, M. L.; Bianco, J.; Barthe, P.; Garello, G.; Lang, G. A.** (1996). Changes in hormone sensitivity in relation to onset and breaking of sunflower embryo dormancy. In *Plant dormancy: physiology, biochemistry and molecular biology*. (pp. 221-231). CAB INTERNATIONAL.
- Papi, M.; Sabatini, S.; Bouchez, D.; Camilleri, C.; Costantino, P.; Vittorioso, P.** (2000). Identification and disruption of an *Arabidopsis* zinc finger gene controlling seed germination. *Genes Dev*. 14:28–33.
- Parcy, F.; Valon, C.; Raynal, M.; Gaubier-Comella, P.; Delseny, M.; Giraudat, J.** (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *The Plant cell*. 6(11):1567-1582.
- Park, J.; Lee, N.; Kim, W.; Lim, S.; Choi, G.** (2011). ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed *Arabidopsis* seeds. *The Plant cell*. 23(4):1404-1415.
- Park, J.; Nguyen, K.; Park, E.; Jeon, J.; Choi, G.** (2013). DELLA proteins and their interacting RING Finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 25(3):927-943.
- Park, S. Y.; Fung, P.; Nishimura, N.; Jensen, D. R.; Fujii, H.; Zhao, Y.; Cutler, S. R.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*. 324(5930):1068-1071.
- Pavri, R.; Zhu, B.; Li, G.; Trojer, P.; Mandal, S.; Shilatifard, A.; Reinberg, D.** (2006). Histone H2B monoubiquitination functional cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell*. 125:703–717.
- Pedersen, M. T.; Helin, K.** (2010). Histone demethylases in development and disease. *Trends in cell biology*. 20(11):662-671.
- Penfield, S.; Gilday, A.; Halliday, K.; Graham, I.** (2006). DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Current biology*. 16(23):2366-2370.
- Penfield, S.; Hall, A.** (2009). A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 21(6):1722-1732.
- Penfield, S.; Josse, E.; Halliday, K.** (2010). A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of *Arabidopsis* primary seed dormancy. *Plant molecular biology*. 73(1-2):89-95.

BIBLIOGRAFÍA

- Penfield, S.; Josse, E.; Kannangara, R.; Gilday, A.; Halliday, K.; Graham, I.** (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Current biology*. 15(22):1998-2006.
- Penfield, S.; King, J.** (2009). Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*. 276(1673):3561-3569.
- 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. *The Plant Cell Online*. 13(12):2777-2791.
- Peng, J.R.; Harberd, N.P.** (1997). Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 113:1051-1058.
- Pien, S.; Fleury, D.; Mylne, J.S.; Crevillen, P.; Inze, D.; Avramova, Z.; Dean, C.; Grossniklaus, U.** (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3lysine 4 trimethylation. *Plant Cell*. 20:580-588.
- Piñeiro, M.; Gómez-Mena, C.; Schaffer, R.; Martínez-Zapater, J.M.; Coupland, G.** (2003). EARLY BOLTING IN SHORT DAYS Is Related to Chromatin Remodeling Factors and Regulates Flowering in Arabidopsis by Repressing FT. *The Plant Cell*. 15:1552-1562.
- Piskurewicz, U.; Jikumaru, Y.; Kinoshita, N.; Nambara, E.; Kamiya, Y.; Lopez-Molina, L.** (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *The Plant cell*. 20(10):2729-2745.
- Piskurewicz, U.; Lopez-Molina, L.** (2009). The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant Signal. Behav.* 4:63-65.
- Piskurewicz, U.; Turecková, V.; Lacombe, E.; Lopez-Molina, L.** (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *The EMBO journal*. 28(15):2259-2271.
- Provart, N.; Zhu, T.** (2003). A browser-based functional classification SuperViewer for Arabidopsis genomics. *Currents in Computational Molecular Biology*. 271-272.
- Pysh, L.D.; Wysocka-Diller, J.; Camilleri, C.; Bouchez, d.; Benfey, P.** (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal*. 18(1):111-119.
- Raghavendra, A. S.; Gonugunta, V. K.; Christmann, A.; Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*. 15(7):395-401.
- Rajjou, L.; Gallardo, K.; Debeaujon, I.; Vandekerckhove, J.; Job, C.; Job, D.** (2004). The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol*. 134:1598-1613.
- Rajjou, L.; Duval, M.; Gallardo, K.; Catusse, J.; Bally, J.; Job, C.; Job, D.** (2012). Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:507-533.
- Raz, V.; Bergervoet, J.; Koornneef, M.** (2001). Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development*. 128(2):243-252.
- Recasens, J.; Conesa, J.A.** (2009). Malas hierbas en plántulas. Guías de identificación. Edicions de la Universitat de Lleida.
- Reeves, W.M.; Lynch, T.J.; Mobin, R.; Finkelstein, R.R.** (2011). Direct targets of the transcription factors ABA-Insensitive (ABI)4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors. *Plant Mol Biol*. 75:347-363.
- Riechmann, J. L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Keddie, J.; Adam, L.; Yu, G. L.** (2000). Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. 290(5499):2105-2110.

- Roeder, A.; Yanofsky, M.** (2006). Fruit development in Arabidopsis. *The Arabidopsis book* / American Society of Plant Biologists. 4.
- Roguev, A.; Schaft, D.; Shevchenko, A.; Pijnappel, W.W.; Wilm, M.; Aasland, R.; Stewart, A.F.** (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J.* 20(24):7137-48.
- Rosa, S.; De Lucia, F.; Mylne, J.S.; Zhu, D.; Ohmido, N.; Pendle, A.; Kato, N.; Shaw, P.; Dean C.** (2013). Physical clustering of FLC alleles during Polycomb-mediated epigenetic silencing in vernalization. *Genes Dev.* 27(17):1845-50.
- Roxrud, I.; Lid, S.; Fletcher, J.; Schmidt, E.; Opsahl-Sorteberg, H.** (2007). GASA4, one of the 14-member Arabidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant & cell physiology.* 48(3):471-483.
- Ruepp, A.; Zollner, A.; Maier, D.; Albermann, K.; Hani, J.; Mokrejs, M.; Tetko, I.; Guldener, U.; Mannhaupt, G.; Münsterkötter, M.; Mewes, W.** (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research.* 32(18):5539–5545.
- Saibo; N.J.M.; Vriezen, W.H.; De Grauwe, L.; Azmi, A.; Prinsen, E., et al.** (2007). A comparative analysis of the Arabidopsis mutant amp1-1 and a novel weak amp1 allele reveals new functions of the AMP1 protein. *Planta* 225: 831–842.
- Saito, S.; Hirai, N.; Matsumoto, C.; Ohigashi, H.; Ohta, D.; Sakata, K.; Mizutani, M.** (2004). Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology.* 134(4):1439-1449.
- Saleh, A.; Alvarez-Venegas, R.; Yilmaz, M.; Le, O.; Hou, G.; Sadler, M.; Al-Abdallat, A.; Xia, Y.; Lu, G.; Ladunga, I.; Avramova, Z.** (2008). The highly similar Arabidopsis homologs of trithorax ATX1 and ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions. *The Plant cell.* 20(3):568-579.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.Y.; Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampedro, J.; Cosgrove, D.J.** (2005). The expansin superfamily. *Genome Biol.* 6(12):242.
- Sanchez, R. A.; Mella, R. A.** (2004). The exit from dormancy and the induction of germination: Physiological and molecular aspects. *Handbook of seed physiology. Application to agriculture.* New York, NY, USA: Food Product Press and The Haworth Press, Inc, 221-243.
- Sarath, G.; Bethke, P.C.; Jones, R.; Baird, L. M.; Hou, G.; Mitchell, R.B.** (2006). Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta.* 223:1154–1164.
- Schmitz, R. J.; Amasino, R. M.** (2007). Vernalization: a model for investigating epigenetics and eukaryotic gene regulation in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression.* 1769(5):269-275.
- Schultz, C.J.; Gilson, P.; Oxley, D.; Youl, J.; Bacic, A.** (1998). GPI anchors on arabinogalactan proteins: implications for signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 3, 426-431.
- Seo, M.; Nambara, E.i; Choi, G.; Yamaguchi, S.** (2009). Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant molecular biology.* 69(4):463-472.
- Shi, H.; Ye, T.; Wang, Y.; Chan, Z.** (2013). Arabidopsis ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. *Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale.* 67C: 209-216).
- Shimada, A.; Ueguchi-Tanaka, M.; Nakatsu, T.; Nakajima, M.; Naoe, Y.; Ohmiya, H.; Kato, H.; Matsuoka, M.** (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature.* 456:520–523.

BIBLIOGRAFÍA

- Shinomura, T.; Nagatani, A.; Chory, J.; Furuya, M.** (1994). The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol.* 104:363–371.
- Shpak, E.D.; Berthiaume, C.T.; Hill, E.J.; Torii, K.U.** (2004) Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development.* 131:1491–1501.
- Shu, Kai; Zhang, H.; Wang, S.; Chen, M.; Wu, Y.; Tang, S.; Liu, C.; Feng, Y.; Cao, X.; Xie, Qi.** (2013). ABI4 Regulates Primary Seed Dormancy by Regulating the Biogenesis of Abscisic Acid and Gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS genetics.* 9(6).
- Silverstone, A.L.; Ciampaglio, C.N.; Sun, T-P.** (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell.* 10:155–169.
- Sirova, J.; Sedlarova, M.; Piterkova, J.; Luhova, L.; Petrivalsky, M.** (2011). The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci.* 181:560–572.
- Smaczniak, C.; Li, N.; Boeren, S.; America, T.; van Dongen, W.; Goerdayal, S.S.; de Vries, S.; Angenent, G.C.; Kaufmann, K.** (2012). Proteomics-based identification of low-abundance signaling and regulatory protein complexes in native plant tissues. *Nat Protoc.* 7(12):2144–58.
- Smyth, D.; Bowman, J.; Meyerowitz, E.** (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *The Plant cell.* 2(8):755–767.
- Soderman, E.M.; Brocard, I.M.; Lynch, T.J.; Finkelstein, R.R.** (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 124:1752–1765.
- Sorcheng, L.; Hui, C.; Kathryn, E. K.; Weefuen, W.; Yawen, H.; Alamgir, H.; Jane, L.; Nicholas P. H.; Jinrong, P.** (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & Development.* 16:646–658.
- Sridhar, V.V.; Kapoor, A.; Zhang, K.; Zhu, J.; Zhou, T.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Zhu, J.K.** (2007). Control of DNA methylation and heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature.* 447: 735–738.
- Stamm, P.; Kumar, P. P.** (2010). The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal of experimental botany.* 61(11):2889–2903.
- Stamm, P.; Ravindran, P.; Mohanty, B.; Tan, E.; Yu, H.; Kumar, P.** (2012). Insights into the molecular mechanism of RGL2-mediated inhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology.* 12, 179.
- Stone, S.L.; Kwong, L.W.; Yee, K.M.; Pelletier, J.; Lepiniec, L.; Fischer, R.L.; Goldberg, R.B.; Harada, J.J.** (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98:11806–11811.
- Sugimoto, K.; Takeuchi, Y.; Ebana, K.; Miyao, A.; Hirochika, H.; Hara, N.; Ishiyama, K.; Kobayashi, M.; Ban, Y.; Hattori, T.; Yano, M.** (2010). Molecular cloning of Sdr4, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:5792–5797.
- Sun, T. P.; Gubler, F.** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:197–223.
- Sun, T.P., Kamiya, Y.** (1994). The *Arabidopsis* Ga1 Locus Encodes the Cyclase Ent-Kaurene Synthetase-a of Gibberellin Biosynthesis. *Plant Cell* 6: 1509–1518.
- Sun, W.; Bernard, C.; van de Cotte, B.; Van Montagu, M.; Verbruggen, N.** (2001). At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant Journal.* 27(5):407–15.

- Sun, Z.W., Allis, C.D.** (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*. 418:104–108.
- Sung, D.Y.; Vierling, E.; Guy, C.L.**(2001). Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol*. 126(2):789-800.
- Suzuki, M.; Latshaw, S.; Sato, Y.; Settles, A.M.; Koch, K.E.; Hannah, L.C.; Kojima, M.; Sakakibara, H.; McCarty, D.R.** (2008). The maize *Viviparous8* locus, encoding a putative ALTERED MERISTEM PROGRAM1-like peptidase, regulates abscisic acid accumulation and coordinates embryo and endosperm development. *Plant Physiol*. 146: 1193–1206.
- Swain, S.M.; Tseng, T.S.; Olszewski, N.E.**(2001). Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiol*. 126(3):1174-85.
- Tai, H.H.; Tai, G.C.; Beardmore, T.** (2005). Dynamic histone acetylation of late embryonic genes during seed germination. *Plant Mol. Biol*. 59: 909–925.
- Tamada, Y.; Yun, J.; Woo, S.; Amasino, R.** (2009). ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 is required for methylation of lysine 4 of histone H3 and for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C. *The Plant cell*.21(10):3257-3269.
- Tanaka, M.; Kikuchi, A.; Kamada, H.** (2008). The Arabidopsis histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol*. 146:149–161.
- Tang, X.; Lim, M.; Pelletier, J.; Tang, M.; Nguyen, V.; Keller, W.; Tsang, E.; Wang, A.; Rothstein, S.; Harada, J.; Cui, Y.** (2012). Synergistic repression of the embryonic programme by SET DOMAIN GROUP 8 and EMBRYONIC FLOWER 2 in Arabidopsis seedlings. *Journal of experimental botany*.63(3):1391-1404.
- Tariq, M.; Paszkowski, J.** (2004). DNA and histone methylation in plants. *TRENDS in Genetics*. 20(6):244-251.
- Tessadori, F.; Driol, R.; Fransz, P.** (2004). Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends in plant science*. 9(3):147-153.
- Thomas, S. G.; Sun, T. P.** (2004). Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant Physiology*. 135(2):668-676.
- Thorstensen, T.; Grini, P.; Aalen, R.** (2011). SET domain proteins in plant development. *Biochimica et biophysica acta*. 1809(8):407-420.
- Tian, L.; Chen, Z. J.** (2001). Blocking histone deacetylation in Arabidopsis induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(1):200-205.
- Tian, L.; Fong, M.P.; Wang, J.J.; Wei, N.E.; Jiang, H.; Doerge, R.W.; Chen, J.Z.** (2005). Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics*. 169:337–345.
- Tian, L.; Wang, J.; Fong, M. P.; Chen, M.; Cao, H.; Gelvin, S. B.; Chen, Z. J.** (2003). Genetic control of developmental changes induced by disruption of Arabidopsis histone deacetylase 1 (*AtHD1*) expression. *Genetics*.165(1):399-409.
- Torres-Galea, P.; Huang, L.; Chua, N.; Bolle, C.** (2006). The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Mol Gen Genomics*. 276: 13–30
- Toyomasu, T.; Kawaide, H.; Mitsuhashi, W.; Inoue, Y.; Kamiya, Y.**(1998). Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol*. 118:1517–1523.

BIBLIOGRAFÍA

- Tyler, L.; Thomas, S.; Hu, J.; Dill, A.; Alonso, J.; Ecker, J.; Sun, T.** (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 135(2):1008-1019.
- Udvardi, M.K.; Kakar, K.; Wandrey, M.; Montanari, O.; Murray, J.; Andriankaja, A.; Zhang, J.Y.; Benedito, V.; Hofer, J.M.; Chueng, F.; Town, C.D.** (2007). Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiol.* 144(2):538-49.
- Vaistij, F.; Gan, Y.; Penfield, S.; Gilday, A.; Dave, A.; He, Z.; Josse, E.; Choi, G.; Halliday, K.; Graham, I.** (2013). Differential control of seed primary dormancy in *Arabidopsis* ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(26):10866-10871.
- Van Hengel, A.J.; Roberts, K.** (2003). AtAGP30, an arabinogalactan-protein in the cell walls of the primary root, plays a role in root regeneration and seed germination. *The Plant Journal*. 36, 256-270
- Van Zanten, M.; Koini, M.; Geyer, R.; Liu, Y.; Brambilla, V.; Bartels, D.; Koornneef, M.; Fransz, P.; Soppe, W.J.** (2011). Seed maturation in *Arabidopsis thaliana* is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(50):20219-20224.
- Vanneste, S.; Friml, J.** (2009). Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*. 136(6):1005–1016.
- Vethanatham, V.; Yang, Y.; Bowman, C.; Asp, P.; Lee, J.; Skalnik, D.; Dynlacht, B.** (2012). Dynamic loss of H2B ubiquitylation without corresponding changes in H3K4 trimethylation during myogenic differentiation. *Molecular and cellular biology*. 32(6):1044-1055.
- Vicente-Carbajosa, J.; Carbonero, P.** (2005). Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int. J. Dev. Biol.* 49:645-651.
- Wang, L.; Brown, J.L.; Cao, R.; Zhang, Y.; Kassis, J.A.; Jones, R.S.** (2004). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol. Cell*. 14:637-646.
- Wang, M.; Heimovaara-Dijkstra, S.; Van Duijn, B.** (1995). Modulation of germination of embryos isolated from dormant and nondormant barley grains by manipulation of endogenous abscisic acid. *Planta*. 195(4):586-592.
- Wang, Z.; Cao, H.; Sun, Y.; Li, X.; Chen, F.; Carles, A.; Li, Y.; Ding, M.; Zhang, C.; Deng, X.; Soppe, W.J.; Liu, Y.** (2013). *Arabidopsis* paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary seed dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation. *The Plant cell*. 25(1):149-166.
- Waterborg, J. H.** (2002). Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochemistry and cell biology*. 80(3):363-378.
- Weake, V.M.; Workman, J.L.** (2008). Histone ubiquitination: Triggering gene activity. *Mol. Cell* 29: 653–663.
- Wehmeyer, N.; Hernandez, L.D.; Finkelstein, R.R.; Vierling, E.** (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112(2):747-57.
- Wehmeyer, N.; Vierling, E.** (2000). The Expression of Small Heat Shock Proteins in Seeds Responds to Discrete Developmental Signals and Suggests a General Protective Role in Desiccation Tolerance. *Plant Physiol.* 122(4):1099–1108.
- Weitbrecht, K.; Müller, K.; Leubner-Metzger, G.** (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of experimental botany*. 62(10):3289-3309.
- Western, T.; Burn, J.; Tan, W.; Skinner, D.; Martin-McCaffrey, L.; Moffatt, B.; Haughn, G.** (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant physiology*. 127(3):998-1011.

- 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(1):296-306.
- Willige, B.C.; Ghosh, S.; Nill, C.; Zourelidou, M.; Dohmann, E.M.N.; Maier, A.; Schwechheimer, C.** (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell.* 19:1209–1220.
- Winkel-Shirley, B.** (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology.* 5(3):218-223.
- Wood, A.; Krogan, N.J.; Dover, J.; Schneider, J.; Heidt, J.; Boateng, M.A.; Dean, K.; Golshani, A.; Zhang, Y.; Greenblatt, J.F.; Johnston, M.; Shilatifard, A.** (2003). Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol. Cell.* 11:267–274.
- Wu, K.; Tian, L.; Malik, K.; Brown, D.; Miki, B.** (2000). Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal.* 22(1):19-27.
- Xi, W.; Liu, C.; Hou, X.; Yu, H.** (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in Arabidopsis. *The Plant cell.* 22(6):1733-1748.
- Xu, L.; Zhao, Z.; Dong, A.; Soubigou-Taconnat, L.; Renou, J.; Steinmetz, A.; Shen, W.** (2008). Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in Arabidopsis thaliana. *Molecular and cellular biology.* 28(4):1348-1360.
- Xu, L.; Ménard, R.; Berr, A.; Fuchs, J.; Cognat, V.; Meyer, D.; Shen, W. H.** (2009). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of FLC expression and repression of flowering in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal.* 57(2):279-288.
- Yamagishi, K.; Tatematsu, K.; Yano, R.; Preston, J.; Kitamura, S.; Takahashi, H.; McCourt, P.; Kamiya, Y.; Nambara, E.** (2009). CHOTTO1, a double AP2 domain protein of Arabidopsis thaliana, regulates germination and seedling growth under excess supply of glucose and nitrate. *Plant & cell physiology.* 50(2):330-340.
- Yamaguchi, S.** (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology.* 59:225–251.
- Yamaguchi, S.; Kamiya, Y.** (2000). Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol.* 41(3):251-7.
- Yamauchi, Y.; Ogawa, M.; Kuwahara, A.; Hanada, A.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.** (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell.* 16:367–378.
- Yamauchi, Y.; Takeda-Kamiya, N.; Hanada, A.; Ogawa, M.; Kuwahara, A.; Seo, M.; Kamiya, Y.; Yamaguchi, S.** (2007). Contribution of gibberellin deactivation by AtGA2ox2 to the suppression of germination of dark-imbibed Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell Physiol.* 48:555–561.
- Yano, R.; Kanno, Y.; Jikumaru, Y.; Nakabayashi, K.; Kamiya, Y.; Nambara, E.** (2009). CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in Arabidopsis. *Plant physiology.* 151(2):641-654.
- Yano, R.; Takebayashi, Y.; Nambara, E.; Kamiya, Y.; Seo, M.** (2013). Combining association mapping and transcriptomics identify HD2B histone deacetylase as a genetic factor associated with seed dormancy in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal: for cell and molecular biology.* 74(5):815-828.
- Yun, J.; Tamada, Y.; Kang, Y.; Amasino, R.** (2012). Arabidopsis trithorax-related3/SET domain GROUP2 is required for the winter-annual habit of Arabidopsis thaliana. *Plant & cell physiology.* 53(3):834-846.

BIBLIOGRAFÍA

- Zentella, R.; Zhang, Z.L.; Park, M.; Thomas, S.G.; Endo, A.; Murase, K.; Fleet, C.M.; Jikumaru, Y.; Nambara, E.; Kamiya, Y.; Sun, T.P.** (2007). Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19:3037–3057.
- Zhang, H.; Ogas, J.** (2009). An epigenetic perspective on developmental regulation of seed genes. *Molecular plant*. 2(4):610-627.
- Zhang, S.; Yang, C.; Peng, J.; Sun, S.; Wang, X.** (2009). GAS5, a regulator of flowering time and stem growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol. Biol.* 69:745–759.
- Zhang, X.; Germann, S.; Blus, B. J.; Khorasanizadeh, S.; Gaudin, V.; Jacobsen, S. E.** (2007). The Arabidopsis LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nature structural & molecular biology*. 14(9):869-871.
- Zhang, Z. L.; Ogawa, M.; Fleet, C. M.; Zentella, R.; Hu, J.; Heo, J. O.; Sun, T. P.** (2011). Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(5):2160-2165.
- Zhao, Y.; Zhou, D.X.** (2012). Epigenomic modification and epigenetic regulation in rice. *J. Genet. Genomics*. 39(7):307-15.
- Zhao, Z.; Yu, Y.; Meyer, D.; Wu, C.; Shen, W.** (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.* 7:1256–1260.
- Zheng, B.; Chen, X.** (2011). Dynamics of histone H3 lysine 27 trimethylation in plant development. *Current opinion in plant biology*. 14(2):123-129.
- Zheng, J.; Chen, F.; Wang, Z.; Cao, H.; Li, X.; Deng, X.; Soppe, W.J; Li, Y.; Liu, Y.** (2012). A novel role for histone methyltransferase KYP/SUVH4 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy. *The New phytologist*. 193(3):605-616.
- Zhou, J.; Neale, J.H.; Pomper, M.G.; Kozikowski, A.P.** (2005). NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 4:1015–1026.
- Zhou, Y.; Tan, B.; Luo, M.; Li, Y.; Liu, C.; Chen, C.; Yu, C.; Yang, S.; Dong, S.; Ruan, J.; Yuan, L.; Zhang, Z.; Zhao, L.; Li, C.; Chen, H.; Cui, Y.; Wu, K.; Huang, S.** (2013). HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *The Plant cell*. 25(2):134-148.
- Zhu, B.; Zheng, Y.; Pham, A.D.; Mandal, S.S.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Reinberg, D.** (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: The factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell*. 20:601–611.
- Zuo, J.; Niu, Q.W.; Chua, N.H.** (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24(2):265-73.
- Zwieniecki, M.A.; Melcher, P.J; Michele Holbrook, N.M.** (2001). Hydrogel control of xylem hydraulic resistance in plants. *Science*. 291(5506):1059-62.

ANEXO I



Tabla 9. Genes desregulados en el mutante *ebs* con con valores de $FC \geq 2$ y $pval \leq 0,05$ para los sobreexpresados y de $FC \leq -2$ y $pval \leq 0,05$ para los reprimidos.

Fold Change	pval (LiMMA)	ProbeID	Transcript ID	Gene Symbol Gene Description
11,92	0,00026324	260859_at	At1g43780	scpl44 scpl44 (serine carboxypeptidase-like 44); serine-type carboxypeptidase
9,63	0,00088364	259009_at	At3g09260	PYK10 PYK10; beta-glucosidase/ copper ion binding / fucosidase/ hydrolase
9,02	0,00005367	251372_at	At3g60520	--- putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:21518.
8,11	0,00303172	260130_s_at	At1g66280	BGLU21 BGLU21; catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
8,08	0,00031408	259382_s_at	At3g16430	JAL31 JAL31 (JACALIN-RELATED LECTIN 31); copper ion binding
7,45	0,00509622	260221_at	At1g74670	--- GAST1-like protein similar to GAST1 protein precursor
7,3	0,00051931	245688_at	At1g28290	AGP31 AGP31 (arabinogalactan-protein 31)
6,72	0,00096234	259878_at	At1g76790	[Vanilla planifolia];supported by full-length cDNA: Ceres:9016.
6,29	0,00014945	257673_at	At3g20370	--- unknown protein
5,87	0,00000525	248912_at	At5g45670	--- GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:18389.
5,7	0,00002028	263016_at	At1g23410	--- ubiquitin extension protein, putative similar to ubiquitin extension protein (UBQ5)
5,68	0,0002915	264313_at	At1g70410	BCA4 carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative
5,64	0,01422715	254791_at	At4g12910	scpl20 scpl20 (serine carboxypeptidase-like 20); serine-type carboxypeptidase
5,55	0,0080322	250780_at	At5g05290	ATEXPA2 ATEXPA2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A2)
5,52	0,0003187	261826_at	At1g11580	PMEPCRA PMEPCRA (METHYLESTERASE PCR A); enzyme inhibitor/ pectinesterase
5,41	0,00001261	262875_at	At1g64970	G-TMT G-TMT (GAMMA-TOCOPHEROL METHYLTRANSFERASE)
5,21	0,00030801	257809_at	At3g27060	TSO2 TSO2 (TSO meaning ugly in Chinese); oxidoreductase
5,08	0,00000272	264262_at	At1g09200	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 10388.
4,8	0,00547824	247210_at	At5g65020	ANNAT2 ANNAT2 (Annexin Arabidopsis 2); calcium ion binding
4,75	0,00055886	262181_at	At1g78060	--- xylosidase, putative similar to xylosidase Gl:2102655 from [Aspergillus niger]
4,66	0,00073211	267158_at	At2g37640	EXP3 EXP3
4,62	0,00007614	256589_at	At3g28740	CYP81D1 CYP81D1; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase
4,54	0,00403591	246250_at	At4g36880	CP1 CP1 (CYSTEINE PROTEINASE1); cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase
4,53	0,00048409	263404_s_at	At2g04100	--- hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAC27412
4,5	0,00066168	250214_at	At5g13870	EXGT-A4 EXGT-A4 (ENDOXYLOGUCAN TRANSFERASE A4); hydrolase
4,44	0,00002258	263431_at	At2g22170	--- unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15081.
4,36	0,0019549	248427_at	At5g51750	ATSBT1.3 (ARABIDOPSIS THALIANA SUBTILASE 1.3); identical protein binding
4,36	0,00008241	257197_at	At3g23800	SBP3 SBP3 (selenium-binding protein 3); selenium binding
4,34	0,00128572	247097_at	At5g66460	--- mannan endo-1,4-beta-mannosidase
4,34	0,0154998	253534_at	At4g31500	CYP83B1 CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1); oxidoreductase,
4,32	0,00255212	262733_s_at	At1g28670	--- lipase identical to lipase GB:AAA93262 Gl:1145627 [Arabidopsis thaliana]
4,18	0,00105919	249817_at	At5g23820	--- putative protein similar to unknown protein (pir T00970)
4,16	0,00088876	262230_at	At1g68560	XYL1 (ALPHA-XYLOSIDASE 1); alpha-N-arabinofuranosidase/ hydrolase
4,03	0,00015892	256666_at	At4g00390	--- putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:157614.
4,02	0,03226489	246855_at	At5g26280	--- putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
4,02	0,00291204	259327_at	At3g16460	putative lectin contains Pfam profile: PF01419 jacalin-like lectin domain
3,97	0,00060702	266588_at	At2g14890	AGP9 AGP9 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 9)
3,91	0,00001497	261080_at	At1g07370	PCNA1 (PROLIFERATING CELLULAR NUCLEAR ANTIGEN); DNA binding
3,87	0,00280291	257798_at	At3g15950	NAI2 NAI2
3,84	0,00168116	263153_s_at	At1g54010	myrosinase-associated protein
3,79	0,00045117	253947_at	At4g26760	MAP65-2 MAP65-2
3,79	0,00202232	258369_at	At3g14310	ATPME3 ATPME3; pectinesterase
3,71	0,00004857	247136_at	At5g66170	--- senescence-associated protein
3,71	0,00001283	263730_at	At1g60090	BGLU4 (BETA GLUCOSIDASE 4); catalytic/ cation binding / hydrolase
3,62	0,02652231	256299_at	At1g69530	ATEXPA1 ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)
3,62	0,0012924	262958_at	At1g54410	--- water stress-induced protein, putative similar to water stress-induced protein
3,61	0,00037827	256125_at	At1g18250	ATLP-1 ATLP-1
3,59	0,00138915	256302_at	At1g69526	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 33120.
3,55	0,0000407	249121_at	At5g43830	--- aluminum-induced protein-like ; supported by full-length cDNA: Ceres: 12484.
3,52	0,00056201	253255_at	At4g34760	putative auxin-regulated protein auxin-induced protein X15, Glycine max, PIR2:JQ109
3,45	0,01117477	265990_at	At2g24280	--- putative poly(carboxypeptidase)
3,43	0,00424798	259935_at	At1g71250	putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase
3,41	0,00223127	248551_at	At5g50200	WR3 WR3 (WOUND-RESPONSIVE 3); nitrate transmembrane transporter
3,38	0,00083539	247348_at	At5g63810	BGAL10 BGAL10 (beta-galactosidase 10); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding
3,38	0,00000084	264774_at	At1g22890	--- unknown protein
3,35	0,03254712	249495_at	At5g39100	GLP6 GLP6 (GERMIN-LIKE PROTEIN 6); manganese ion binding / nutrient reservoir
3,35	0,000401	261129_at	At1g04820	TUA4 TUA4; structural constituent of cytoskeleton
3,33	0,00040398	261745_at	At1g08500	unknown protein
3,29	0,00016398	250517_at	At5g08260	scpl35 scpl35 (serine carboxypeptidase-like 35); serine-type carboxypeptidase
3,2	0,00002969	246585_at	At5g14750	ATMYB66 (MYB DOMAIN PROTEIN 66); DNA binding / protein binding / transcription factor
3,19	0,04220432	251124_s_at	At5g01040	LAC8 LAC8 (laccase 8); laccase
3,16	0,00333928	253600_at	At4g30810	scpl29 scpl29 (serine carboxypeptidase-like 29); serine-type carboxypeptidase
3,15	0,00337624	245270_at	At4g14960	TUA6 TUA6; structural constituent of cytoskeleton
3,08	0,0031421	257574_at	At3g20710	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm
3,06	0,00077438	256970_at	At3g21090	ABC transporter
3,06	0,00021832	258857_at	At3g02110	scpl25 scpl25 (serine carboxypeptidase-like 25); serine-type carboxypeptidase
3,05	0,00104462	263426_at	At2g31570	ATGPX2 ATGPX2 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 2); glutathione peroxidase
3,03	0,00253266	261412_at	At1g07890	APX1 APX1 (ascorbate peroxidase 1); L-ascorbate peroxidase
3	0,00013152	260568_at	At2g43570	--- endochitinase isolog
2,98	0,01844124	260097_at	At1g73220	ATOCT1 (Arabidopsis thaliana ORGANIC CATION/CARNITINE TRANSPORTER1)
2,97	0,00003417	247988_at	At5g56910	--- putative protein similar to unknown protein (pir C71422)
2,97	0,00092128	259384_at	At3g16450	putative lectin contains Pfam profile: PF01419 jacalin-like lectin domain
2,95	0,00001448	264887_at	At1g23120	unknown protein similar to ripening-induced protein, gp AJ001449 2465015 and major latex protein
2,93	0,00026874	256597_at	At3g28500	acidic ribosomal protein P2b (rpp2b)
2,91	0,00907411	245325_at	At4g14130	XTR7 (XYLOGUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds
2,91	0,00071195	246184_at	At5g20950	beta-D-glucan exohydrolase - like protein beta-D-glucan exohydrolase, Nicotiana tabacum
2,91	0,00288347	260914_at	At1g02640	BXL2 BXL2 (BETA-XYLOSIDASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
2,9	0,00579619	250109_at	At5g15230	GASA4 GASA4 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4)
2,9	0,00013395	253421_at	At4g32340	putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana

ANEXO I

2,9	0,00264576	267358_at	At2g39890	PROT1 (PROLINE TRANSPORTER 1); L-proline transmembrane transporter
2,88	0,00000936	249055_at	At5g44460	--- calmodulin-like protein
2,88	0,00003818	251919_at	At3g53800	putative protein Hsp70 binding protein
2,88	0,00114669	261023_at	At1g12200	unknown protein similar to unknown protein GB:AAF34848 GI:6997186 from [Arabidopsis thaliana]
2,88	0,00398045	262373_at	At1g73120	--- hypothetical protein predicted by genefinder
2,86	0,00440003	256832_at	At3g22880	DMC1 (DISRUPTION OF MEIOTIC CONTROL 1); ATP binding / DNA binding
2,86	0,00627802	266865_at	At2g29980	FAD3 FAD3 (FATTY ACID DESATURASE 3); omega-3 fatty acid desaturase
2,85	0,00078213	250752_at	At5g05690	CPD (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF); electron carrier/ heme binding
2,85	0,00260971	251065_at	At5g01870	--- lipid-transfer protein-like lipid-transfer protein - Nicotiana glauca, EMBL:AF151214
2,84	0,00004976	263496_at	At2g42570	--- unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 17752.
2,82	0,00124002	245612_at	At4g14440	HCD1 (3-HYDROXYACYL-COA DEHYDRATASE 1); carnitine racemase/ catalytic
2,81	0,00023271	266928_at	At2g45790	PMM PMM (PHOSPHOMANNOMUTASE); phosphomannomutase
2,79	0,00008269	246550_at	At5g14920	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
2,79	0,00012313	248619_at	At5g49630	AAP6 (AMINO ACID PERMEASE 6); acidic amino acid transmembrane transporter
2,77	0,00005343	253008_at	At4g38210	ATEXPA20 ATEXPA20 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A20)
2,74	0,00004601	263741_at	At2g20620	--- hypothetical protein predicted by gensecan
2,74	0,00058329	266421_at	At2g38540	LP1 LP1; calmodulin binding
2,73	0,00008276	266426_x_at	At2g07140	--- hypothetical protein predicted by gensecan and genefinder
2,72	0,00006588	262539_at	At1g17200	unknown protein Location of est 136A23T7 (gb T45563)
2,71	0,00259035	260506_at	At1g47210	CYCA3;2 cyclin family protein
2,7	0,01831317	249895_at	At5g22500	FAR1 (FATTY ACID REDUCTASE 1); fatty acyl-CoA reductase (alcohol-forming)/ oxidoreductase
2,7	0,00000855	257938_at	At3g19820	DWF1 DWF1 (DWARF 1); calmodulin binding / catalytic
2,69	0,00343151	247191_at	At5g65310	ATHB5 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 5); transcription factor
2,69	0,00311517	252348_at	At3g48140	--- B12D-like protein B12D protein - Hordeum vulgare, PIR2:S60284
2,68	0,00010182	264462_at	At1g10200	WLIM1 WLIM1; transcription factor/ zinc ion binding
2,68	0,00005904	266297_at	At2g29570	PCNA2 (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 2); DNA binding
2,68	0,02332274	267154_at	At2g30870	GSTF10 (HALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10); glutathione binding
2,67	0,00377663	246098_at	At5g20400	ethylene-forming-enzyme-like dioxygenase-like protein ethylene-forming-enzyme-like dioxygenase
2,65	0,00022536	261639_at	At1g50010	TUA2 TUA2; structural constituent of cytoskeleton
2,6	0,00120491	264260_at	At1g09210	CRT2 calreticulin 2 (CRT2)
2,59	0,00032262	247600_at	At5g60890	MYB34 (MYB DOMAIN PROTEIN 34); DNA binding / kinase/ transcription activator
2,58	0,0012753	265374_at	At2g06520	PSBX PSBX (photosystem II subunit X)
2,57	0,03937868	253073_at	At4g37410	CYP81F4; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
2,57	0,0115316	255578_at	At4g01450	--- predicted protein of unknown function
2,56	0,04764649	246825_at	At5g26260	--- putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
2,56	0,00008443	255590_at	At4g01610	cathepsin B-like cysteine protease
2,55	0,01505912	262784_at	At1g10760	SEX1 SEX1 (STARCH EXCESS 1); alpha-glucan, water dikinase
2,54	0,00017525	261368_at	At1g53070	--- protein kinase, putative similar to many predicted protein kinases
2,54	0,00020279	263373_at	At2g20515	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 24343.
2,53	0,00055893	252622_at	At3g45310	cysteine proteinase AALP
2,52	0,00885676	260986_at	At1g53580	GLY3 GLY3 (GLYOXALASE II 3); hydrolase/ hydroxyacylglutathione hydrolase
2,51	0,00119996	266229_at	At2g28840	--- putative RING zinc finger ankyrin protein
2,5	0,00077264	259366_at	At1g13280	AOC4 AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4); allene-oxide cyclase
2,48	0,00641736	267266_at	At2g23150	NRAMP3 (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 3)
2,47	0,02244929	247037_at	At5g67070	RALFL34 RALFL34 (ralf-like 34); signal transducer
2,47	0,00080043	262826_at	At1g13080	CYP71B2 (CYTOCHROME P450 71B2); electron carrier/ iron ion binding / monooxygenase
2,45	0,00911874	250496_at	At5g09650	ATPPa6 (Arabidopsis thaliana pyrophosphorylase 6); inorganic diphosphatase/ pyrophosphatase
2,45	0,00060167	260528_at	At2g47260	WRKY23 WRKY23; transcription factor
2,45	0,0021448	266119_at	At2g02100	LCR69 LCR69 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 69); peptidase inhibitor
2,43	0,0004969	245401_at	At4g17670	--- senescence-associated protein-related
2,43	0,00002981	261831_at	At1g10630	ATARFA1F (ARABIDOPSIS THALIANA ADP-RIBOSYLATION FACTOR A1F); GTP binding
2,42	0,00002444	247192_at	At5g65360	--- histone H3 (sp P05203) ; supported by cDNA: gi_13926210_gb_AF370577.1_AF370577
2,42	0,01218698	253608_at	At4g30290	XTH19 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 19); hydrolase
2,42	0,00057074	262575_at	At1g15210	PDR7 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 7); ATPase
2,42	0,01133976	266070_at	At2g18660	EXLB3 EXLB3 (EXPANSIN-LIKE B3 PRECURSOR)
2,41	0,03874743	255822_at	At2g40610	ATEXPA8 ATEXPA8 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A8)
2,41	0,01382747	264052_at	At2g22330	CYP79B3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
2,4	0,00237226	255479_at	At4g02380	SAG21 SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)
2,39	0,00117672	248614_at	At5g49560	--- putative protein similar to unknown protein (pir T08406)
2,39	0,00225839	250000_at	At5g18650	--- putative protein PGPD14 - Petunia x hybrida, EMBL:AF049930
2,37	0,00063477	259131_at	At3g02180	SP1L3 SP1L3 (SPIRAL 1-LIKE3)
2,36	0,00453112	247450_at	At5g62350	--- ripening-related protein - like ripening-related protein, Vitis vinifera, EMBL:VVI237985
2,35	0,00056628	248419_at	At5g51550	EXL3 EXL3 (EXORDIUM LIKE 3)
2,34	0,00221478	251846_at	At3g54560	HTA11 HTA11; DNA binding
2,33	0,00889753	250992_at	At5g02260	ATEXPA9 ATEXPA9 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A9)
2,32	0,00241989	246831_at	At5g26340	MSS1; carbohydrate transmembrane transporter/ hexose:hydrogen symporter
2,32	0,00073096	254789_at	At4g12880	--- blue copper-binding protein, 15K (lamin) ;supported by full-length cDNA: Ceres:41510.
2,31	0,01496973	252024_at	At3g52880	ATMDAR1 monodehydroascorbate reductase, putative
2,31	0,00115153	257911_at	At3g25530	GLYR1 (GLYOXYLATE REDUCTASE 1); 3-hydroxybutyrate dehydrogenase
2,31	0,00391013	261330_at	At1g44900	MCM2 ATP binding / DNA binding / DNA-dependent ATPase
2,3	0,01227593	246114_at	At5g20250	DIN10 DIN10 (DARK INDUCIBLE 10); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
2,3	0,03133619	258641_at	At3g08030	--- unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:27471.
2,29	0,00398405	267175_s_at	At2g37620	ACT1 ACT1 (ACTIN 1); structural constituent of cytoskeleton
2,28	0,01154683	245944_at	At5g19520	MSL9 (MECHANOSENSITIVE CHANNEL OF SMALL CONDUCTANCE-LIKE 9)
2,28	0,00176067	250455_at	At5g09980	PROPEP4 PROPEP4 (Elicitor peptide 4 precursor)
2,28	0,00207233	258151_at	At3g18080	BGLU44 (B-S GLUCOSIDASE 44); (R)-amygdalin beta-glucosidase
2,27	0,00133523	252184_at	At3g50660	DWF4 DWF4 (DWARF 4); steroid 22-alpha hydroxylase
2,27	0,00114553	254201_at	At4g24130	--- putative protein predicted proteins
2,27	0,00129354	258437_at	At3g16560	--- unknown protein contains protein phosphatase 2C domain
2,27	0,00305163	260481_at	At1g10960	ATFD1 (FERREDOXIN 1); 2 iron, 2 sulfur cluster binding / electron carrier
2,27	0,0080523	266533_s_at	At2g16850	PIP2;8 PIP2;8 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;8); water channel
2,26	0,0024173	255558_at	At4g01900	GLB1 GLB1 (GLNB1 HOMOLOG); acetylglutamate kinase regulator
2,26	0,00207758	266118_at	At2g02130	LCR68 LCR68 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 68); peptidase inhibitor
2,26	0,00349098	267078_at	At2g40960	--- unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:2337.

2,25	0,00902217	252927_at	At4g39090	RD19 (RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19); cysteine-type endopeptidase
2,25	0,00017067	256744_at	At3g29350	AHP2 (HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 2); protein binding
2,24	0,00090375	246794_at	At5g27430	--- signal peptidase ; supported by cDNA: gi_3044217_gb_AF057144.1_AF057144
2,24	0,00012728	263264_at	At2g38810	HTA8 HTA8 (HISTONE H2A 8); DNA binding
2,22	0,0025168	249049_at	At5g44340	TUB4 TUB4; structural constituent of cytoskeleton
2,22	0,00290208	250366_at	At5g11420	--- putative protein predicted proteins in castor bean, Arabidopsis thaliana and alfalfa
2,22	0,00207353	252316_at	At3g48700	ATCXE13 ATCXE13 (ARABIDOPSIS THALIANA CARBOXYESTERASE 13); hydrolase
2,22	0,02098198	263758_s_at	At2g21260	M6PR mannose 6-phosphate reductase (NADPH-dependent), putative
2,21	0,00132797	248139_at	At5g54970	--- putative protein similar to unknown protein [pir]T04819
2,21	0,00188768	249775_at	At5g24160	SQE6 SQE6 (SQUALENE MONOOXYGENASE 6); FAD binding / oxidoreductase
2,21	0,00006257	266838_at	At2g25980	--- similar to jasmonate-inducible proteins from Brassica napus
2,2	0,00136739	248511_at	At5g50375	CP11 CP11 (CYCLOPROPYL ISOMERASE); cycloolefinol cycloisomerase
2,2	0,01496084	258750_at	At3g05910	--- putative pectinacetyltransferase similar to GB:CAA67728 from [Vigna radiata]
2,19	0,00577445	249147_at	At5g43330	--- cytosolic malate dehydrogenase ; supported by full-length cDNA: Ceres:40174.
2,18	0,00002373	247651_at	At5g59870	HTA6 HTA6; DNA binding
2,18	0,00270049	264590_at	At2g17710	--- unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:1011.
2,17	0,00095663	250208_at	At5g14000	anac084 anac084 (Arabidopsis NAC domain containing protein 84); transcription factor
2,17	0,03810639	252022_at	At3g52930	fructose biphosphate aldolase - like protein fructose biphosphate aldolase, garden pea
2,17	0,01520281	260274_at	At1g80460	NHO1 NHO1 (nonhost resistance to P. s. phaseolicola 1); carbohydrate kinase/ glycerol kinase
2,17	0,00037026	261912_s_at	At1g66000	--- unknown protein
2,16	0,01708161	247627_at	At5g60360	AALP AALP (Arabidopsis aleurain-like protease); cysteine-type peptidase
2,16	0,00964544	253437_at	At4g32460	--- putative protein mRNAs from Ricinus communis and Medicago sativa, Z81012 and L36159
2,16	0,00270799	257674_at	At3g20390	--- translational inhibitor protein, putative similar to GB:NP_005827 from [Homo sapiens]
2,16	0,00296285	263896_at	At2g21930	--- hypothetical protein predicted by genscan
2,15	0,00629003	253609_at	At4g30190	AHA2 AHA2; ATPase/ hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism
2,15	0,0059714	264204_at	At1g22710	SUC2 (SUCROSE-PROTON SYMPORTER 2); carbohydrate transmembrane transporter
2,15	0,00000963	267349_at	At2g40010	--- 60S acidic ribosomal protein P0
2,13	0,00380255	246481_s_at	At5g15960	KIN1 KIN1
2,13	0,0044381	250125_at	At5g16390	CAC1 (CHLOROPLASTIC ACETYLCOENZYME A CARBOXYLASE 1); acetyl-CoA carboxylase
2,12	0,00463439	258368_at	At3g14240	subtilisin-like serine protease
2,12	0,01790374	262749_at	At1g28580	--- lipase, putative contains Pfam profile: PF00657 Lipase/Acylhydrolase with GDSL-like motif
2,11	0,00653096	245044_at	At2g26500	petM cytochrome b6f complex subunit (petM), putative
2,11	0,00481165	245388_at	At4g16410	--- hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:2505.
2,11	0,00116724	251109_at	At5g01600	FER1 ATFER1; ferric iron binding / iron ion binding
2,11	0,00747259	254110_at	At4g25260	--- putative protein pectinesterase - Citrus sinensis, PID:g2098705
2,11	0,01336082	254971_at	At4g10380	NIP5;1 NIP5;1; arsenite transmembrane transporter/ boron transporter/ water channel
2,1	0,00797978	250374_at	At5g11530	EMF1 EMF1 (embryonic flower 1); transcription regulator
2,1	0,03705063	266166_at	At2g28080	--- putative glucosyltransferase ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13761.
2,09	0,01659326	256516_at	At1g66150	TMK1 (TRANSMEMBRANE KINASE 1); transmembrane receptor protein serine/threonine kinase
2,09	0,02682237	258276_at	At3g15710	putative signal peptidase 21kDa subunit
2,09	0,00266828	258613_at	At3g02870	VTC4; 3(2),5-bisphosphate nucleotidase/ L-galactose-1-phosphate phosphatase
2,09	0,00066447	259616_at	At1g47960	CVIF1 (CELL WALL / VACUOLAR INHIBITOR OF FRUCTOSIDASE 1); enzyme inhibitor
2,09	0,00243889	260884_at	At1g29240	unknown protein similar to unknown protein GB:AAF18609 GI:6598419 from [Arabidopsis thaliana]
2,09	0,00551615	264217_at	At1g60190	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm
2,09	0,00060345	265998_at	At2g24270	ALDH11A3; 3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2,08	0,00983527	246626_at	At1g56700	--- unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:21415.
2,08	0,00215133	251487_at	At3g59760	OASC (O-ACETYL SERINE (THIOL) LYASE ISOFORM C); ATP binding / cysteine synthase
2,08	0,0412553	255942_at	At1g22360	ATUGT85A2 (UDP-glucosyl transferase 85A2); UDP-glycosyltransferase/ glucuronosyltransferase
2,08	0,02136447	257339_s_at	mitochondria	--- ATP synthase subunit 9
2,08	0,02060482	260551_at	At2g43510	ATTI1 ATTI1; serine-type endopeptidase inhibitor
2,08	0,0037941	263777_at	At2g46450	ATCNGC12 ATCNGC12; cation channel/ cyclic nucleotide binding / ion channel
2,08	0,01302935	263787_at	At2g46420	--- unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450510_gb_AY052357.1_
2,07	0,02114618	246919_at	At5g25460	--- putative protein hypothetical protein - Ricinus communis, EMBL:Z81012
2,07	0,00015016	247947_at	At5g57090	EIR1 (ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1); auxin efflux transmembrane transporter
2,07	0,00046704	253218_at	At4g34980	SLP2 SLP2; serine-type peptidase
2,07	0,00060504	255513_at	At4g02060	PRL (PROLIFERA); ATP binding / DNA binding / DNA-dependent ATPase/ nucleotide binding
2,07	0,00143343	264439_at	At1g27450	APT1 (ADENINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE 1); adenine phosphoribosyltransferase
2,06	0,00185104	246842_at	At5g26731	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 30174.
2,06	0,000398	251183_at	At3g62630	--- putative protein putative protein At2g15760 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC006438
2,06	0,00305636	263295_at	At2g14210	AGL44 AGL44 (AGAMOUS-LIKE 44); DNA binding / transcription factor
2,05	0,00285467	253606_at	At4g30530	--- putative protein component of aniline dioxygenase
2,04	0,03873908	250444_at	At5g10560	--- beta-xylosidase - like protein beta-xylosidase, Aspergillus nidulans, EMBL:ANX1ND
2,03	0,00114667	250317_at	At5g12250	TUB6 TUB6 (BETA-6 TUBULIN); structural constituent of cytoskeleton
2,02	0,00942507	248006_at	At5g56250	HAP8 HAP8 (HAPLESS 8)
2,02	0,0094981	249267_at	At5g41600	BTI3 BTI3 (VIRB2-INTERACTING PROTEIN 3)
2,02	0,00144468	267092_at	At2g38120	AUX1 (AUXIN RESISTANT 1); amino acid transmembrane transporter/ auxin binding
2,02	0,00340935	267377_at	At2g26250	KCS10 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 10); acyltransferase/ catalytic/ transferase
2,01	0,00465332	248461_s_at	At5g50950	FUM1 FUM1 (FUMARASE 1); catalytic/ fumarate hydratase
2,01	0,04052333	253627_at	At4g30650	--- low temperature and salt responsive protein
2,01	0,0033248	267590_at	At2g39700	ATEXPA4 ATEXPA4 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A4)
2	0,00619582	253282_at	At4g34120	LEJ1 LEJ1 (LOSS OF THE TIMING OF ET AND JA BIOSYNTHESIS 1)
-2	0,0066691	252102_at	At3g50970	LTI30 LTI30 (LOW TEMPERATURE-INDUCED 30)
-2,01	0,00157213	245136_at	At2g45210	--- putative auxin-regulated protein
-2,01	0,01994116	260540_at	At2g43500	--- hypothetical protein predicted by genefinder
-2,01	0,00085542	260662_at	At1g19540	--- 2-hydroxyisoflavone reductase, putative similar to PIR:T08106 from [Betula pendula]
-2,01	0,000382	262527_at	At1g17010	SRG1-like protein Strong homology to SRG1 protein
-2,02	0,00371442	252092_at	At3g51420	SSL4 SSL4 (STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 4); strictosidine synthase
-2,02	0,00103524	257081_at	At3g30460	RING zinc finger protein contains Pfam profile: PF00097 zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
-2,05	0,00676245	247128_at	At5g66110	--- atfp6-like protein
-2,05	0,022455	249688_at	At5g36160	--- putative protein tyrosine aminotransferase-like; also similar to nicotianamine aminotransferase
-2,05	0,02777734	251576_at	At3g58200	--- putative protein several hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana
-2,05	0,00309673	262281_at	At1g68570	peptide transporter
-2,06	0,0080573	250296_at	At5g12020	HSP17.6II HSP17.6II (17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN)
-2,06	0,03576209	256518_at	At1g66080	--- hypothetical protein

ANEXO I

-2.07	0,01686404	252543_at	At3g45780	PHOT1 (PHOTOTROPIN 1); FMN binding / blue light photoreceptor/ kinase/ protein binding
-2.07	0,00048442	259782_at	At1g29680	--- unknown protein
-2.08	0,00014702	249212_at	At5g42690	--- putative protein strong similarity to unknown protein (emb CAB16786.1)
-2.08	0,003393	250938_at	At5g03180	--- putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
-2.08	0,03422393	252482_at	At3g46670	UGT76E11 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 76E11)
-2.09	0,00154335	247074_at	At5g66590	--- putative protein contains similarity to pathogenesis-related protein
-2.1	0,0035542	248138_at	At5g54960	PDC2 (pyruvate decarboxylase-2); carboxy-lyase/ catalytic/ pyruvate decarboxylase
-2.1	0,00075428	256159_at	At1g30135	JAZ8 JAZ8 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 8)
-2.1	0,01048281	265913_at	At2g25625	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 465.
-2.11	0,00705286	245749_at	At1g51090	proline-rich protein, putative similar to proline-rich protein GI:3242079 from [Capsicum annuum]
-2.11	0,00032788	262977_at	At1g75490	transcription factor, putative similar to DREB2A GB:BAA33794 GI:3738230 from At
-2.11	0,00019463	266126_at	At2g45040	--- putative metalloproteinase ; supported by cDNA: gi_3128476_gb_AF062640.1_AF062640
-2.12	0,00560028	245807_at	At1g46768	RAP2.1 RAP2.1 (related to AP2 1); DNA binding / transcription factor
-2.12	0,00791773	258923_at	At3g10450	SCPL7 SCPL7 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 7); serine-type carboxypeptidase
-2.12	0,00013748	260309_at	At1g70580	AOAT2 (ALANINE-2-OXOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE 2)
-2.12	0,00350527	264953_at	At1g77120	ADH1 ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1); alcohol dehydrogenase
-2.12	0,00534269	267026_at	At2g38340	DREB-like AP2 domain transcription factor DRE binding protein
-2.13	0,00067752	250826_at	At5g05220	--- unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450646_gb_AY052691.1_
-2.13	0,00746394	253177_s_at	At4g35150	--- O-methyltransferase - like protein caffeic acid O-methyltransferase, Pinus taeda, gb:U39301
-2.15	0,01067243	254396_at	At4g21680	--- peptide transporter - like protein peptide transporter (ptr1) - Hordeum vulgare, AF023472
-2.17	0,00785969	262656_at	At1g14200	--- zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
-2.17	0,00035601	263985_at	At2g42750	--- DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
-2.19	0,00076134	251066_at	At5g01880	--- zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
-2.2	0,00276617	262635_at	At1g06570	PDS1 PDS1 (PHYTOENE DESATURATION 1); 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
-2.2	0,00016199	266321_at	At2g46660	CYP78A6; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.22	0,00052869	249038_at	At5g44280	RING1A RING1A (RING 1A); protein binding / zinc ion binding
-2.23	0,00377344	252825_at	At4g39890	AtRABH1c AtRABH1c (Arabidopsis Rab GTPase homolog H1c); GTP binding / protein binding
-2.23	0,00872838	255550_at	At4g01970	AtSTS (Arabidopsis thaliana stachyose synthase); hydrolase
-2.23	0,00047345	258263_at	At3g15780	--- unknown protein
-2.23	0,00306849	258322_at	At3g22740	HMT3 HMT3; homocysteine S-methyltransferase
-2.23	0,00470791	258939_at	At3g10020	unknown protein predicted by genefinder, multiple est matches
-2.24	0,00141851	252415_at	At3g47340	ASN1 (GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1); asparagine synthase
-2.24	0,0100159	258880_at	At3g06420	ATG8H ATG8H (autophagy 8h); microtubule binding
-2.25	0,00026486	259911_at	At1g72880	CAD1 cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative
-2.26	0,00312726	259350_at	At3g05140	RBK2 (Rop Binding protein Kinases 2); ATP binding / kinase/ protein kinase
-2.27	0,00022232	251202_at	At3g63040	--- putative protein predicted protein, C. elegans
-2.27	0,01129205	259528_at	At1g12330	--- hypothetical protein
-2.28	0,00377599	259410_at	At1g13340	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-2.28	0,00182596	265425_at	At2g20770	GCL2 GCL2 (GCR2-LIKE 2); catalytic
-2.28	0,00253257	265675_at	At2g32120	HSP70T-2 HSP70T-2 (HEAT-SHOCK PROTEIN 70T-2); ATP binding
-2.29	0,0002245	264821_at	At1g03470	--- hypothetical protein predicted by genefinder
-2.31	0,00371979	248544_at	At5g50240	PMT2 (PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2)
-2.31	0,00023574	255787_at	At2g33590	--- putative cinnamoyl-CoA reductase highly similar to F4P9.37
-2.31	0,00033544	265099_at	At1g03990	--- unknown protein Location of EST 248L9T7, gb AA713296
-2.35	0,03444627	246018_at	At5g10695	--- Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 103171.
-2.38	0,00397343	245501_at	At4g15620	--- integral membrane family protein
-2.39	0,00801122	246242_at	At4g36600	--- late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein
-2.39	0,00047948	265567_at	At2g05580	--- unknown protein predicted by genefinder
-2.43	0,00664737	245243_at	At1g44414	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-2.43	0,00215396	252515_at	At3g46230	HSP17.4 ATHSP17.4
-2.43	0,00078113	262047_at	At1g80160	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm; supported by full-length cDNA: Ceres:21663.
-2.48	0,00212823	246222_at	At4g36900	RAP2.10 RAP2.10 (related to AP2 10); DNA binding / transcription factor
-2.51	0,00154352	247172_at	At5g65550	--- anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase
-2.51	0,00336629	265269_at	At2g42950	--- hypothetical protein predicted by genscan
-2.52	0,00009578	266901_at	At2g34600	JAZ7 JAZ7 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7)
-2.53	0,02269525	260976_at	At1g53540	--- 17.6 kDa heat shock protein (AA 1-156) identical to GI:4376161 from (Arabidopsis thaliana)
-2.56	0,01457271	254339_at	At4g22100	BGLU3 (BETA GLUCOSIDASE 2); catalytic/ cation binding / hydrolase
-2.56	0,00178915	256454_at	At1g75280	--- NADPH oxidoreductase, putative similar to GI:1708420 from [Arabidopsis thaliana]
-2.6	0,01000017	246241_at	At4g37050	PLP4 PLP4 (PATATIN-LIKE PROTEIN 4); nutrient reservoir
-2.62	0,00800493	252563_at	At3g45970	ATEXLA1 ATEXLA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE A1)
-2.66	0,00019282	253930_at	At4g26740	ATS1 ATS1 (ARABIDOPSIS THALIANA SEED GENE 1); calcium ion binding
-2.67	0,00017392	250793_at	At5g05600	--- leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:13012.
-2.69	0,00289838	248332_at	At5g52640	ATHSP90.1 ATHSP90.1 (HEAT SHOCK PROTEIN 90.1); ATP binding / unfolded protein binding
-2.77	0,00010371	251350_at	At3g61040	CYP76C7; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.77	0,0082762	261065_at	At1g07500	--- hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-2.81	0,00115856	247866_at	At5g57550	XTR3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds
-2.85	0,00198112	254691_at	At4g17840	--- hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 38412.
-2.85	0,00008714	266265_at	At2g29340	--- putative tropinone reductase ; supported by cDNA: gi_14334839_gb_AY035093.1_
-2.89	0,00894496	248959_at	At5g45630	--- putative protein similar to unknown protein (pir T05035)
-2.95	0,01209667	266294_at	At2g29500	hsp17.6B-CI 17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)
-2.96	0,00212532	248188_at	At5g54070	HSAF9 AT-HSAF9; DNA binding / transcription factor
-3.13	0,00358865	255049_at	At4g09610	GASA2 GASA2 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 2)
-3.15	0,00002031	261007_at	At1g26400	hypothetical protein similar to reticuline oxidase-like protein GB:CAB45849 GI:5262223 from At
-3.15	0,00092156	261755_at	At1g08170	histone H2B, putative similar to GB:AAC15915 from (Chaetopterus variopeatus)
-3.22	0,0035136	260248_at	At1g74310	ATHSP101 ATHSP101 (ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK PROTEIN 101); ATP
-3.23	0,00363298	261838_at	At1g16030	Hsp70b Hsp70b (heat shock protein 70B); ATP binding
-3.23	0,02289342	262911_s_at	At1g59860	7.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)/17.8 kDa class I heat shock protein (HSP17.8-CI)
-3.35	0,01321398	262148_at	At1g52560	hsp26.5-P 26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)
-3.37	0,00036606	253090_at	At4g36360	BGAL3 (beta-galactosidase 3); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding / sugar binding
-3.38	0,00238184	263150_at	At1g54050	hsp17.4-CIII 17.4 kDa class III heat shock protein (HSP17.4-CIII)
-3.67	0,00209687	249454_at	At5g39520	--- expressed protein predicted protein
-3.71	0,00286749	266590_at	At2g46240	BAG6 BAG6 (BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6); calmodulin binding / protein binding
-3.84	0,00000477	250662_at	At5g07010	ST2A ST2A (SULFOTRANSFERASE 2A); hydroxyjasmonate sulfotransferase/ sulfotransferase
-3.92	0,00110005	249465_at	At5g39720	AIG2L AIG2L (AVIRULENCE INDUCED GENE 2 LIKE PROTEIN)

-4,09	0,01159223	254333_at	At4g22753	SMO1-3 (STEROL 4-ALPHA METHYL OXIDASE 1-3)
-4,78	0,00073144	265094_at	At1g03890	putative cruciferin 12S seed storage protein
-5,36	0,00034115	254865_s_at	At4g12190	--- putative protein, fragment other predicted proteins, Arabidopsis thaliana; fragment
-5,75	0,00001284	250620_at	At5g07190	ATS3 ATS3 (ARABIDOPSIS THALIANA SEED GENE 3)

ANEXO II



Tabla 10. Genes desregulados en el mutante *spt* con valores de $FC \geq 2$ y $p \leq 0,05$ para los sobreexpresados y de $FC \leq -2$ y $p \leq 0,05$ para los reprimidos.

Fold Change	pval (LiMMA)	ProbeID	Transcript ID	Gene Symbol Gene Description
36.05	0.00001512	260221_at	At1g74670	GASA6 (GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6)
24.92	0.00002222	250780_at	At5g05290	ATEXPA2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A2)
20.23	0.00000059	248912_at	At5g45670	GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:18389.
19.84	0.00000023	247210_at	At5g65020	ANNAT2 (Annexin Arabidopsis 2); calcium ion binding / calcium-dependent phospholipid binding
18.78	0.00001055	250109_at	At5g15230	GASA4 (GAST1 PROTEIN HOMOLOG 4)
18.37	0.00000005	246250_at	At4g36880	CP1 (CYSTEINE PROTEINASE1); cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase
18.25	0.00004237	259009_at	At3g09260	PYK10: beta-glucosidase/ copper ion binding / fucosidase/ hydrolase,
17.76	0.00001176	256299_at	At1g69530	ATEXPA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1)
16.64	0.00000092	250992_at	At5g02260	ATEXPA9 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A9)
16.36	0.00002735	260859_at	At1g43780	scpl44 (serine carboxypeptidase-like 44); serine-type carboxypeptidase
16.29	0.00009142	260130_s_at	At1g66280	BGLU21: catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
15.91	0.00006872	250214_at	At5g13870	EXGT-A4 (ENDOXYLOGUCAN TRANSFERASE A4); hydrolase, acting on glycosyl bonds
15.88	0.00000001	253608_at	At4g30290	XTH19 (XYLOGUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 19); hydrolase
15.87	0.00000446	245865_at	At1g58025	hypothetical protein contains similarity to cell proliferation related protein from [Mus musculus]
14.58	0.00006629	264371_at	At1g12090	ELP (EXTENSIN-LIKE PROTEIN); lipid binding
14.26	0.00001895	267158_at	At2g37640	EXP3
13.39	0.00002487	261826_at	At1g11580	PMPCRA (METHYLESTERASE PCR A); enzyme inhibitor/ pectinesterase
13.36	0.00001622	259382_s_at	At3g16430	JAL31 (JACALIN-RELATED LECTIN 31); copper ion binding
12.89	0.00000063	264262_at	At1g09200	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 10388.
12.83	0.00000429	262875_at	At1g64970	G-TMT (GAMMA-TOCOPHEROL METHYLTRANSFERASE); tocopherol O-methyltransferase
12.74	0.00001944	259878_at	At1g76790	putative catechol O-methyltransferase similar to catechol O-methyltransferase GB:CAA55358 [Vanilla planifolia]
12.41	0.00000016	262181_at	At1g78060	xylosidase, putative similar to xylosidase Gl:2102655 from [Aspergillus niger]
12.29	0.00003318	258369_at	At3g14310	ATPME3: pectinesterase
12.21	0.00000254	267154_at	At2g30870	GSTF10 (HALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 10); copper ion binding / glutathione binding
11.07	0.00010828	254791_at	At4g12910	scpl20 (serine carboxypeptidase-like 20); serine-type carboxypeptidase
11.03	0.00000195	257673_at	At3g20370	unknown protein
10.86	0.00000475	261266_at	At1g26770	ATEXPA10 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A 10); structural constituent of cell wall
10.7	0.00003535	264313_at	At1g70410	BCA4 carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative
10.64	0.00000016	245032_at	At2g26630	En/Spm-like transposon protein related to En/Spm transposon family of maize
10.64	0.00002142	249121_at	At5g43830	aluminum-induced protein-like ; supported by full-length cDNA: Ceres: 12484.
10.61	0.00000061	261129_at	At1g04820	TUA4: structural constituent of cytoskeleton
10.51	0.00005607	245325_at	At4g14130	XTR7 (XYLOGUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7); hydrolase, acting on glycosyl bonds
10.44	0.00002126	251124_s_at	At5g01040	LAC8 (laccase 8); laccase
10.41	0.00013831	268685_at	At2g29980	FAD3 (FATTY ACID DESATURASE 3); omega-3 fatty acid desaturase
10.14	0.00000339	257809_at	At3g27060	TSO2 (TSO meaning ugly in Chinese); oxidoreductase/ ribonucleoside-diphosphate reductase
10.03	0.00002194	263431_at	At2g22170	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:15081.
9.81	0.0002063	247037_at	At5g67070	RALFL34 (raif-like 34); signal transducer
9.74	0.00001228	246114_at	At5g20250	DIN10 (DARK INDUCIBLE 10); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
9.7	0.00045568	253534_at	At4g31500	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1); oxidoreductase,
9.46	0.00002346	256237_at	At3g12610	DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100); nucleotide binding / protein binding
9.44	0.0000216	248961_at	At5g45650	subtilisin-like protease
9.3	0.00003845	252348_at	At3g48140	B12D-like protein B12D protein - Hordeum vulgare.PIR2:S60284
8.81	0.00003397	256125_at	At1g18250	ATLP-1
8.8	0.00000549	257197_at	At3g23800	SBP3 (selenium-binding protein 3); selenium binding
8.65	0.0000048	266588_at	At2g14890	AGP9 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 9)
8.62	0.00000697	261745_at	At1g08500	unknown protein
8.6	0.00003566	259327_at	At3g16460	putative lectin contains Pfam profile: PF01419 [jacalin-like lectin domain
8.52	0.00001127	262958_at	At1g64410	water stress-induced protein, putative similar to water stress-induced protein, Gl:454880 from [Oryza sativa]
8.37	0.00006251	260914_at	At1g02640	BXL2 (BETA-XYLOSIDASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
8.27	0.00002454	260387_at	At1g74100	SOT16 (SULFOTRANSFERASE 16); desulfoglucosyl sulfate transferase/ sulfotransferase
8.05	0.00000259	261080_at	At1g07370	PCNA1 (PROLIFERATING CELLULAR NUCLEAR ANTIGEN); DNA binding / DNA polymerase processivity factor
8.01	0.00001931	262230_at	At1g68560	XYL1 (ALPHA-XYLOSIDASE 1); alpha-N-arabinofuranosidase/ hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
7.94	0.00003825	245270_at	At4g14960	TUA6: structural constituent of cytoskeleton
7.73	0.00000027	261368_at	At1g53070	protein kinase, putative similar to many predicted protein kinases
7.66	0.0000009	256302_at	At1g69526	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 33120.
7.57	0.00000915	247136_at	At5g66170	senescence-associated protein
7.57	0.00003077	266123_at	At2g45180	unknown protein
7.55	0.00000127	264001_at	At2g22420	putative peroxidase ;supported by full-length cDNA: Ceres:113695.
7.45	0.00036548	261728_at	At1g76160	skx5 (SKU5 Similar 5); copper ion binding / oxidoreductase
7.43	0.0000045	245688_at	At1g28290	AGP31 (arabinogalactan-protein 31)
7.36	0.00001268	254110_at	At4g25260	putative protein pectinesterase - Citrus sinensis, PID:g2098705
7.35	0.00023449	260869_at	At1g43800	stearoyl acyl carrier protein desaturase
7.27	0.00003484	252711_at	At3g43720	lipid-transfer protein-like protein nonspecific lipid transfer protein, lolobly pine, PIR:S51816
7.23	0.00000355	255578_at	At4g01450	predicted protein of unknown function similar to M. truncatula MtN21
7.14	0.00002856	252606_at	At3g45010	scpl48 (serine carboxypeptidase-like 48); serine-type carboxypeptidase
7.09	0.00000126	251065_at	At5g01870	lipid-transfer protein-like lipid-transfer protein - Nicotiana glauca, EMBL:AF151214
6.91	0.0000198	261412_at	At1g07890	APX1 (ascorbate peroxidase 1); L-ascorbate peroxidase
6.89	0.0000958	257798_at	At3g15950	NAI2
6.67	0.00016258	255433_at	At4g03210	XTH9 (XYLOGUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 9); hydrolase, acting on glycosyl bonds
6.57	0.00000116	249817_at	At5g23820	putative protein similar to unknown protein (pir T00970); supported by cDNA: gi_15215722_gb_AY050390.1
6.53	0.00026471	248427_at	At5g51750	ATSBT1.3 (ARABIDOPSIS THALIANA SUBTILASE 1.3); identical protein binding / serine-type endopeptidase
6.53	0.00034151	258760_at	At3g05910	putative pectinacetyltransferase similar to GB:CAA67728 from [Vigna radiata]
6.52	0.00005116	267358_at	At2g39890	PROT1 (PROLINE TRANSPORTER 1); amino acid transmembrane transporter
6.41	0.00135606	258930_at	At3g10040	unknown protein
6.35	0.022847	247431_at	At5g62520	SR05 (SIMILAR TO RCD ONE 5); NAD+ ADP-ribosyltransferase
6.35	0.00047583	256516_at	At1g66150	TMK1 (TRANSMEMBRANE KINASE 1); transmembrane receptor protein serine/threonine kinase
6.33	0.00006265	259131_at	At3g02180	SP1L3 (SPIRAL 1-LIKE3)
6.29	0.00000554	253947_at	At4g26760	MAP65-2
6.23	0.00045462	251942_at	At3g53480	PDR9 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
6.22	0.00003072	249895_at	At5g22500	FAR1 (FATTY ACID REDUCTASE 1); fatty acyl-CoA reductase (alcohol-forming)/ oxidoreductase
6.21	0.00008097	263153_s_at	At1g54010	myrosinase-associated protein, putative similar to myrosinase-associated protein Gl:1769969 from [Brassica napus];
6.13	0.00136643	247024_at	At5g66985	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 4410.
6.13	0.00002244	251109_at	At5g01600	FER1: ferric iron binding / iron ion binding
6.11	0.00022886	262978_at	At1g75780	TUB1: GTP binding / GTPase/ structural molecule
6.1	0.00000121	266928_at	At2g45790	PMM (PHOSPHOMANNOMUTASE); phosphomannomutase
6.06	0.00003245	248139_at	At5g54970	putative protein similar to unknown protein (pir T04819)
6.05	0.00011315	266215_at	At2g06850	EXGT-A1 (ENDOXYLOGUCAN TRANSFERASE); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan
5.99	0.00000083	246585_at	At5g14750	ATMYB66 (MYB DOMAIN PROTEIN 66); DNA binding / protein binding / transcription factor / transcription regulator
5.93	0.00000676	266770_at	At2g03090	ATEXPA15 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A15)
5.88	0.00007578	245629_at	At1g56580	hypothetical protein predicted by genemark.hmm; supported by cDNA: gi_16648668_gb_AY058110.1
5.87	0.00000492	247600_at	At5g06080	MYB34 (MYB DOMAIN PROTEIN 34); DNA binding / kinase/ transcription activator/ transcription factor
5.87	0.00006289	253684_at	At4g29690	nucleotide pyrophosphatase - like protein
5.87	0.00000064	263758_s_at	At2g21260	putative NADPH dependent mannose 6-phosphate reductase ; supported by full-length cDNA: Ceres: 21730.
5.68	0.00000033	250455_at	At5g09980	PROPEP4 (Elicitor peptide 4 precursor)
5.68	0.000105	257130_at	At3g20210	DELTA-VPE; cysteine-type endopeptidase
5.63	0.00000064	247026_at	At5g67080	MAPKKK19: ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
5.63	0.00290174	258487_at	At3g02550	LBD41 (LOB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 41)
5.53	0.00011282	260986_at	At1g53580	GLY3 (GLYOXALASE II 3); hydrolase/ hydroxyacylglutathione hydrolase
5.46	0.0003018	253437_at	At4g32460	putative protein mRNAs from Ricinus communis and Medicago sativa, Z81012 and L36159
5.46	0.00004207	267175_s_at	At2g37620	ACT1 (ACTIN 1); structural constituent of cytoskeleton
5.45	0.00000743	261330_at	At1g44900	ATP binding / DNA binding / DNA-dependent ATPase
5.42	0.00000586	252870_at	At4g39940	AKN2 (APS-kinase 2); ATP binding / adenylylsulfate kinase/ kinase/ transferase
5.4	0.00000088	261831_at	At1g10630	ATARFA1F (ARABIDOPSIS THALIANA ADP-RIBOSYLATION FACTOR A1F); GTP binding / copper ion binding

ANEXO II

5.38	0.00001055	246098_at	At5g20400	ethylene-forming-enzyme-like dioxygenase-like protein
5.35	0.00113136	252827_at	At4g39950	CYP79B2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
5.35	0.00000742	253606_at	At4g30530	putative protein component of aniline dioxygenase (GMP synthase like protein - Acinetobacter sp.;PID:d1013698
5.34	0.00003734	256525_at	At1g66180	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:99625.
5.32	0.00000049	251323_at	At3g61580	delta-8 sphingolipid desaturase ;supported by full-length cDNA: Ceres:34427.
5.31	0.00004319	252024_at	At3g52880	ATMDAR1 monodehydroascorbate reductase, putative
5.3	0.00000635	267212_at	At2g44060	similar to late embryogenesis abundant proteins ; supported by full-length cDNA: Ceres: 2450.
5.26	0.00191476	246855_at	At5g26280	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana;supported by full-length cDNA: Ceres:1360.
5.26	0.00007175	252927_at	At4g39090	RD19 (RESPONSIVE TO DEHYDRATION 19); cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase
5.25	0.00000715	258857_at	At3g02110	sclp25 (serine carboxypeptidase-like 25); serine-type carboxypeptidase
5.19	0.00002253	249469_at	At5g39320	UDP-glucose dehydrogenase-like protein UDP-glucose dehydrogenase - Glycine max, EMBL:U53418
5.16	0.01178622	255807_at	At4g10270	probable wound-induced protein wound-induced protein, Lycopersicon esculentum, PIR2:S19773
5.15	0.00017254	253255_at	At4g34760	putative auxin-regulated protein auxin-induced protein X15, Glycine max, PIR2:JQ1097
5.07	0.00002121	264462_at	At1g10200	WLM1; transcription factor/ zinc ion binding
5.06	0.00051893	245612_at	At4g14440	HCD1 (3-HYDROXYACYL-COA DEHYDRATASE 1); carnitine racemase/ catalytic/ dodecenyl-CoA delta-isomerase
5.04	0.00004161	251846_at	At3g54560	HTA11; DNA binding
5.04	0.00000022	261639_at	At1g50010	TUA2; structural constituent of cytoskeleton
4.94	0.00507709	246825_at	At5g26260	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
4.9	0.00000194	247192_at	At5g65360	histone H3 (sp P05203) ; supported by cDNA: g_13926210_gb_AF370577.1_AF370577
4.9	0.00001481	251287_at	At3g61820	putative protein nucleoid DNA-binding protein cnd41, chloroplast - Nicotiana tabacum, EMBL:D26015
4.88	0.00000719	249147_at	At5g43330	cytosolic malate dehydrogenase ;supported by full-length cDNA: Ceres:40174.
4.83	0.00031955	247097_at	At5g66460	mannan endo-1,4-beta-mannosidase
4.82	0.00039721	252022_at	At3g52930	fructose bisphosphate aldolase - like protein fructose bisphosphate aldolase, garden pea, PIR:S58167
4.81	0.0002294	253600_at	At4g30810	sclp29 (serine carboxypeptidase-like 29); serine-type carboxypeptidase
4.8	0.00017836	260745_at	At1g78370	ATGSTU20 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 20); glutathione transferase
4.74	0.00067828	260506_at	At1g47210	CYCA3.2 cyclin family protein
4.72	0.00091357	262575_at	At1g15210	PDR7 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 7); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances
4.68	0.00002533	256832_at	At3g22880	DMC1 (DISRUPTION OF MEIOTIC CONTROL 1); ATP binding / DNA binding / DNA-dependent ATPase
4.68	0.00003412	267256_s_at	At2g23000	sclp10 (serine carboxypeptidase-like 10); serine-type carboxypeptidase
4.67	0.00001598	251487_at	At3g59760	OASC (O-ACETYL SERINE (THIOL) LYASE ISOFORM C); ATP binding / cysteine synthase
4.65	0.00037128	248886_at	At5g46110	AP22 (ACCLIMATION OF PHOTOSYNTHESIS TO ENVIRONMENT 2); antiporter
4.63	0.00000433	260230_at	At1g74500	putative DNA-binding protein contains Pfam profile: PF00010 helix-loop-helix DNA-binding domain
4.58	0.00001196	259366_at	At1g13280	AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4); allene-oxide cyclase
4.55	0.0000738	252316_at	At3g48700	ATCXE13 (ARABIDOPSIS THALIANA CARBOXYESTERASE 13); hydrolase
4.53	0.0000005	263016_at	At1g23410	ubiquitin extension protein, putative similar to ubiquitin extension protein (UBQ5)
4.52	0.00016928	245803_at	At1g47128	RD21 (responsive to dehydration 21); cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase
4.5	0.00011295	250110_at	At5015350	putative protein many predicted proteins, Arabidopsis thaliana
4.5	0.00001438	262539_at	At1g17200	unknown protein Location of est 136A23T7 (qb T45563); supported by full-length cDNA: Ceres: 28177.
4.49	0.00127716	257203_at	At3g23730	xyloglucan endotransglycosylase
4.49	0.00050921	259935_at	At1g71250	putative GDSL-motif lipase/acylhydrolase contains Pfam profile: PF00657 lipase/acylhydrolase with GDSL-like motif
4.44	0.00008372	265480_at	At2g15970	COR413-PM1
4.43	0.00008196	247606_at	At5g61000	RNA helicase
4.38	0.00018098	266118_at	At2g02130	LCR68 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 68); peptidase inhibitor
4.34	0.00000544	257938_at	At3g19820	DWF1 (DWARF 1); calmodulin binding / catalytic
4.34	0.00007681	258376_at	At3g17680	hypothetical protein similar to GB:AA49756 from [Arabidopsis thaliana]
4.33	0.0007694	267266_at	At2g23150	NRAMP3 (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 3)
4.3	0.00004312	259391_s_at	At1g06350	delta 9 desaturase, putative similar to delta 9 desaturase GI:2970034 from [Arabidopsis thaliana]
4.29	0.00006549	262516_at	At1g17190	ATGSTU26 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 26); glutathione transferase
4.29	0.00008043	263496_at	At2g42570	unknown protein
4.16	0.00046145	261502_at	At1g14440	AHB31 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 31); DNA binding / transcription factor
4.15	0.00131298	260896_at	At1g29310	flower pigmentation protein ATAN11
4.13	0.00032337	247348_at	At5g63810	BGAL10 (beta-galactosidase 10); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding
4.12	0.00020645	247760_at	At5g59130	subtilisin-like serine protease contains similarity to prepro-cucumis GI:807698 from [Cucumis melo]
4.12	0.0023303	265990_at	At2g24280	putative prolylcarboxypeptidase
4.11	0.00004065	258276_at	At3g15710	putative signal peptidase 21kDa subunit similar to signal peptidase 21kDa subunit GB:BA476439 [Rattus norvegicus]
4.11	0.00020402	265374_at	At2g06520	PSB3 (photosystem II subunit X)
4.09	0.00025603	259381_s_at	At3g16390	NSP1 (NITRATE SPECIFIER PROTEIN 1)
4.09	0.00008215	266119_at	At2g02100	LCR69 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 69); peptidase inhibitor
4.08	0.00006771	245944_at	At5g19520	MSL9 (MECHANOSENSITIVE CHANNEL OF SMALL CONDUCTANCE-LIKE 9); mechanically-gated ion channel
4.08	0.00003654	248419_at	At5g51550	EXL3 (EXORDIUM LIKE 3)
4.05	0.00000262	247651_at	At5g59870	HTA6; DNA binding
4.03	0.00005753	247627_at	At5g60360	AALP (Arabidopsis aleurain-like protease); cysteine-type peptidase
4.02	0.00064899	250444_at	At5g10560	beta-xylosidase - like protein beta-xylosidase, Aspergillus nidulans, EMBL:ANX1ND
4	0.00622635	253073_at	At4g37410	CYP81F4; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
4	0.00003156	253387_at	At4g33010	ATGLDP1 (Arabidopsis thaliana glycine decarboxylase P-protein 1); catalytic/ glycine dehydrogenase
3.99	0.00080332	252712_at	At3g43800	ATGSTU27 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 27); glutathione transferase
3.99	0.0000151	266229_at	At2g28840	putative RING zinc finger ankyrin protein ; supported by cDNA: gi_13926221_gb_AF370581.1_AF370581
3.99	0.00005552	266297_at	At2g29570	PCNA2 (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN 2); DNA binding / DNA polymerase processivity factor
3.97	0.0001041	248891_at	At5g46280	MCM3 DNA replication licensing factor, putative
3.97	0.00001487	266533_s_at	At2g16850	PIP2;8 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;8); water channel
3.95	0.00027169	258979_at	At3g09440	heat-shock protein (At-hsc70-3) identical to (At-hsc70-3) (cytosolic Hsp70) GB:CAA76606 [Arabidopsis thaliana]
3.94	0.00043962	262784_at	At1g10760	SEX1 (STARCH EXCESS 1); alpha-glucan, water dikinase
3.92	0.00011349	267377_at	At2g26250	KCS10 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 10); acyltransferase/ catalytic/ transferase
3.91	0.00002977	250496_at	At5g09650	ATPPa6 (Arabidopsis thaliana pyrophosphorylase 6); inorganic diphosphate/ pyrophosphate
3.91	0.00227419	262826_at	At1g13080	CYP71B2 (CYTOCHROME P450 71B2); electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase
3.91	0.00004096	267591_at	At2g39705	RTL8 (ROTUNDIFOLIA LIKE 8)
3.89	0.00016145	261230_at	At1g20010	TUB5; structural constituent of cytoskeleton
3.87	0.00001867	248420_at	At5g51560	receptor-like protein kinase ;supported by full-length cDNA: Ceres:15013.
3.86	0.00005633	254815_at	At4g12420	SKU5; copper ion binding / oxidoreductase
3.85	0.00002176	261363_at	At4g14830	SK56 (SKU5-SIMILAR 6); pectinesterase
3.85	0.0000174	266205_s_at	At2g27860	AXS2 (UDP-D-APIOSE/UDP-D-XYLOSE SYNTHASE 2); UDP-glucuronate decarboxylase
3.81	0.0003368	254363_at	At4g22010	sk54 (SKU5 Similar 4); copper ion binding / oxidoreductase
3.81	0.00002339	261114_at	At1g75390	AtbZIP44 (Arabidopsis thaliana basic leucine-zipper 44); DNA binding / protein heterodimerization
3.81	0.00062784	264204_at	At1g22710	SUC2 (SUCROSE-PROTON SYMPORTER 2); carbohydrate transmembrane transporter
3.81	0.00015114	266167_at	At2g38860	YLS5
3.76	0.00000215	250317_at	At5g12250	TUB6 (BETA-6 TUBULIN); structural constituent of cytoskeleton
3.73	0.00009358	256745_at	At3g29360	UDP-glucose dehydrogenase, putative UDP-glucose 6-dehydrogenase (UDPGDH) GB:Q96558 from [Glycine max]
3.73	0.00001207	261335_at	At1g44800	nodulin protein, putative similar to GB:2598575 from [Medicago truncatula]
3.72	0.00013161	254971_at	At4g10380	NIP5.1; arsenite transmembrane transporter/ boron transporter/ water channel
3.69	0.00006706	260077_at	At1g73620	thaumatin-like protein contains Pfam profile: PF00314 thaumatin family
3.69	0.00176464	260097_at	At1g73220	ATOCT1 (Arabidopsis thaliana ORGANIC CATION/CARNITINE TRANSPORTER 1)
3.68	0.00002501	251646_at	At3g57780	putative protein
3.68	0.00003956	257867_at	At3g17780	unknown protein
3.66	0.00063491	253609_at	At4g30190	AHA2; ATPase/ hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism
3.65	0.00049326	264260_at	At1g09210	putative calcium-binding protein, calcitriculin similar to GB:AAA80652;supported by full-length cDNA: Ceres:27210.
3.64	0.00015009	246932_at	At5g25190	ethylene-responsive element - like protein
3.64	0.00001653	264669_at	At1g09630	ATRAB11C (ARABIDOPSIS RAB GTPASE 11C); GTP binding
3.64	0.00132388	265948_at	At2g19590	ACC1 (ACC OXIDASE 1); 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
3.63	0.00017419	256712_at	At2g34020	unknown protein similar to T14G11.15
3.63	0.00000519	256796_at	At3g22210	hypothetical protein predicted by gencscan;supported by full-length cDNA: Ceres:4146.
3.62	0.00000788	250545_at	At5g08160	ATPK3; ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
3.62	0.00001826	259343_s_at	At3g03780	ATMS2; 5-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine S-methyltransferase/ methionine synthase
3.62	0.00213021	262733_s_at	At1g28670	lipase identical to lipase GB:AAA93262 GI:145627 [Arabidopsis thaliana] (FEBS Lett. 377 (3), 475-480 (1995))
3.61	0.00006985	263373_at	At2g20515	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 24343.
3.6	0.00004817	253203_at	At4g34710	ADC2 (ARGININE DECARBOXYLASE 2); arginine decarboxylase
3.59	0.00012524	247440_at	At5g62680	peptide transporter
3.59	0.00004235	250254_at	At5g13710	SMT1 (STEROL METHYLTRANSFERASE 1); sterol 24-C-methyltransferase
3.59	0.00000462	265695_at	At2g24490	RP2 (REPLICON PROTEIN 2); protein binding
3.59	0.00095499	266166_at	At2g28080	putative glucosyltransferase ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13761.
3.57	0.00000193	265377_at	At2g05790	putative beta-1,3-glucanase
3.55	0.00049089	255773_at	At1g18590	SOT17 (SULFOTRANSFERASE 17); desulfoglucosinolate sulfotransferase/ sulfotransferase

3.54	0,00001418	248461_s_at	At5g50950	FUM1 (FUMARASE 1); catalytic/ fumarate hydratase
3.54	0,01498319	258158_at	At3g17790	PAP17; acid phosphatase/ phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase
3.53	0,00057552	250434_at	At5g10390	histone H3 - like protein histone H3, Arabidopsis thaliana, PIR:S06250
3.52	0,00102655	264400_at	At1g61800	GP2; antiporter/ glucose-6-phosphate transmembrane transporter
3.51	0,00015591	246550_at	At5g14920	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana; supported by full-length cDNA: Ceres:32599.
3.48	0,00243318	259570_at	At1g20440	COR47 (COLD-REGULATED 47)
3.46	0,00083259	247069_at	At5g66920	skt17 (SKUS Similar 17); copper ion binding / oxidoreductase
3.46	0,00014257	257911_at	At3g25530	GLY1 (GLYOXYLATE REDUCTASE 1); 3-hydroxybutyrate dehydrogenase/ phosphogluconate dehydrogenase
3.45	0,00015786	267078_at	At2g40960	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:2337.
3.44	0,00001597	251322_at	At3g61440	CYSC1 (CYSTEINE SYNTHASE C1); L-3-cyanoalanine synthase/ cysteine synthase
3.44	0,00168933	263714_at	At2g20610	SUR1 (SUPERROOT 1); S-alkylthiohydroximate lyase/ carbon-sulfur lyase/ transaminase
3.43	0,00000607	266326_at	At2g46650	CB5-C (CYTOCHROME B5 ISOFORM C); heme binding
3.41	0,00011903	259749_at	At1g71100	RSW10 (RADIAL SWELLING 10); ribose-5-phosphate isomerase
3.4	0,00000308	248626_at	At5g48940	receptor protein kinase-like protein
3.4	0,00016934	263426_at	At2g31570	ATGPX2 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 2); glutathione peroxidase
3.39	0,00013178	249049_at	At5g44340	TUB4; structural constituent of cytoskeleton
3.39	0,00327733	251396_at	At3g60750	transketolase - like protein transketolase, Solanum tuberosum, EMBL:Z50099
3.39	0,00008985	263238_at	At2g16580	putative auxin-induced protein
3.39	0,00000228	264081_at	At2g27970	CKS2 (CDK-subunit 2); cyclin-dependent protein kinase/ cyclin-dependent protein kinase regulator
3.38	0,00035435	260775_at	At1g78300	GRF2 (GENERAL REGULATORY FACTOR 2); protein binding / protein phosphorylated amino acid binding
3.37	0,00007385	247947_at	At5g57090	EIR1 (ETHYLENE INSENSITIVE ROOT 1); auxin efflux transmembrane transporter/ auxin:hydrogen symporter
3.37	0,00006452	259588_at	At1g27930	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:1367.
3.36	0,00063169	250206_at	At5g14040	mitochondrial phosphate translocator
3.34	0,00004168	249753_at	At5g24610	putative protein similar to unknown protein (emb CAB62459.1); supported by full-length cDNA: Ceres:12030.
3.34	0,00005591	258679_at	At3g08590	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
3.33	0,00001518	256970_at	At3g21090	ABC transporter, putative similar to ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 from [Mus musculus]
3.33	0,0005401	264873_at	At1g24100	UGT74B1 (UDP-glucosyl transferase 74B1); UDP-glucosyltransferase/ thiohydroximate beta-D-glucosyltransferase
3.32	0,0004674	256746_at	At3g29320	alpha-glucan phosphorylase
3.32	0,00027339	265416_at	At2g37120	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 1517.
3.31	0,00017096	255642_at	At4g00820	iqd17 (IQ-domain 17); calmodulin binding
3.3	0,00001981	261530_at	At1g63460	unknown protein contains Pfam profile: PF00255 glutathione peroxidases
3.29	0,00026702	245626_at	At1g56700	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:21415.
3.29	0,00060322	250125_at	At5g16390	CAC1 (CHLOROPLASTIC ACETYLCOENZYME A CARBOXYLASE 1); acetyl-CoA carboxylase/ biotin binding
3.29	0,00017851	258849_at	At3g03250	UGP (UDP-glucose pyrophosphorylase); UTP:glucose-1-phosphate uridylyltransferase/ nucleotidyltransferase
3.29	0,00049951	260274_at	At1g80460	NHO1 (nonhost resistance to P. s. phaseolicola 1); carboxyhydratase kinase/ glycerol kinase
3.29	0,00007322	266552_at	At2g46330	AGP16 (ARABINOGLALACTAN PROTEIN 16)
3.28	0,00081331	253708_at	At4g29210	GGT4 (GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE 4); gamma-glutamyltransferase
3.28	0,0016665	255822_at	At2g40610	ATEXP8 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A8)
3.28	0,00013466	263829_at	At2g40435	unknown protein
3.27	0,00000975	259077_s_at	At3g02230	RGP1 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1); cellulose synthase (UDP-forming)
3.26	0,00021934	250366_at	At5g11420	putative protein predicted proteins in castor bean, Arabidopsis thaliana and alfalfa
3.26	0,00007098	262846_at	At1g14670	endomembrane protein
3.26	0,00044229	263662_at	At1g04430	ankyrin-like protein EST_gb ATTS0956 comes from this gene; supported by full-length cDNA: Ceres:108617.
3.25	0,00002071	253218_at	At4g34980	SLP2; serine-type peptidase
3.24	0,00001355	248511_at	At5g50375	CPH1 (CYCLOPROPYL ISOMERASE); cyclooleucanol cycloisomerase
3.24	0,00094549	257137_at	At3g28860	ABCB19; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances / auxin efflux transmembrane transporter
3.23	0,00002881	250000_at	At5g18650	putative protein PGPD14 - Petunia x hybrida, EMBL:AF049930
3.22	0,00062393	252168_at	At3g50440	MES10 (METHYL ESTERASE 10); hydrolase/ hydrolase, acting on ester bonds / methyl jasmonate esterase
3.22	0,00000602	256744_at	At3g29350	AHP2 (HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER 2); histidine phosphotransfer kinase/ protein
3.22	0,00051999	259431_at	At1g01620	PIP1C (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1C); water channel
3.22	0,04837144	263096_at	At2g16060	AHB1 (ARABIDOPSIS HEMOGLOBIN 1); oxygen binding / oxygen transporter
3.21	0,00016774	247101_at	At5g66530	apospory-associated protein C-like
3.21	0,00008466	253223_at	At4g35000	APX3 (ASCORBATE PEROXIDASE 3); L-ascorbate peroxidase
3.21	0,00121077	254623_at	At4g18480	CHL11; ATPase/ magnesium chelate
3.21	0,00057274	260427_at	At1g72430	hypothetical protein predicted by genefinder; supported by full-length cDNA: Ceres:99920.
3.2	0,00008603	246184_at	At5g20950	beta-D-glucan exohydrolase - like protein beta-D-glucan exohydrolase, Nicotiana tabacum, EMBL:AB017502
3.2	0,00018795	263404_s_at	At2g04100	hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAC27412
3.2	0,00001794	266942_at	At2g18990	TXND9 (THIOREDOXIN DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 9 HOMOLOG)
3.18	0,00466323	246212_at	At4g36930	SPT (SPATULA); DNA binding / transcription factor
3.18	0,00019915	247362_at	At5g63140	ATPAP29 (ARABIDOPSIS THALIANA PURPLE ACID PHOSPHATASE 29); acid phosphatase/ protein serine
3.18	0,00228301	263979_at	At2g42840	PDF1 (PROTODERMAL FACTOR 1)
3.17	0,00001741	249276_at	At5g41880	POLA3; DNA primase
3.17	0,00520098	253627_at	At4g30650	low temperature and salt responsive protein homolog low temperature and salt responsive protein LT16A
3.17	0,00001512	262239_at	At1g48230	unknown protein similar to putative phosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein from [Arabidopsis thaliana]
3.16	0,00035696	251995_at	At3g52940	FK (FACKEL); delta14-sterol reductase
3.16	0,00083538	257713_at	At3g27380	SDH2-1; electron carrier/ succinate dehydrogenase
3.16	0,0052158	260481_at	At1g10960	ATFD1 (FERREDOXIN 1); 2 iron, 2 sulfur cluster binding / electron carrier/ iron-sulfur cluster binding
3.15	0,00001495	250433_at	At5g10400	histone H3 - like protein histone H3, Arabidopsis thaliana, PIR:S06250
3.15	0,00001603	253205_at	At4g34490	ATCAP1 (ARABIDOPSIS THALIANA CYCLASE ASSOCIATED PROTEIN 1); actin binding
3.15	0,00021192	266838_at	At2g25980	similar to jasmonate-inducible proteins from Brassica napus
3.14	0,00046697	247313_at	At5g63980	SAL1; 3(2),5-bisphosphate nucleotidase/ inositol or phosphatidylinositol phosphatase
3.14	0,00004723	251370_at	At3g60450	putative protein prb5, Ribes nigrum, EMBL:RN1757; supported by full-length cDNA: Ceres:15792.
3.14	0,00034838	251919_at	At3g53800	putative protein Hsp70 binding protein HspBP1 - Homo sapiens, EMBL:AF093420
3.14	0,00002093	253590_at	At4g30850	HHP2 (HEPTAHELICAL TRANSMEMBRANE PROTEIN2); receptor
3.12	0,00009231	245401_at	At4g17670	hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:6709.
3.12	0,00094173	248200_at	At5g54160	ATOMT1 (O-METHYLTRANSFERASE 1); caffeate O-methyltransferase/ myricetin 3-O-methyltransferase
3.12	0,00009301	252607_at	At3g44990	XTR8 (XYLOGLUCAN ENDO-TRANSGLYCOSYLASE-RELATED 8); hydrolase, acting on glycosyl bonds
3.12	0,00021242	253610_at	At4g30200	unknown protein
3.12	0,0044078	255104_at	At4g08685	SAH7
3.11	0,00058903	252866_at	At4g39840	putative protein
3.11	0,00004882	255874_at	At2g40550	ETG1 (E2F TARGET GENE 1)
3.11	0,00175872	259014_at	At3g07320	putative glucan endo-1-3-beta-glucosidase similar to glucan endo-1-3-beta-glucosidase precursor [Triticum aestivum]
3.1	0,00020593	251183_at	At3g62630	putative protein putative protein At2g15760 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC006438
3.08	0,00006253	248529_at	At5g50000	protein kinase ; supported by full-length cDNA: Ceres:142106.
3.08	0,00133335	249187_at	At5g43060	cysteine proteinase RD21A
3.08	0,0008449	257516_at	At1g69040	ACR4 (ACT REPEAT 4); amino acid binding
3.08	0,00002749	262329_at	At1g64090	hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAF24576 GI:6692111 from [Arabidopsis thaliana]
3.07	0,00254611	247989_at	At5g56350	pyruvate kinase ; supported by full-length cDNA: Ceres:31580.
3.07	0,00006755	259307_at	At3g05230	unknown protein similar to MICROSMAL SIGNAL PEPTIDASE GB:P28687 from [Gallus gallus]
3.06	0,00000774	246784_at	At5g27430	signal peptidase ; supported by cDNA: gi_3044217_gb_AF057144.1_AF057144
3.06	0,0000427	248597_at	At5g49160	MET1 (METHYLTRANSFERASE 1); methyltransferase
3.06	0,00010036	253581_at	At4g30660	stress responsive protein homolog low temperature and salt responsive protein LT16A - Arabidopsis thaliana
3.06	0,00007014	262105_at	At1g02810	pectin esterase, putative similar to pectin esterase GI:1213628 from [Prunus persica]
3.05	0,00028475	256914_at	At3g23880	hypothetical protein
3.05	0,00017207	264078_at	At2g28470	BGAL8 (beta-galactosidase 8); beta-galactosidase/ catalytic/ cation binding / sugar binding
3.04	0,00058797	246092_at	At5g20500	glutaredoxin ; supported by full-length cDNA: Ceres:11597.
3.04	0,00211012	254384_at	At4g21870	heat shock protein - like heat shock protein 17, Triticum aestivum, PIR1:HHWT17
3.04	0,00020449	263321_at	At2g47170	ARF1A1C; GTP binding / phospholipase activator/ protein binding
3.03	0,00004908	247034_at	At5g67260	CYCD3;2 (CYCLIN D3;2); cyclin-dependent protein kinase
3.03	0,00421888	253842_at	At4g27860	putative protein putative proteins from Arabidopsis thaliana; supported by cDNA: gi_17063190_gb_AY062118.1_
3.03	0,00014889	260549_at	At2g43535	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 91704.
3.01	0,00162709	245176_at	At2g47440	unknown protein similar to GPI2104534 AF001308 (T10M13.11)
3.01	0,00065574	245662_at	At5g15580	LNG1 (LONGIFOLIA1)
3.01	0,00253486	251642_at	At3g57520	AtSIP2 (Arabidopsis thaliana seed imbibition 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
3	0,00019956	250268_s_at	At5g12950	putative protein putative secreted protein SCF41.30c; Streptomyces coelicolor, EMBL:SCF41_30
3	0,00005231	2600221_at	At1g56300	DnaJ protein, putative contains Pfam profile: PF00221; DnaJ domain; supported by full-length cDNA: Ceres:25796.
3	0,00248519	257749_at	At3g18780	ACT2 (ACTIN 2); structural constituent of cytoskeleton
3	0,00056588	264247_at	At1g60160	potassium transporter, putative similar to potassium transporter GI:2654088 from [Arabidopsis thaliana]
3	0,00034941	262955_at	At2g29550	TUB7; structural constituent of cytoskeleton
2.99	0,00119871	245112_at	At2g41540	GDPHC1; NAD or NADH binding / glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+)
2.99	0,00009436	256994_s_at	At3g25830	ATTPS-CIN (terpene synthase-like sequence-1,8-cineole); (E)-beta-ocimene synthase/ myrcene synthase

ANEXO II

2.98	0.00268341	246124_at	At5g20060	putative protein acyl-protein thioesterase, Homo sapiens, EMBL:AF098668
2.97	0.00014693	246867_at	At5g48300	ADG1 (ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1); glucose-1-phosphate adenylyltransferase
2.97	0.00014382	263083_at	At2g27190	PAP12 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 12); acid phosphatase/protein serine/threonine phosphatase
2.96	0.00012204	255513_at	At4g02060	PRL (PROLIFERA); ATP binding / DNA binding / DNA-dependent ATPase/ nucleoside-triphosphatase
2.95	0.00033179	263612_at	At2g16440	MC4M1 DNA replication licensing factor, putative
2.94	0.0000691	256224_at	At1g56330	ATSAR1B (SECRETION-ASSOCIATED RAS 1 B); GTP binding
2.94	0.00011932	264386_at	At1g12000	putative pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase
2.94	0.00030566	270664_at	At2g41110	CAM2 (CALMODULIN 2); calcium ion binding / protein binding
2.93	0.01098226	259918_at	At1g72570	putative AP2 domain transcription factor contains Pfam profile: PF00847 AP2 domain (2 copies)
2.93	0.00002286	261239_at	At1g32930	Avr9 elicitor response protein, putative similar to Avr9 elicitor response protein GI:4138265 from [Nicotiana tabacum]
2.91	0.00459377	245044_at	At2g26500	unknown protein Alternative splice forms exist,supported by full-length cDNA: Ceres:9368.
2.91	0.00111281	247656_at	At5g59890	ADF4 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR 4); actin binding
2.91	0.00024764	260676_at	At1g19450	integral membrane protein, putative similar to GB:U43629 from [Beta vulgaris]
2.91	0.00431703	262373_at	At1g73120	hypothetical protein predicted by genefinder
2.9	0.00000825	263180_at	At1g05620	URH2 (URIDINE-RIBOHYDROLASE 2); hydrolase
2.9	0.0007202	264217_at	At1g60190	hypothetical protein predicted by genemark.hmm
2.9	0.00037388	264439_at	At1g27450	APT1 (ADENINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE 1); adenine phosphoribosyltransferase
2.9	0.00185466	264474_s_at	At1g67090	RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A); copper ion binding
2.89	0.00000932	249055_at	At5g44480	calmodulin-like protein
2.89	0.00019454	267279_at	At2g19460	hypothetical protein predicted by genefinder, supported by cDNA: gi_14334633_gb_AY034990.1
2.88	0.00007408	252562_s_at	At3g45930	Histone H4 - like protein histone H4, Zea mays, PIR:HSZM4:supported by full-length cDNA: Ceres:22146.
2.88	0.00010133	256453_at	At1g75270	DHAR2 (DEHYDROASCORBATE REDUCTASE 2); glutathione binding / glutathione dehydrogenase (ascorbate)
2.87	0.00693899	257807_at	At3g26650	GAPA (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT)
2.86	0.00099607	246481_s_at	At5g15960	KIN1
2.86	0.00351237	257150_at	At3g27230	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:256351.
2.86	0.00112002	258710_s_at	At3g09800	putative coatomer zeta subunit (zeta-coat protein) similar to coatomer zeta subunit (zeta-coat protein) (Bos taurus)
2.86	0.00001205	261636_at	At1g50110	branched-chain amino acid aminotransferase
2.86	0.00001323	264969_at	At1g67320	hypothetical protein contains similarity to DNA primase large subunit GI:172234 from [Saccharomyces cerevisiae]
2.85	0.00003721	246849_at	At5g26850	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana, Homo sapiens and Caenorhabditis elegans
2.85	0.00006799	253817_at	At4g28310	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:18040.
2.85	0.0000134	258613_at	At3g02870	VTC4; 3(2),5-bisphosphate nucleotidase/ L-galactose-1-phosphate phosphatase/ inositol
2.84	0.002297	252363_at	At3g48460	lipase - like protein lipase Arab-1, Arabidopsis thaliana, PIR2:S68410;supported by full-length cDNA: Ceres:13870.
2.84	0.00006255	266553_at	At2g46170	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450758_gb_AY053421.1
2.83	0.00038518	249015_at	At5g44730	Dreg-2 like protein
2.82	0.0004416	245196_at	At1g67750	F12A21.12 similar to pectate lyase like protein emb[CAB41931.1
2.82	0.00116664	246986_at	At5g67280	RLK (Receptor-like kinase); ATP binding / kinase/ protein serine/threonine kinase
2.82	0.00104743	248646_at	At5g49100	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:116332.
2.82	0.00014306	249493_at	At5g39080	acyltransferase -like protein Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase, Gentiana triflora, EMBL:AB010708
2.81	0.00003162	245340_at	At4g14420	elicitor like protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 1718.
2.81	0.00125129	263223_at	At1g30630	coatomer-like protein, epsilon subunit similar to GB:CAB55628 from [Homo sapiens], ESTs gb Z17908
2.8	0.00013895	248619_at	At5g49630	AAP6 (AMINO ACID PERMEASE 6); acidic amino acid transmembrane transporter
2.8	0.00002638	253855_at	At4g28050	TET7 (TETRASPANIN7)
2.8	0.00008516	254083_at	At4g24920	PROTEIN TRANSPORT PROTEIN SEC61 GAMMA SUBUNIT -like
2.79	0.00001264	252935_at	At4g39150	dnaJ-like protein CAJ1 protein, Saccharomyces cerevisiae, PIR2:S48085
2.79	0.00134218	264071_at	At2g27920	SCPL51 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 51); serine-type carboxypeptidase
2.79	0.00018438	266802_at	At2g22900	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_14334701_gb_AY035024.1
2.78	0.00012907	253008_at	At4g38210	ATEXPA20 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A20)
2.78	0.00008138	253245_at	At4g34590	GBF6 (G-BOX BINDING FACTOR 6); DNA binding / protein heterodimerization/ transcription factor
2.77	0.00051091	255558_at	At4g01900	GLB1 (GLNB1 HOMOLOG); acetylglutamate kinase regulator
2.75	0.00056683	254578_at	At4g19410	putative pectinacetyltransferase protein pectinacetyltransferase precursor, Vigna radiata, PIR2:S68805
2.75	0.00034375	254709_at	At4g17890	AGD8 (ARF-GAP DOMAIN 8); ARF GTPase activator/ DNA binding / zinc ion binding
2.74	0.00028695	249063_at	At5g44110	POP1; transporter
2.74	0.00008305	265183_at	At1g23750	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:15450.
2.73	0.00029488	260957_at	At1g06080	ADS1 (DELTA 9 DESATURASE 1); oxidoreductase
2.73	0.00064851	266489_at	At2g35190	NPSN11 (NOVEL PLANT SNARE 11); SNAP receptor/ protein transporter
2.72	0.00014768	246842_at	At5g26731	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 30174.
2.72	0.00247437	247191_at	At5g65310	ATHB5 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 5);protein homodimerization
2.72	0.00014713	254224_at	At4g23650	CDPK6 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 6); ATP binding / calcium ion binding
2.72	0.00016208	256865_at	At3g23820	GA6 (UDP-D-GLUCURONATE 4-EPIMERASE 6); UDP-glucuronate 4-epimerase/ catalytic
2.72	0.00004317	266225_at	At2g28900	ATOEP16-1 (OUTER PLASTID ENVELOPE PROTEIN 16-1); protein transmembrane transporter
2.71	0.00067271	247517_at	At5g61780	100 kDa coactivator - like protein 100 kDa coactivator, Homp sapiens, PIR:138968
2.71	0.00001208	258252_at	At3g15720	putative polygalacturonase similar to polygalacturonase GB:BA88472 [Cucumis sativus]
2.7	0.00036202	254740_s_at	At4g13890	glycine hydroxymethyltransferase - like protein glycine hydroxymethyltransferase, Homo sapiens, PIR2:A46746
2.7	0.00001129	259040_at	At3g09270	ATGSTU8 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 8); glutathione transferase
2.68	0.00005351	246979_s_at	At5g25020	putative protein hypothetical proteins - Arabidopsis thaliana
2.68	0.00060128	248608_at	At5g49460	ACL2-2 (ATP CITRATE LYASE SUBUNIT B 2); ATP citrate synthase
2.68	0.00006285	251850_at	At3g54650	FBL17; ubiquitin-protein ligase
2.68	0.00040399	259384_at	At3g16450	putative lectin contains Pfam profile: PF01419 jacalin-like lectin domain
2.68	0.00016471	263047_at	At2g17630	putative phosphoserine aminotransferase
2.67	0.00004989	254216_at	At4g23710	VAG2; hydrolase, acting on acid anhydrides, catalyzing transmembrane movement of substances
2.67	0.01010078	258641_at	At3g08030	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:27471.
2.67	0.00029727	267092_at	At2g38120	AUX1 (AUXIN RESISTANT 1); amino acid transmembrane transporter/ auxin binding
2.66	0.00000409	246786_at	At5g27410	putative amino acid aminotransferase branched-chain amino acid aminotransferase
2.66	0.00179819	255479_at	At4g02380	SAG21 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21)
2.65	0.00018992	248903_at	At5g46290	KAS I (3-KETOACYL-ACYL CARRIER PROTEIN SYNTHASE I); catalytic/ fatty-acid synthase
2.65	0.00017741	257510_at	At1g55360	unknown protein
2.65	0.00035224	267112_at	At2g14750	APK (APS KINASE); ATP binding / adenylylsulfate kinase/ transferase, transferring phosphorus-containing groups
2.65	0.0000053	267153_at	At2g30860	ATGSTF9 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 9); copper ion binding / glutathione binding
2.64	0.00025451	253253_at	At4g34750	putative protein auxin-regulated gene, Vigna radiata
2.63	0.00391553	250752_at	At5g05690	CPD (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC DWARF); electron carrier/ heme binding / iron ion binding
2.62	0.00037253	253598_at	At4g30800	ribosomal protein S11 - like ribosomal protein S11, Arabidopsis thaliana,PIR2:C35542
2.62	0.00672912	263787_at	At2g46420	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15450510_gb_AY052357.1
2.61	0.00006798	247218_at	At5g65010	ASN2 (ASPARAGINE SYNTHETASE 2); asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)
2.61	0.00112783	249343_at	At5g40650	SDH2-2; electron carrier/ succinate dehydrogenase
2.61	0.00035853	250277_at	At5g12940	putative protein DRT100 protein precursor, Arabidopsis thaliana, PIR:A46260
2.6	0.00114488	249923_at	At5g19120	conglutin gamma - like protein conglutin gamma precursor, Lupinus angustifolius, PIR:S21426
2.6	0.00011224	257153_at	At3g27220	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15081754_gb_AY048270.1
2.6	0.0000559	257213_at	At3g15020	mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase
2.6	0.00056341	260470_at	At1g11120	hypothetical protein predicted by genefinder
2.59	0.00380808	250861_at	At5g04740	putative protein predicted proteins, Arabidopsis thaliana:supported by full-length cDNA: Ceres:34592.
2.59	0.00000606	260002_at	At1g67940	ATNAP3; transporter
2.59	0.0012673	261895_at	At1g80830	NRAMP1 (NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN 1); transmembrane transporter
2.59	0.00010851	264824_at	At1g03420	2A6; oxidoreductase
2.58	0.00087353	245746_at	At1g51070	bHLH transcription factor, putative similar to bHLH transcription factor GI:3757520 from [Arabidopsis thaliana]
2.58	0.00069444	258485_at	At3g02630	putative stearoyl-acyl carrier protein desaturase
2.57	0.00114273	252121_at	At3g51160	MUR1 (MURUS 1); GDP-mannose 4,6-dehydratase
2.57	0.00044725	262195_at	At1g78040	allergen, putative similar to allergen (Ole e 1) GI:2465129 from [Olea europaea]
2.56	0.00059172	249514_at	At5g38480	GRF3 (GENERAL REGULATORY FACTOR 3); ATP binding / protein binding
2.56	0.00001805	249588_at	At4g11010	NDFK3 (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE 3); ATP binding / nucleoside diphosphate kinase
2.56	0.00031006	267035_at	At2g38400	AGT3 (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE 3); alanine:glyoxylate transaminase/ catalytic
2.55	0.00073517	250937_at	At5g03230	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
2.55	0.00002138	251927_at	At3g53990	hypothetical protein ER6 protein - Lycopersicon esculentum, EMBL:AF096262
2.55	0.00002017	252169_at	At3g50520	putative protein several bacterial phosphoglycerate mutases: supported by cDNA: gi_14334855_gb_AY035101.1
2.55	0.00810279	257925_at	At3g23170	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:92314.
2.55	0.01755896	261055_at	At1g01300	chloroplast nucleoid DNA binding protein
2.54	0.00507183	245388_at	At4g16410	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:2505.
2.54	0.00043574	256216_at	At1g56340	CRT1 (CALRETICULIN 1); calcium ion binding / unfolded protein binding
2.54	0.00018543	258658_at	At3g09820	ADK1 (adenosine kinase 1); adenosine kinase/ copper ion binding
2.54	0.00030641	259882_at	At1g76670	unknown protein similar to hypothetical protein GB:CAB39648 [Arabidopsis thaliana]
2.54	0.00028668	262411_at	At1g34640	hypothetical protein predicted by genemark.hmm: supported by full-length cDNA: Ceres: 10855.
2.54	0.00830385	263628_at	At2g04780	FLA7 (FASCICLIN-LIKE ARABINOGLALACTAN 7)

2.54	0.00015763	264590_at	At2q17710	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:1011.
2.54	0.00026907	264926_at	At1g60660	CB5LP (CYTOCHROME B5-LIKE PROTEIN); heme binding
2.54	0.00006372	265097_at	At1g04020	BARD1 (BREAST CANCER ASSOCIATED RING 1); DNA binding / transcription coactivator
2.54	0.00001573	265998_at	At2q24270	ALDH11A3; 3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+)
2.54	0.00001487	266639_at	At2g35520	DAD2 (DEFENDER AGAINST CELL DEATH 2)
2.53	0.00007565	247720_at	At5g59290	UXS3 (UDP-GLUCURONIC ACID DECARBOXYLASE 3); UDP-glucuronate decarboxylase/ catalytic
2.53	0.00163363	251013_at	At5g02540	putative protein various predicted proteins, Brassica rapa, Arabidopsis thaliana
2.53	0.00138763	253705_at	At4g29130	HXK1 (HEXOKINASE 1); ATP binding / fructokinase/ glucokinase/ hexokinase
2.53	0.00001745	265740_at	At2g01150	RHA2B (RING-H2 FINGER PROTEIN 2B); protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding
2.52	0.00022866	245301_at	At4g17190	FPS2 (FARNESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2); dimethylallyltransferase/ geranyltransferase
2.52	0.00051897	250422_at	At5g10840	putative protein KIAA0255 gene, Homo sapiens, EMBL:HSD444
2.52	0.00035444	251847_at	At3g54640	TSA1 (TRYPTOPHAN SYNTHASE ALPHA CHAIN); tryptophan synthase
2.52	0.00045687	253286_at	At4g34260	FUC95A; 1,2-alpha-L-fucosidase
2.51	0.0000586	250470_at	At5g10160	(3R)-hydroxymyristoyl-acyl carrier protein] dehydratase-like protein beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase precursor
2.51	0.00630885	252943_at	At4g39330	CAD9 (CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 9); binding / catalytic/ oxidoreductase/ zinc ion binding
2.51	0.00003842	256160_at	At1g30120	PDH-E1 BETA (PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 BETA); pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring)
2.51	0.00004488	257674_at	At3g20390	translational inhibitor protein
2.51	0.02039685	259375_at	At3g16370	putative APG protein similar to anter-specific proline-rich protein APG precursor SP:P40602 (Arabidopsis thaliana)
2.51	0.0026121	261187_at	At1g32860	beta-1,3-glucanase precursor, putative similar to beta-1,3-glucanase precursor GI:4087948 from [Orzya sativa]
2.51	0.00068738	265918_at	At2g15090	KCS8 (3-KETOACYL-COA SYNTHASE 8); acyltransferase/ catalytic/ transferase
2.51	0.00169419	266500_at	At2g06925	PLA2-ALPHA; phospholipase A2
2.49	0.00035164	267355_at	At2g39900	putative LIM-domain protein
2.48	0.00019056	252713_at	At3g43810	CAM7 (CALMODULIN 7); calcium ion binding
2.48	0.00070244	253282_at	At4g34120	LEJ1 (LOSS OF THE TIMING OF ET AND JA BIOSYNTHESIS 1)
2.48	0.00045533	258498_at	At3g02480	unknown protein similar to pollen coat protein GB:CAA63531 from [Brassica oleracea]
2.47	0.00058315	245098_at	At2g40940	ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1); ethylene binding / protein histidine kinase/ receptor
2.47	0.00018365	251788_at	At3g55420	putative protein
2.47	0.00047879	252212_at	At3g50310	MAPKKK20; ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
2.47	0.00004869	261944_at	At1g64650	unknown protein
2.46	0.00604369	254387_at	At4g21850	ATMSRB9 methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SelR domain-containing protein
2.45	0.01067105	249007_at	At5g44650	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:21404.
2.45	0.00041559	266226_at	At2g28740	HIS4; DNA binding
2.44	0.02142447	255524_at	At4g02330	ATPMEPCRB; pectinesterase
2.44	0.00011588	255860_at	At5g34940	AtGUS3 (Arabidopsis thaliana glucuronidase 3); beta-glucuronidase
2.44	0.00034388	258515_at	At3g06650	ACL-1; ATP citrate synthase
2.44	0.00315105	258828_at	At3g07130	PAP15 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 15); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase
2.44	0.00034905	260565_at	At2q43800	unknown protein predicted by genefinder; similar to GPI2194125
2.44	0.00298174	262414_at	At1g49430	LACS2 (LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 2); long-chain-fatty-acid-CoA ligase
2.44	0.00070598	264004_at	At2g22425	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 38277.
2.44	0.00030165	266334_at	At2g32380	hypothetical protein predicted by genefinder;supported by full-length cDNA: Ceres:9671.
2.44	0.02303557	266460_at	At2g47830	AGP26 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 26)
2.43	0.01862873	249459_at	At5g39580	peroxidase ATP24a
2.43	0.0006019	250916_at	At5g03630	ATMDAR2; monodehydroascorbate reductase (NADH)
2.43	0.00111198	251801_at	At3g55440	TPI (TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE); triose-phosphate isomerase
2.43	0.02554927	253362_s_at	At4g33110	putative protein cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase, Escherichia coli, PIR2:A44292
2.43	0.00004341	255552_at	At4g01850	SAM-2 (S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 2); copper ion binding / methionine adenosyltransferase
2.43	0.00027072	259404_at	At1g17720	ATB BETA; nucleotide binding / protein phosphatase type 2A regulator
2.43	0.01372088	267093_at	At2g38170	CAX1 (cation exchanger 1); calcium ion transmembrane transporter/ calcium:cation antiporter
2.42	0.00432563	261567_at	At1g33055	Expressed protein ; supported by cDNA: gi_13877526, gb_AF370464.1 AF370464
2.41	0.00002603	251852_at	At3g54750	putative protein
2.41	0.00007726	252231_at	At3g49720	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:35598.
2.41	0.00004226	252442_at	At3g46940	dUTP pyrophosphatase-like protein dUTP pyrophosphatase - Lycopersicon esculentum,PIR2:JQ1599
2.41	0.00421456	253065_at	At4g37740	AtGRF2 (GROWTHREGULATING FACTOR 2); transcription activator
2.41	0.00011708	254561_at	At4g19160	putative protein ; supported by cDNA: gi_15292760, gb_AY050814.1
2.41	0.00001885	264098_at	At1g79260	hypothetical protein predicted by genemark.hmm; supported by cDNA: gi_15081627, gb_AY048206.1
2.41	0.00005411	264668_at	At1g09780	putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
2.41	0.000805	267544_at	At2g32720	CB5-B (CYTOCHROME B5 ISOFORM B); heme binding
2.4	0.00146271	250560_at	At5g08020	RPA70B (RPA70-KDA SUBUNIT B); DNA binding / nucleic acid binding
2.4	0.00375874	252624_at	At3g44735	PSK1; growth factor
2.4	0.00007581	258437_at	At3g16560	unknown protein contains protein phosphatase 2C domain; supported by full-length cDNA: Ceres: 249756.
2.4	0.00081186	261790_at	At1g16000	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 30167.
2.4	0.0000077	264968_at	At1g67360	stress related protein, putative similar to stress related protein GI:5802955 from [Vitis riparia]
2.39	0.00366476	257606_at	At3g13870	RHD3 (ROOT HAIR DEFECTIVE 3); GTP binding
2.39	0.00026044	261985_at	At1g33750	terpene synthase, putative similar to DELTA-CADINENE SYNTHASE ISOZYME A from [Gossypium arboreum]
2.39	0.00053304	264523_at	At1g10030	ERG28 (Arabidopsis homolog of yeast ergosterol28)
2.39	0.00167969	266001_at	At2g24150	HHP3 (heptahelical protein 3); receptor
2.39	0.00617825	266364_at	At2g41230	unknown protein
2.38	0.00230762	248557_at	At5g49980	AFB5 (Auxin F-Box protein 5); ubiquitin-protein ligase
2.38	0.0029651	250014_at	At5g17990	TRP1 (tryptophan biosynthesis 1); anthranilate phosphoribosyltransferase
2.38	0.00018183	251772_at	At3g55920	cyclophilin-like protein ROC7, cyclophilin, Arabidopsis thaliana, EMBL:AF192490
2.38	0.00029261	254466_at	At4g20430	subtilisin-like serine protease
2.38	0.00530849	254563_at	At4g19120	ERD3 (early-responsive to dehydration 3)
2.37	0.00025835	245052_at	At2g26440	putative pectinesterase
2.37	0.00009674	246027_at	At5g21060	homoserine dehydrogenase-like protein thrA bifunctional enzyme - Escherichia coli, PIR:B64720
2.37	0.00607883	251762_at	At3g55800	SBPASE (sedoheptulose-bisphosphatase); phosphoric ester hydrolase/ sedoheptulose-bisphosphatase
2.37	0.0041503	251954_at	At3g53670	CpuORF51 (Conserved peptide upstream open reading frame 51)
2.37	0.00335744	252929_at	At4g38970	putative fructose-bisphosphate aldolase fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)- rice, PIR2:T02057
2.37	0.00276223	258588_s_at	At3g04120	GAPC1 (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1)
2.37	0.00013696	265226_at	At2g28430	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16648715, gb_AY058134.1
2.37	0.00021997	266317_at	At2g27030	CAM5 (CALMODULIN 5); calcium ion binding
2.36	0.00122662	246041_at	At5g19290	phospholipase - like protein various predicted phospholipase proteins;supported by full-length cDNA: Ceres:253499.
2.36	0.0001251	247946_at	At5g57180	CIA2 (CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 2); transcription regulator
2.36	0.00015052	254349_at	At4g22250	hypothetical protein
2.36	0.00004975	261440_at	At1g28510	hypothetical protein predicted by genemark.hmm; supported by full-length cDNA: Ceres: 17148.
2.36	0.00397614	266105_at	At2g45070	SEC61 BETA; protein transporter
2.35	0.00006722	255683_at	At4g00570	putative malate oxidoreductase
2.35	0.00002421	261581_at	At1g01140	CIPK9 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 9); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine
2.35	0.01730566	267376_at	At2g26330	ER (ERECTA); transmembrane receptor protein kinase
2.34	0.00004624	247908_at	At5g57440	GS1; catalytic/ hydrolase
2.34	0.00007712	252898_at	At4g39500	CYP96A11; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
2.34	0.00032052	258270_at	At3g15650	putative lysophospholipase similar to lysophospholipase GB:AAD52700 [Schistosoma japonicum]
2.33	0.00019396	246378_at	At1g57620	integral membrane protein, putative similar to integral membrane protein GI:3288599 from [Rattus norvegicus]
2.33	0.00008665	246636_at	At5g34850	PAP26 (PURPLE ACID PHOSPHATASE 26); acid phosphatase/ protein serine/threonine phosphatase
2.33	0.0000163	247288_at	At5g64330	NPH3 (NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3); protein binding / signal transducer
2.33	0.00263549	249994_at	At5g18590	putative protein cell polarity protein tea1p, Schizosaccharomyces pombe, PIR:T40866
2.33	0.00125786	250898_at	At5g03300	ADK2 (ADENOSINE KINASE 2); adenosine kinase/ copper ion binding / kinase
2.33	0.00415956	261865_at	At1g50430	DWF5 (DWARF 5); sterol delta7 reductase
2.33	0.00009555	266087_at	At2g37790	putative alcohol dehydrogenase
2.32	0.00101561	250130_at	At5g16510	amylogenin; reversibly glycosylatable polypeptide ;supported by full-length cDNA: Ceres:7365.
2.32	0.00411548	252058_at	At3g52470	putative protein hin1 protein -Nicotiana tabacum,PID:e259431;supported by full-length cDNA: Ceres:92178.
2.32	0.00015677	256666_at	At3g20670	HTA13; DNA binding
2.32	0.00037893	257204_at	At3g23805	RALFL24 (ralf-like 24); signal transducer
2.32	0.00076508	261165_at	At1g34430	EMB3003 (embryo defective 3003); acyltransferase/ dihydroliopyllysine-residue acetyltransferase/ protein binding
2.31	0.00984868	246919_at	At5g25460	putative protein hypothetical protein - Ricinus communis, EMBL:Z81012;supported by full-length cDNA: Ceres:1351.
2.31	0.00000893	248573_at	At5g49720	ATGH9A1 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9A1); cellulase/ hydrolase
2.31	0.00035969	250358_at	At5g11740	AGP15 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 15)
2.31	0.00300913	256547_at	At3g14840	receptor-like serine/threonine kinase
2.31	0.00520178	263777_at	At2g46450	ATCNGC12; cation channel/ cyclic nucleotide binding / ion channel
2.3	0.0004167	245315_at	At4g14800	PBD2 (20S PROTEASOME BETA SUBUNIT 2); peptidase/ threonine-type endopeptidase
2.3	0.00065471	250208_at	At5g14000	anac084 (Arabidopsis NAC domain containing protein 84); transcription factor
2.3	0.00090689	253372_at	At4g33220	PME4 enzyme inhibitor/ pectinesterase

ANEXO II

2,3	0,00021762	253926_at	At4g26650	hnRNP-like protein ; supported by cDNA: gi_16930502_gb_AF419605.1_AF419605
2,3	0,00294638	259620_s_at	At1g42705	Tam3-like transposon protein similar to GI:100489 from (Antirrhinum majus) (Plant Mol. Biol. 16 (2), 369-371 (1991))
2,3	0,00084963	260976_at	At1g53650	CID8 (CTC-INTERACTING DOMAIN 8); RNA binding / protein binding
2,3	0,00237601	264056_at	At2g28510	putative DOF zinc finger protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:16423.
2,29	0,00015673	251144_at	At5g01210	anthranilate N-benzoyltransferase - like protein anthranilate N-benzoyltransferase, clove pink, PIR:T10717
2,29	0,00761131	251372_at	At3g60520	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:21518.
2,29	0,00058726	252622_at	At3g45310	cysteine proteinase AALP, putative similar to AALP protein GI:7230640 from [Arabidopsis thaliana]
2,29	0,00084165	256277_at	At3g12120	FAD2 (FATTY ACID DESATURASE 2); delta12-fatty acid dehydrogenase/ omega-6 fatty acid desaturase
2,29	0,00008793	257104_at	At3g25040	ER lumen retaining receptor (HDEL receptor), putative similar to GB:P35402 from [Arabidopsis thaliana]
2,29	0,0000507	259023_at	At3g07510	unknown protein ; supported by cDNA: gi_13877548_gb_AF370475.1_AF370475
2,29	0,0092213	261206_at	At1g12800	heat shock factor protein hsf8, putative predicted by genemark.hmm
2,29	0,00626173	263711_at	At2g20630	putative protein phosphatase 2C ;supported by full-length cDNA: Ceres:22316.
2,28	0,00249832	245821_at	At1g26270	hypothetical protein similar to putative ubiquitin GI:4415931 from [Arabidopsis thaliana]
2,28	0,00179835	254166_at	At4g24190	SHD (SHEPHERD); ATP binding / unfolded protein binding
2,28	0,00115313	256151_at	At1g55130	multispanning membrane protein
2,28	0,0003765	260884_at	At1g29240	unknown protein similar to unknown protein GB:AAF18609 GI:6598419 from [Arabidopsis thaliana]
2,27	0,00243307	245138_at	At2g45190	AFO (ABNORMAL FLORAL ORGANS); protein binding / transcription factor/ transcription regulator
2,27	0,0002527	246391_at	At1g77350	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16648790_gb_AY058172.1
2,27	0,01317427	246923_at	At5g25100	putative multispanning membrane protein GC donor splice site at exon 6; KIAA0255 - Homo sapiens, EMBL:D87444
2,27	0,00086664	247722_at	At5g59150	ATRA22 (HOARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG A22); GTP binding
2,27	0,02017116	247925_at	At5g57560	TCH4 (Touch 4); hydrolase, acting on glycosyl bonds / xyloglucan:xyloglucosyl transferase
2,27	0,00005112	258359_s_at	At3q14415	putative glycolate oxidase similar to glycolate oxidase GB:BA003131 from [Cucurbita sp.]
2,27	0,00586633	258796_at	At3g04630	WDL1
2,27	0,00074746	261594_at	At1g33240	AT-GTL1 (GT2-LIKE 1); DNA binding / transcription factor
2,26	0,00269268	249267_at	At5g41600	BT13 (VIRB2-INTERACTING PROTEIN 3)
2,26	0,00034136	250994_at	At5g02490	dnaK-type molecular chaperone hsc70.1 - like dnaK-type molecular chaperone hsc70.1, Arabidopsis thaliana
2,26	0,00028592	252468_at	At3g46970	PHS2 (ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2); phosphorylase/ transferase, transferring glycosyl groups
2,26	0,00020533	254446_at	At4g20890	TUB9; GTP binding / GTPase/ structural molecule
2,25	0,00008974	245238_at	At4g25570	ACYB-2; carbon-monoxide oxygenase
2,25	0,00393611	247338_at	At5g63680	pyruvate kinase
2,25	0,00129237	252080_at	At3g51670	putative protein polyphosphoinositide binding protein Ssh2 - Glycine max, PIR:T05953
2,25	0,00126107	253991_at	At4g27720	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:113484.
2,25	0,01256855	260143_at	At1g71880	SUC1 (Sucrose-proton symporter 1); carbohydrate transmembrane transporter/ sucrose:hydrogen symporter
2,24	0,00075054	249374_at	At5g40580	PBB2; endopeptidase/ peptidase/ threonine-type endopeptidase
2,24	0,00025624	250800_at	At5g05370	HPR; glycerate dehydrogenase/ poly(U) binding
2,24	0,0027208	253528_s_at	At4g31480	putative protein bcp gene product - Drosophila melanogaster, PID:g472343
2,24	0,00001169	257983_at	At3q20790	unknown protein
2,23	0,00181247	245293_at	At4g16660	HSP like protein ; supported by cDNA: gi_15293148_gb_AY051008.1
2,23	0,0001422	247951_at	At5g57240	ORP4 (OSBP(OXYSTEROL BINDING PROTEIN)-RELATED PROTEIN 4C); oxysterol binding
2,23	0,00099075	250055_at	At5g17770	ATGBR (ARABIDOPSIS THALIANA NADH:CYTOCHROME B5 REDUCTASE 1); cytochrome-b5 reductase
2,23	0,0016413	250657_at	At5g07000	ST2B (SULFOTRANSFERASE 2B); hydroxyjasmonate sulfotransferase/ sulfotransferase
2,23	0,03591296	259664_at	At1g55330	AGP21
2,23	0,01472725	259860_at	At1g80640	putative protein kinase similar to leucine-rich repeat transmembrane protein kinase 1 GB:AA27894 from [Zea mays]
2,23	0,00162844	263838_at	At2g36880	MAT3 (methionine adenosyltransferase 3); copper ion binding / methionine adenosyltransferase
2,23	0,00159313	264903_at	At1g23190	putative phosphoglucomutase similar to GB:AAD13031 and GB:AAC50049
2,23	0,00155343	264967_at	At1g67250	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:27632.
2,23	0,0111957	267172_at	At2g37660	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:13797.
2,22	0,00859345	247023_at	At5g67060	HEC1 (HECATE 1); transcription factor
2,22	0,01729522	253078_at	At4g36180	putative receptor protein kinase Cf-2.1 leucine rich repeat protein, Solanum pimpinellifolium, PATX:G1184075
2,22	0,01013897	255308_at	At4g04910	NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor); ATP binding / binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding
2,22	0,00364379	258860_at	At3g02050	KUP3 (K+ UPTAKE TRANSPORTER 3); potassium ion transmembrane transporter
2,22	0,00094491	262504_at	At1g21750	ATPDL1-1 (PDI-LIKE 1-1); protein disulfide isomerase
2,22	0,00012357	264561_at	At1g55810	uracil phosphoribosyltransferase
2,22	0,00334419	267187_s_at	At2g44160	MTHFR2 (METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE 2); methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)
2,21	0,03573442	247297_at	At5g64100	peroxidase ATP3a (emb)CAA67340.1 supported by full-length cDNA: Ceres:3459.
2,21	0,00061492	250180_at	At5g14450	early nodule-specific protein - like early nodule-specific protein, Medicago truncatula, EMBL:AF064775
2,21	0,00039634	254192_at	At4g23850	acyl-CoA synthetase - like protein acyl-CoA synthetase, Brassica napus, X94624
2,21	0,00034345	254789_at	At4g12880	blue copper-binding protein, 15K (lamin) ;supported by full-length cDNA: Ceres:41510.
2,21	0,00010974	255751_at	At1g31950	terpene synthase family protein, putative contains Pfam profile: PF01397; Terpene synthase family
2,21	0,00154432	258470_at	At3g06035	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 6490.
2,21	0,00001702	260305_at	At1g70490	ARFA1D; GTP binding / phospholipase activator/ protein binding
2,21	0,00350565	261768_at	At1g15550	G43OX1 (GIBBERELLIN 3-OXIDASE 1); gibberellin 3-beta-dioxygenase/ transcription factor binding
2,21	0,00087665	262813_at	At1g11670	unknown protein strong similarity to gi 3367522 F8K4.9 from Arabidopsis thaliana BAC gb AC004392
2,21	0,00082208	263064_at	At2g18160	CPuORF1 (Conserved peptide upstream open reading frame 1)
2,21	0,00510608	266366_at	At2g41420	unknown protein
2,2	0,00375869	248853_at	At5g46570	BSK2 (BR-SIGNALING KINASE 2); ATP binding / binding / kinase/ protein tyrosine kinase
2,2	0,00201531	250580_at	At5g07440	GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2); ATP binding / glutamate dehydrogenase [NAD(P)+]
2,2	0,02524427	252189_at	At3g50070	CYCD3;3 (CYCLIN D3;3); cyclin-dependent protein kinase
2,2	0,00535874	256166_at	At1g36920	hypothetical protein
2,2	0,00315548	257071_at	At3g28180	ATCSCLO4 (CELLULOSE-SYNTHASE LIKE C4); cellulose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups
2,2	0,00803486	262713_at	At1g16520	unknown protein
2,2	0,00017837	267040_at	At2g34300	unknown protein
2,19	0,00018288	247442_s_at	At5g62690	TUB2; GTP binding / GTPase/ structural molecule
2,19	0,00279732	248003_at	At5g56220	putative protein contains similarity to unknown protein (pir T05382)
2,19	0,00023129	255816_at	At2g33470	GLTP1 (glycolipid transfer protein 1); glycolipid binding / glycolipid transporter
2,18	0,02209682	246854_at	At5g26200	mitochondrial carrier - like protein mitochondrial carrier protein, Ribes nigrum, EMBL:RN17580
2,18	0,00009323	248162_at	At5g54500	FQR1 (FLAVODOXIN-LIKE QUINONE REDUCTASE 1); FMN binding / oxidoreductase
2,18	0,00215846	262868_at	At1g64980	unknown protein
2,18	0,00607116	263183_at	At1g05570	CALS1 (CALLOSE SYNTHASE 1); 1,3-beta-glucan synthase/ transferase, transferring glycosyl groups
2,18	0,00221778	265704_at	At2g03420	hypothetical protein predicted by gensecan
2,18	0,00577036	266895_at	At2g26040	hypothetical protein predicted by gensecan and genefinder
2,17	0,00004795	246157_at	At5g20080	cytochrome-b5 reductase - like protein cytochrome-b5 reductase, Saccharomyces cerevisiae, PIR:S37800
2,17	0,00256578	246511_at	At5g15490	UDP-glucose dehydrogenase-like protein UDP-glucose 6-dehydrogenase - Glycine max, EMBL:U53418
2,17	0,00003841	246702_at	At5g28050	putative cytidine deaminase - like putative cytidine deaminase, Cicer arietinum, EMBL:AJ006764
2,17	0,00005044	247028_at	At5g67100	ICU2 (INCURVATA2); DNA-directed DNA polymerase
2,17	0,00393366	249220_at	At5g42420	putative protein strong similarity to unknown protein (gb AAF04433.1)
2,17	0,00149519	250354_at	At5g11640	putative protein predicted proteins, Drosophila melanogaster and Homo sapiens
2,17	0,00613868	255579_at	At4g01460	putative bHLH DNA-binding protein
2,17	0,01264709	259593_at	At1g27970	NTF2B (NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2B); Ran GTPase binding / protein transporter
2,17	0,02670778	260774_at	At1g78290	serine-threonine protein kinase, putative similar to serine-threonine protein kinase (TaPK3) from [Triticum aestivum]
2,17	0,0003122	261930_at	At1g22440	alcohol dehydrogenase ADH, putative similar to alcohol dehydrogenase ADH from [Lycopersicon esculentum]
2,17	0,00226895	262980_at	At1g75880	AtGH9B7 (Arabidopsis thaliana glycosyl hydrolase 9B7); catalytic/ hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
2,17	0,00184188	265894_at	At2g15050	LTP; lipid binding
2,16	0,00019527	252204_at	At3g50340	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
2,16	0,00095446	253946_at	At4g26790	putative APG protein proline-rich protein APG - Arabidopsis thaliana, EMBL:X60377
2,16	0,00273107	255629_at	At4g00860	ATOZ11
2,16	0,00030475	259543_at	At1g42480	unknown protein supported by full-length cDNA: Ceres:42677.
2,16	0,00031522	264120_at	At1g79340	AIMC4 (metacaspase 4); cysteine-type peptidase
2,16	0,00477923	264672_at	At1g09750	hypothetical protein predicted by gensecan;supported by full-length cDNA: Ceres:6295.
2,15	0,00269968	248007_at	At5g56260	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like
2,15	0,00008465	255590_at	At4g01610	cathepsin B-like cysteine protease, putative similar to cathepsin B-like cysteine proteinase from [Nicotiana rustica]
2,15	0,00029437	262837_at	At1g14830	ADL1C (ARABIDOPSIS DYNAMIN-LIKE PROTEIN 1C); GTP binding / GTPase
2,15	0,0000534	267349_at	At2g40010	60S acidic ribosomal protein P0
2,14	0,0108265	245951_at	At5g19550	ASP2 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 2); L-aspartate-2-oxoglutarate aminotransferase
2,14	0,00011011	246267_at	At1g31812	ACBP6 (acyl-CoA-binding protein 6); acyl-CoA binding / phosphatidylcholine binding
2,14	0,00015337	247040_at	At5g67150	anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:114226.
2,14	0,00580322	253687_at	At4g29520	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:142647.
2,14	0,00213098	255566_s_at	At4g01780	hypothetical protein
2,14	0,00081115	260281_at	At1g80500	unknown protein
2,14	0,00007987	261833_at	At1g10670	ACLA-1; ATP citrate synthase
2,14	0,00484766	264340_at	At1g70280	unknown protein similar to hypothetical protein GI:9755656 from [Arabidopsis thaliana]

2.14	0.0037467	264692	at	At1g70000	DNA binding protein MybSt1, putative similar to DNA binding protein MybSt1 GI:7705206 from [Solanum tuberosum]
2.14	0.00362668	266963	at	At2g39450	MTP11; cation transmembrane transporter/ manganese ion transmembrane transporter
2.13	0.00089231	245800	at	At1g46264	AT-HSFB4; DNA binding / transcription factor
2.13	0.02972766	247190	at	At5g65420	CYCD4.1 (CYCLIN D4.1); cyclin-dependent protein kinase regulator
2.13	0.00002121	250515	at	At5g09570	putative protein
2.13	0.00847056	265716	at	At2g03350	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:1697.
2.12	0.00131066	246730	at	At5g28060	40S ribosomal protein S19 - like 40S ribosomal protein S19, Cyanophora paradoxa, EMBL:CPA245654
2.12	0.01005496	247949	at	At5g7220	CYP81F2; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
2.12	0.00177555	251140	at	At5g01090	lectin - like protein lectin precursor LECSJAbml1, Sophora japonica, EMBL:SJU63012
2.12	0.01482014	252313	at	At3g49390	CID10; RNA binding / protein binding
2.12	0.00008987	253200	at	At4g34720	AVA-P1; ATPase/ proton-transporting ATPase, rotational mechanism
2.12	0.00119974	255046	at	At4g09650	ATPD (ATP SYNTHASE DELTA-SUBUNIT GENE); hydrogen ion transporting ATP synthase, rotational mechanism
2.12	0.0009607	258371	at	At3g14410	hypothetical protein contains similarity to putative ribophosphate/phosphoenolpyruvate translocator protein
2.12	0.01199031	258922	at	At3g10610	putative 40S ribosomal protein S17 similar to 40S ribosomal protein S17 GB:AAD50774 [Lycopersicon esculentum]
2.12	0.00061882	260268	at	At1g68490	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:37060.
2.12	0.01561222	264998	at	At1g67330	unknown protein similar to hypothetical protein GI:9665091 from [Arabidopsis thaliana]
2.12	0.00100292	265595	at	At2g20140	26S proteasome subunit 4 ;supported by full-length cDNA: Ceres:36815.
2.11	0.03278319	247563	at	At5g61130	PDCB1 (PLASMODESMATA CALLOSE-BINDING PROTEIN 1); callose binding / polysaccharide binding
2.11	0.02377289	248839	at	At5g46890	bHLH071 (beta HLH protein 71); DNA binding / transcription factor
2.11	0.00022068	249159	at	At5g43460	Nicotiana lesion-inducing like ; supported by full-length cDNA: Ceres: 327.
2.11	0.000192	251920	at	At3g53900	uracil phosphoribosyltransferase-like protein uracil phosphoribosyltransferase - Nicotiana tabacum, PIR:T03969
2.11	0.01184689	253428	at	At4g32410	CESA1 (CELLULOSE SYNTHASE 1); cellulose synthase/ transferase, transferring glycosyl groups
2.11	0.00399682	253927	at	At4g26710	putative protein
2.11	0.00175333	257949	at	At3g21750	UGT71B1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 71B1); UDP-glycosyltransferase/ quercetin 3-O-glucosyltransferase
2.11	0.00049241	259279	at	At3g01120	MT01 (METHIONINE OVERACCUMULATION 1); cystathionine gamma-synthase
2.1	0.00057328	245784	at	At1g32190	hypothetical protein similar to hypothetical protein GB:AAD18105 GI:4337191 from [Arabidopsis thaliana]
2.1	0.00174591	247444	at	At5g62630	HIPL2 (HIPL2 PROTEIN PRECURSOR); catalytic
2.1	0.01510809	251787	at	At3g55410	2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit - like protein 2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 subunit, At
2.1	0.00441774	255438	at	At4g03070	AOP1; oxidoreductase
2.1	0.00484234	261189	at	At1g33040	NAC5 (NASCENT POLYPEPTIDE-ASSOCIATED COMPLEX SUBUNIT ALPHA-LIKE PROTEIN 5)
2.1	0.00225906	263535	at	At2g24970	hypothetical protein predicted by gencan;supported by full-length cDNA: Ceres:10798.
2.1	0.00005913	266696	at	At2g19680	copa-like retroelement pol polyprotein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 14718.
2.1	0.00412974	266959	at	At2g07690	MCM5 J minichromosome maintenance family protein / MCM family protein
2.1	0.00017196	267277	at	At2g30050	putative protein transport protein SEC13 ;supported by full-length cDNA: Ceres:36577.
2.09	0.00655843	247436	at	At5g62530	ALDH12A1; 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase/ 3-chloroalyl aldehyde dehydrogenase
2.09	0.01094364	249384	at	At5g39890	putative protein hypothetical protein F8M21.10 - Arabidopsis thaliana, PIR:T49947
2.09	0.00570974	250108	at	At5g15150	ATHB-3 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEOBOX 3); DNA binding / transcription factor
2.09	0.02080212	252548	at	At3g45850	kinesin-related protein - like kinesin-related protein TKRP125, Nicotiana tabacum, PIR:T02017
2.09	0.00289292	257353	at	At2g23050	NPY4 (NAKED PINS IN YUC MUTANTS 4); protein binding / signal transducer
2.09	0.0152654	263137	at	At1g78660	ATGGH1 gamma-glutamyl hydrolyase, putative / gamma-Glu-X carboxypeptidase, putative / conjugase, putative
2.09	0.00067492	266693	at	At2g19800	MIOX2 (MYO-INOSITOL OXYGENASE 2); inositol oxygenase
2.09	0.00049388	266857	at	At2g26900	putative Na ⁺ dependent ileal bile acid transporter
2.08	0.00047286	249675	at	At5g35940	putative protein myrosinase-binding protein-like; also similar to jasmonate inducible protein-like
2.08	0.0005898	253404	at	At4g32840	PFK6 (PHOSPHOFRUCTOKINASE 6); 6-phosphofructokinase
2.08	0.00002155	255817	at	At2g33330	PDLP3 (PLASMODESMATA-LOCATED PROTEIN 3)
2.08	0.00077049	261410	at	At1g07610	MT1C; copper ion binding
2.07	0.0000436	246772	at	At5g27490	putative protein unknown protein T12H1.25 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC009177
2.07	0.00034389	264809	at	At1g08830	CSD1 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1); superoxide dismutase
2.07	0.00090171	266137	at	At2g45010	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:34688.
2.06	0.00030399	247076	at	At5g66510	GAMMA CA3 (GAMMA CARBONIC ANHYDRASE 3); carbonate dehydratase
2.06	0.0016802	250527	at	At5g08590	SNRK2.1 (SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2.1); kinase/ protein kinase
2.06	0.0078207	253304	at	At4g33640	putative protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:31672.
2.06	0.01109483	253836	at	At4g27840	putative protein hypothetical protein F28M11.90 - Arabidopsis thaliana, PIR:T04067
2.06	0.02298201	255290	at	At4g04640	ATPC1; enzyme regulator
2.06	0.01208955	255797	at	At2g33630	putative steroid dehydrogenase ; supported by cDNA: gi_16226672_gb_AF428460.1_AF428460
2.06	0.00742098	257923	at	At3g23160	hypothetical protein predicted by gencan+
2.06	0.00633939	266324	at	At2g46710	putative rac GTPase activating protein
2.05	0.02562818	251668	at	At3g57010	putative protein strictosidine synthase (EC 4.3.3.2) - Rauvolfia mannii (fragment)
2.05	0.0001924	252888	at	At4g39210	APL3; glucose-1-phosphate adenyltransferase
2.05	0.00013327	256441	at	At3g10940	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:3056.
2.05	0.001402	257820	at	At3g25220	FKBP15-1; FK506 binding / peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
2.05	0.0000974	258086	at	At3g25860	LTA2; dihydrolipoylysine-residue acetyltransferase
2.05	0.0001939	258702	at	At3g09730	hypothetical protein predicted by genefinder
2.05	0.00037846	259583	at	At1g28070	hypothetical protein
2.05	0.0137002	260081	at	At1g78170	unknown protein
2.05	0.00114292	261740	at	At1g47740	hypothetical protein similar to unknown protein GB:AAD23672 GI:4567258 from [Arabidopsis thaliana]
2.05	0.0005643	263482	at	At2g03980	putative GDSL-motif lipase/hydrolase similar to APG proteins; pFAM domain PF00657
2.05	0.00012133	264916	at	At1g60810	ACLA-2; ATP citrate synthase
2.05	0.01136477	265117	at	At1g62500	putative proline-rich cell wall protein (pir I52985)
2.04	0.00264253	245324	at	At4g17260	lactate dehydrogenase (LDH1) ;supported by full-length cDNA: Ceres:33509.
2.04	0.000411	245956	s_at	At5g28540	BIP2; ATP binding
2.04	0.00247639	250517	at	At5g06260	scpl35 (serine carboxypeptidase-like 35); serine-type carboxypeptidase
2.04	0.00024794	253374	at	At4g33140	hypothetical protein ; supported by cDNA: gi_15982924_gb_AY057570.1_
2.04	0.00190468	254356	at	At4g22190	hypothetical protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:6848.
2.04	0.00244839	261203	at	At1g12845	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 13526.
2.04	0.01767422	266735	at	At2g46930	putative pectinesterase ; supported by cDNA: gi_15450606_gb_AY052671.1_
2.03	0.00013202	247150	at	At5g65650	putative protein similar to unknown protein (emb CAB16809.1); supported by full-length cDNA: Ceres: 118150.
2.03	0.00793275	248685	at	At5g48500	putative protein similar to unknown protein (gb AAD28645.1);supported by full-length cDNA: Ceres:14816.
2.03	0.0000788	248792	at	At5g47200	ATRB1A; GTP binding
2.03	0.00485726	250633	at	At5g07460	PMSR2 (PEPTIDEMETHIONINE SULFOXIDE REDUCTASE 2); oxidoreductase, acting on sulfur group of donors
2.03	0.00040535	250761	at	At5g06050	ankyrin-like protein
2.03	0.00023055	251319	at	At3g61610	putative protein POSSIBLE APOSPORY-ASSOCIATED PROTEIN C - Pennisetum ciliare (Buffelgrass)
2.03	0.0282558	251921	at	At3g53890	40S ribosomal protein S21 homolog ribosomal protein S21, cytosolic - Oryza sativa, PIR:S38357
2.03	0.00870051	258089	at	At3g14740	hypothetical protein predicted by gencan+;supported by full-length cDNA: Ceres:98961.
2.03	0.00703894	262749	at	At1g28580	lipase, putative contains Pfam profile: PF00657 Lipase/Acylhydrolase with GDSL-like motif
2.03	0.00507089	263663	at	At1g04410	putative malate dehydrogenase similar to GB:AAB64290;supported by full-length cDNA: Ceres:40467.
2.03	0.00114326	263789	at	At2g24560	putative GDSL-motif lipase/hydrolase similar to APG proteins; pFAM domain PF00657
2.03	0.00056595	265339	at	At2g18230	AtPPa2 (Arabidopsis thaliana pyrophosphorylase 2); inorganic diphosphatase/ pyrophosphatase
2.03	0.00038048	266503	at	At2g47780	unknown protein
2.02	0.00006059	245791	at	At1g32210	ATDAD1 (DEFENDER AGAINST APOPTOTIC DEATH 1)
2.02	0.01630728	251264	at	At3g62120	multifunctional aminoacyl-tRNA ligase-like protein multifunctional aminoacyl-tRNA ligase - Homo sapiens
2.02	0.00105198	251541	at	At3g58750	CSY2 (citrate synthase 2); citrate (S)-synthase
2.02	0.03126264	252250	at	At3g49790	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana
2.02	0.00020356	252514	at	At3g46060	ATRB8A; GTP binding
2.02	0.00427032	253173	at	At4g35110	putative protein pEARLI 4, Arabidopsis thaliana, PATCHX:G871782
2.02	0.00280767	260548	at	At2g43360	BIO2 (BIOTIN AUXOTROPH 2); biotin synthase
2.02	0.00002243	264020	at	At2g21160	putative signal sequence receptor, alpha subunit (SSR-alpha) Same as GP: 1174448
2.02	0.00729727	264365	s_at	At1g03220	unknown protein Strong similarity to extracellular dermal glycoprotein (EDGP) precursor from Daucus carota.
2.02	0.00093383	265219	at	At2g02050	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 39285.
2.01	0.00034332	245523	at	At4g15910	ATDI21 (ARABIDOPSIS THALIANA DROUGHT-INDUCED Z1)
2.01	0.00458559	247266	at	At5g64570	XYL4; hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds / xylan 1,4-beta-xylosidase
2.01	0.00093956	247929	at	At5g57330	apospory-associated protein C
2.01	0.00074938	250468	at	At5g10120	transcription factor TEIL/ethylene-insensitive - like protein transcription factor TEIL, Nicotiana tabacum
2.01	0.0010729	253720	at	At4g29270	acid phosphatase-like protein acid phosphatase-1 (EC 3.1.3.-) - Lycopersicon esculentum,PIR2:T06587
2.01	0.00002449	254711	at	At4g18060	putative protein
2.01	0.00482813	257095	at	At3g20560	ATPDL5-3 (PDI-LIKE 5-3); protein disulfide isomerase
2.01	0.00031849	258852	at	At3g06300	AT-P4H-2 (A. THALIANA P4H ISOFORM 2); oxidoreductase
2.01	0.00101222	260913	at	At1g02500	SAM1 (S-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1); methionine adenosyltransferase
2.01	0.00549678	262170	at	At1g74940	hypothetical protein predicted by genemark.hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:24864.
2.01	0.00007592	262426	s_at	At1g47630	cytochrome P450, putative similar to cytochrome P450 GI:4688670 from [Catharanthus roseus]
2	0.01496892	247010	at	At5g67510	60S ribosomal protein L26 ;supported by full-length cDNA: Ceres:2561.

ANEXO II

2	0,01668502	247835_at	At5g57910	putative protein similar to unknown protein (emb CAB79781.1);supported by full-length cDNA: Ceres:31005.
2	0,00660429	251231_at	At3g62760	ATGSTF13: glutathione transferase
2	0,003785	256964_at	At3g13520	AGP12 (ARABINOGLACTAN PROTEIN 12)
2	0,00080853	257244_at	At3g24240	receptor kinase ,putative similar to CLV1 receptor kinase GB:AAB58929 from [Arabidopsis thaliana]
2	0,00796623	258087_at	At3g26060	ATPRX Q; antioxidant/ peroxidoxin
2	0,00228794	259955_s_at	At1g75080	BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1); DNA binding / transcription regulator/ transcription repressor
2	0,00701299	260288_at	At1g80530	nodulin-like protein similar to nodule-specific protein Nlj70 GB:AAC39500 from [Lotus japonicus]
2	0,01697044	260553_at	At2g41800	unknown protein similar to T11A07.9
2	0,00401668	260857_at	At1g21880	LYM1 (LYSM DOMAIN GPI-ANCHORED PROTEIN 1 PRECURSOR)
2	0,00037292	263074_at	At2g17560	HMGB4 (HIGH MOBILITY GROUP B 4); DNA binding / chromatin binding / structural constituent of chromatin
2	0,00210385	264052_at	At2g22330	CYP79B3; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
2	0,00145855	267008_at	At2g39350	putative ABC transporter
2	0,00078542	267151_at	At2g30970	ASP1 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 1); L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase
-2	0,00097316	247672_at	At5g60220	TET4 (TETRASPANIN4)
-2	0,0006026	248336_at	At5g52420	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15146255_gb_AY049269.1_
-2	0,00321862	266072_at	At2g18700	ATTPS11; transferase, transferring glycosyl groups
-2,01	0,03273865	251882_at	At3g54140	PTR1 (PEPTIDE TRANSPORTER 1); dipeptide transporter/ transporter/ tripeptide transporter
-2,01	0,00464945	252092_at	At3g51420	SSL4 (STRICTOSIDINE SYNTHASE-LIKE 4); strictosidine synthase
-2,01	0,04034094	253672_at	At4g29820	CFIM-25
-2,01	0,01461976	253984_at	At4g26590	OPT5 (OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER 5); oligopeptide transporter
-2,01	0,01297962	255255_at	At4g05070	coded for by A. thaliana cDNA T44741
-2,01	0,0362259	257333_at	cox1	cytochrome c oxidase subunit 1
-2,01	0,00888155	258026_at	At3g19290	ABF4 (ABRE BINDING FACTOR 4); DNA binding / protein binding / transcription activator/ transcription factor
-2,01	0,00006145	258792_at	At3g04640	hypothetical protein predicted by genefinder:supported by full-length cDNA: Ceres:8992.
-2,01	0,00984788	267321_at	At2g19320	hypothetical protein predicted by genefinder
-2,02	0,00663924	248558_at	At5g49990	permease
-2,02	0,00086076	252135_at	At3g50830	COR413-PM2 (COLD-REGULATED 413-PLASMA MEMBRANE 2)
-2,02	0,00337949	262703_at	At1g16510	putative auxin-induced protein similar to gb D14414 Indole-3-acetic acid induced protein from Vigna radiata
-2,03	0,00173869	246951_at	At5g04880	unknown protein
-2,03	0,00030926	248181_at	At5g54290	cytochrome c biogenesis protein precursor (gb AAF35369.1) ;supported by full-length cDNA: Ceres:32771.
-2,03	0,03460632	253048_at	At4g37560	formamidase - like protein formamidase, Methylphilus methylotrophus, PIR2:S74213
-2,03	0,01916201	261821_at	At1g11530	ATCXXS1 (C-terminal cysteine residue is changed to a serine 1); protein disulfide isomerase
-2,03	0,03139298	266690_at	At2g19900	ATNADP-ME1 (NADP-malic enzyme 1); malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP+)
-2,04	0,00035049	246463_at	At5g16970	AT-AER (alkenal reductase), 2-alkenal reductase
-2,04	0,04221219	247793_at	At5g58650	PSY1 (plant peptide containing sulfated tyrosine 1)
-2,04	0,01177257	255418_at	At4g03200	predicted protein of unknown function
-2,04	0,00126608	257216_at	At3g14990	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein, putative similar to ThiJ [Escherichia coli]
-2,04	0,00474373	259275_at	At3g01060	unknown protin ;supported by full-length cDNA: Ceres:37425.
-2,05	0,00051553	246595_at	At5g14780	FDH (FORMATE DEHYDROGENASE); NAD or NADH binding / binding / catalytic/ cofactor binding / oxidoreductase
-2,05	0,01319133	250380_at	At5g11600	putative protein
-2,05	0,00323231	250627_at	At5g07360	putative amidase
-2,05	0,00083136	261135_at	At1g19610	PDF1.4
-2,05	0,03631806	261663_at	At1g18330	EPR1 (EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1); DNA binding / transcription factor
-2,06	0,00004709	250476_at	At5g10140	FLC (FLOWERING LOCUS C); specific transcriptional repressor/ transcription factor
-2,06	0,00264531	256071_at	At1g13640	ubiquitin, putative similar to ubiquitin GI:10177083 from [Arabidopsis thaliana]
-2,06	0,02909227	258939_at	At3g10020	unknown protein predicted by genefinder, multiple est matches:supported by full-length cDNA: Ceres:7073.
-2,06	0,0156223	261751_at	At1g76080	CDSF32 (CHLOROPLASTIC DROUGHT-INDUCED STRESS PROTEIN OF 32 KD)
-2,06	0,00328914	265276_at	At2g28400	hypothetical protein predicted by gencan and genefinder
-2,06	0,0125183	267084_at	At2g41180	unknown protein ; supported by cDNA: gi_16323164_gb_AY057686.1
-2,07	0,01172469	248311_at	At5g52570	BETA-OHASE 2 (BETA-CAROTENE HYDROXYLASE 2); carotene beta-ring hydroxylase
-2,08	0,00942381	246222_at	At4g36900	RAP2.10 (related to AP2 10); DNA binding / transcription factor
-2,08	0,01825782	247172_at	At5g65550	anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase
-2,08	0,03542792	250485_at	At5g09990	PROPEP5 (Elicitor peptide 5 precursor)
-2,08	0,00014914	250748_at	At5g05710	AtPH1-like protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:109246.
-2,08	0,01483392	254915_s_at	At4g11310	cysteine proteinase contains similarity to cysteine proteinase RD21A (thiol protease) from [Arabidopsis thaliana]
-2,09	0,00037326	248076_at	At5g55750	unknown protein
-2,09	0,00389427	249806_at	At5g23850	putative protein contains similarity to unknown protein (emb CAB62012.1)
-2,09	0,00021957	251879_at	At3g54200	putative protein hml1 protein, Nicotiana tabacum, PIR:T03265:supported by full-length cDNA: Ceres:1678.
-2,09	0,00106119	259091_at	At3g04890	hypothetical protein predicted by gencan:supported by full-length cDNA: Ceres:1230.
-2,09	0,00104928	259977_at	At1g76590	unknown protein ;supported by full-length cDNA: Ceres:114376.
-2,09	0,00264179	262047_at	At1g80160	hypothetical protein predicted by genemark.hmm:supported by full-length cDNA: Ceres:21663.
-2,09	0,00367048	266514_at	At2g47890	putative zinc-finger protein (B-box zinc finger domain)
-2,1	0,01766101	246815_at	At5g27220	putative protein integrin analogue, Saccharomyces cerevisiae, EMBL:SCINTANA
-2,1	0,00109501	247543_at	At5g61600	DNA binding protein - like DNA binding protein EREBP-4, Nicotiana tabacum, PIR:T02434
-2,1	0,00028191	251300_at	At3g61980	hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:20358.
-2,1	0,01022092	252415_at	At3g47340	ASN1 (GLUTAMINE-DEPENDENT ASPARAGINE SYNTHASE 1); asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)
-2,1	0,00173092	255625_at	At4g01120	GBF2 (G-BOX BINDING FACTOR 2); DNA binding / sequence-specific DNA binding / transcription factor
-2,11	0,00026378	250944_at	At5g03380	putative protein
-2,11	0,00431097	251306_at	At3g61260	putative DNA-binding protein DNA-binding protein (dbp) - Arabidopsis thaliana, EMBL:ATDNABP
-2,11	0,00426852	251620_at	At3g58060	putative protein hypothetical protein F12L6.11 - Arabidopsis thaliana, PIR:T00555
-2,11	0,00728315	258873_at	At3g03240	hypothetical protein similar to unknown protein GB:AAD21437 from F2H17
-2,11	0,00289111	262700_at	At1g76020	unknown protein
-2,11	0,00095296	264092_at	At1g79040	PSBR (photosystem II subunit R)
-2,12	0,00645268	245089_at	At2g45290	putative transketolase precursor ; supported by cDNA: gi_15982841_gb_AY057528.1
-2,12	0,00459431	250340_at	At5g11840	putative protein predicted proteins in Synechococcus, Cyanophora and other organisms
-2,12	0,00026576	254013_at	At4g26050	putative leucine-rich-repeat protein leucine-rich-repeat protein - Helianthus annuus, PID:e120583
-2,12	0,01220327	259705_at	At1g77450	anac032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor
-2,12	0,00027761	260662_at	At1g19540	2-hydroxyisoflavone reductase, putative similar to PIR:T08106 from [Betula pendula]
-2,12	0,00070634	262118_at	At1g02850	BGLU11 (BETA GLUCOSIDASE 11); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-2,12	0,00137104	262290_at	At1g70985	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 102374.
-2,13	0,00149714	245194_at	At1g67820	F12A21.5 similar to protein phosphatase 2C emb CAA72341.1
-2,13	0,0015539	247883_at	At5g57790	unknown protein
-2,13	0,00372203	259212_at	At3g09180	hypothetical protein predicted by genefinder; supported by full-length cDNA: Ceres: 119803.
-2,13	0,00154273	260272_at	At1g80570	F-box protein family, AtFBL14 contains similarity to F-box protein FBL2 GI:6063090 from [Homo sapiens]
-2,13	0,00030781	260917_at	At1g02700	unknown protein similar to hypothetical protein GB:CAB80707 GI:7268598 from [Arabidopsis thaliana]
-2,14	0,04482246	248086_at	At5g55490	GEX1 (GAMETE EXPRESSED PROTEIN 1)
-2,14	0,00207861	252395_at	At3g47950	AHA4: ATPase/ hydrogen-exporting ATPase, phosphorylative mechanism
-2,14	0,01071414	255787_at	At2g33590	putative cinnamoyl-CoA reductase highly similar to F4P9.37:supported by full-length cDNA: Ceres:11254.
-2,14	0,0298126	256518_at	At1g66080	hypothetical protein
-2,14	0,03753916	259012_at	At3g07360	PUB9 (PLANT U-BOX 9)
-2,14	0,00018715	262536_at	At1g17100	SOUL-like protein Similar to SOUL Protein [Mus musculus] (gi 4886906) and [Homo sapiens] (gi 4886910)
-2,14	0,00497011	262635_at	At1g06570	PDS1 (PHYTOENE DESATURATION 1); 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
-2,15	0,00241966	246299_at	At3g51810	EM1 (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 1)
-2,15	0,0069685	250281_at	At5g13240	putative protein predicted proteins, Schizosaccharomyces pombe
-2,15	0,00757189	259528_at	At1g12330	hypothetical protein
-2,16	0,00040179	249330_at	At5g40970	putative protein similar to unknown protein (emb CAB62355.1);supported by full-length cDNA: Ceres:94968.
-2,17	0,00199454	245807_at	At1g46768	RAF2.1 (related to AP2 1); DNA binding / transcription factor
-2,17	0,00041128	247074_at	At5g66590	putative protein contains similarity to pathogenesis-related protein:supported by full-length cDNA: Ceres:2152.
-2,17	0,00028457	247280_at	At5g64260	EXL2 (EXORDIUM LIKE 2)
-2,17	0,01045947	254759_at	At4g13180	short-chain alcohol dehydrogenase like protein short-chain alcohol dehydrogenase -Picea abies, PIR2:S34678
-2,17	0,00334819	262379_at	At1g73020	hypothetical protein predicted by gencan+
-2,17	0,03641557	262569_at	At1g15180	hypothetical protein Strong similarity to gi 4734005 F3L12.7 hypothetical protein from At BAC gb AC007178
-2,17	0,00195727	266034_at	At2g06005	FIP1 unknown protein
-2,17	0,00053318	267500_s_at	At2g45510	CYP70A41; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2,18	0,00045858	248763_at	At5g47550	putative protein similar to unknown protein (pir H71431);supported by full-length cDNA: Ceres:31680.
-2,18	0,00821198	255077_at	At4g09150	putative protein
-2,18	0,00033849	261711_at	At1g32700	unknown protein similar to hypothetical protein GB:AAF25968 GI:6714272 from [Arabidopsis thaliana]
-2,18	0,02212415	262164_at	At1g78070	unknown protein ; supported by cDNA: gi_13937194_gb_AF372951.1_AF372951
-2,19	0,00063734	258682_at	At3g08720	SK62 (ARABIDOPSIS THALIANA SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 2); kinase/ protein kinase
-2,2	0,00011801	246289_at	At3g56880	putative protein predicted protein At2g41010 - Arabidopsis thaliana, EMBL:AC004261
-2,2	0,00521094	248138_at	At5g54960	PDC2 (pyruvate decarboxylase-2); carboxy-lyase/ catalytic/ magnesium ion binding / pyruvate decarboxylase

-2.2	0.00006138	266984_at	At2q39570	unknown protein ; supported by cDNA: gi_15010737_gb_AY045670.1
-2.21	0.00558433	249869_at	At5g45310	unknown protein ; supported by cDNA: gi_14030678_gb_AF375430.1_AF375430
-2.21	0.00027131	249532_at	At5g38780	AtPP - like protein AtPP protein, Brassica napus, EMBL:BN245479
-2.21	0.01331958	253177_s_at	At4g35150	O-methyltransferase - like protein caffeic acid O-methyltransferase, Pinus taeda, gb:U39301
-2.21	0.01202602	253322_at	At4g33980	putative protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:8161.
-2.21	0.00155502	253358_at	At4g32940	GAMMA-VPE (GAMMA VACUOLAR PROCESSING ENZYME); cysteine-type endopeptidase
-2.21	0.01010616	254414_at	At4g21320	HS432 (HEAT-STRESS-ASSOCIATED 32); catalytic
-2.21	0.00024164	266126_at	At2g45040	putative metalloproteinase ; supported by cDNA: gi_3128476_gb_AF062640.1_AF062640
-2.22	0.02669289	255493_at	At4g02690	putative glutamate/aspartate-binding peptide similar to rat N-methyl-D-aspartate receptor glutamate-binding chain
-2.22	0.0094471	258723_at	At3g09600	putative MYB-related protein similar to MYB-related protein GB:CAA73305
-2.22	0.00461963	260005_at	At1g67920	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:13102.
-2.22	0.00103094	264941_at	At1g60680	auxin-induced protein, putative similar to auxin-induced protein(atb2) G1:6562980 from [Arabidopsis thaliana]
-2.22	0.00789201	266689_at	At2g19930	hypothetical protein predicted by gencan and genefinder
-2.23	0.00745216	248193_at	At5g54080	HGO (HOMOGENITISATE 1.2-DIOXYGENASE); homogentisate 1,2-dioxygenase
-2.23	0.0022712	257081_at	At3g30460	RING zinc finger protein contains Pfam profile: PF00097 zinc finger, C3HC4 type (RING finger)
-2.23	0.00977677	257122_at	At3g20250	APUM5 (Arabidopsis Pumilio 5); RNA binding / binding
-2.24	0.01651518	251342_at	At3g60690	putative protein SAUR-AC1, Arabidopsis thaliana, PIR:T06804
-2.24	0.00410148	256192_at	At1g30110	ATNUDX25 (ARABIDOPSIS THALIANA NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 25); bis(5-nucleosyl)-tetraphosphatase
-2.24	0.00168621	259149_at	At3g10340	PAL4 (Phenylalanine ammonia-lyase 4); ammonia lyase/ ammonia-lyase/ catalytic
-2.24	0.02239308	259432_at	At1g01520	myb-related protein, putative similar to myb-related protein G1:2505876 from [Arabidopsis thaliana]
-2.24	0.01407747	263931_at	At2g36220	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:12251.
-2.25	0.0001379	262098_at	At1g56170	NF-YC2 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT C2); DNA binding / transcription activator/ transcription factor
-2.25	0.00568389	262250_at	At1g48280	Expressed protein predicted by gencan+; supported by cDNA: gi_15983792_gb_AY056802.1
-2.25	0.0015036	265417_at	At2g20920	unknown protein
-2.26	0.00605583	250207_at	At5g13930	TT4 (TRANSPARENT TESTA 4); naringenin-chalcone synthase
-2.26	0.00176448	262667_at	At1g62810	amine oxidase, putative similar to amine oxidase GB:AAD49420 G1:5733089 [Canavalia lineata]
-2.27	0.00103721	255007_at	At4g10020	AtHSD5 (hydroxysteroid dehydrogenase 5); binding / catalytic/ oxidoreductase
-2.27	0.04222661	258984_at	At3g08970	ATERDJ3A; oxidoreductase
-2.27	0.0002299	261294_at	At1g48430	dihydroxyacetone kinase, putative similar to GB:U09771 from [Citrobacter freundii]
-2.27	0.01129416	262185_at	At1g77950	AGL67 (AGAMOUS-LIKE 67); transcription factor
-2.28	0.00224044	244951_s_at	ccb452	cytochrome c biogenesis orf452
-2.28	0.00338756	245233_at	At4g25580	putative protein similarity to low-temperature-induced protein 65, Arabidopsis thaliana
-2.28	0.0000477	252962_at	At4g38780	splicing factor - like protein splicing factor Prp8, Homo sapiens, AF092565
-2.29	0.00039666	250351_at	At5g12030	AT-HSP17.6A (ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK PROTEIN 17.6A); unfolded protein binding
-2.29	0.00031691	250611_at	At5g07200	GA20OX3 YAP169; gibberellin 20-oxidase
-2.29	0.00680331	256697_at	At3g20660	AtOCT4 (Arabidopsis thaliana ORGANIC CATION/CARNITINE TRANSPORTER4); sugar
-2.29	0.01199833	260014_at	At1g68010	HPR; glycerate dehydrogenase/pU(V) binding
-2.3	0.00353986	247199_at	At5g65210	TGA1; DNA binding / calmodulin binding / transcription factor
-2.3	0.01227088	252405_at	At3g48120	putative protein RNA helicase HEL117, Rattus norvegicus, PIR2:A57514
-2.3	0.00109548	254722_at	At4g13530	putative protein predicted protein, Arabidopsis thaliana; supported by full-length cDNA: Ceres:112156.
-2.3	0.00133985	258141_at	At3g18035	HON4; DNA binding
-2.3	0.00103411	261803_at	At1g30500	NF-YA7 (NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A7); specific transcriptional repressor/ transcription factor
-2.31	0.01263705	253496_at	At4g31870	ATGPX7 (glutathione peroxidase 7); glutathione peroxidase
-2.32	0.01154797	250874_at	At5g04010	putative protein
-2.32	0.00893812	254833_s_at	At4g12280	copper amine oxidase like protein (fragment2) copper amine oxidase - Cicer arietinum,PID:e1335964
-2.32	0.00032828	259615_at	At1g47980	desiccation-related protein, putative similar to desiccation-related protein from [Cratogeomys plantagineum]
-2.32	0.00541982	260561_at	At2g43580	putative endochitinase
-2.32	0.000775	261901_at	At1g80920	J8; heat shock protein binding / unfolded protein binding
-2.33	0.00010354	245555_at	At4g15390	HSR201 like protein
-2.33	0.00328565	252019_at	At3g53040	late embryogenesis abundant protein - like late embryogenesis abundant protein, Arabidopsis thaliana, PIR:JC6171
-2.33	0.00134217	262499_at	At1g21770	unknown protein EST gb T41993 comes from this gene;supported by full-length cDNA: Ceres:97320.
-2.34	0.02805646	255818_at	At2g33570	hypothetical protein predicted by genefinder and gencan;supported by full-length cDNA: Ceres:119054.
-2.34	0.00005705	258972_at	At3g01920	hypothetical protein predicted by gencan+
-2.35	0.03629125	246018_at	At5g10695	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:103171.
-2.35	0.00003453	249827_at	At5g23330	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:158431.
-2.35	0.00272448	260025_at	At1g30070	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:270659.
-2.35	0.00097735	261496_at	At1g28360	ERF12 (ERF DOMAIN PROTEIN 12); DNA binding / transcription factor/ transcription repressor
-2.35	0.01582791	267477_at	At2g02710	PLPB (PAS/LOV PROTEIN B); signal transducer/ two-component sensor
-2.37	0.00558241	261065_at	At1g07500	hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-2.38	0.00028353	256145_at	At1g48750	lipid transfer protein, putative similar to lipid transfer protein G1:9279661 from [Arabidopsis thaliana]
-2.38	0.00740234	261026_at	At1g01240	hypothetical protein predicted by genemark.hmm;supported by full-length cDNA: Ceres:34178.
-2.38	0.00242005	264821_at	At1g03470	hypothetical protein predicted by genefinder
-2.39	0.00001982	264889_at	At1g23050	unknown protein
-2.39	0.00605062	267336_at	At2g19310	putative small heat shock protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:99763
-2.4	0.00327501	249983_at	At5g18470	putative protein S-receptor kinase PK3 precursor, maize, PIR:T02753;supported by full-length cDNA: Ceres:154037.
-2.4	0.00254721	264923_s_at	At1g60740	peroxidoreductin, putative similar to type 2 peroxidoreductin G1:4928472 from [Brassica rapa];supported by full-length cDNA
-2.41	0.00001419	247831_at	At5g58540	putative protein serine/threonine-specific protein kinase NPK15, Nicotiana tabacum, PIR:S52578
-2.41	0.00305309	250938_at	At5g03180	putative protein various predicted proteins, Arabidopsis thaliana
-2.41	0.00003885	261936_at	At1g22600	seed maturation protein PM27, putative similar to seed maturation protein PM27 G1:4836403 from [Glycine max]
-2.41	0.00395742	264774_at	At1g22890	unknown protein
-2.42	0.00150637	264956_at	At1g76990	ACR3; amino acid binding
-2.43	0.00053976	247866_at	At5g75550	XTR3 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 3); hydrolase, acting on glycosyl bonds
-2.43	0.00080413	249708_at	At5g35660	unknown protein
-2.44	0.00531537	250776_at	At5g05320	monooxygenase ; supported by full-length cDNA: Ceres:120478.
-2.44	0.00495185	265828_at	At2g14520	hypothetical protein predicted by gencan
-2.45	0.00119531	250889_at	At5g04500	putative protein exostose-related protein 2, Homo sapiens, PIR:JC5935
-2.46	0.00214853	247855_at	At5g58210	similar to unknown protein (sp P23253)
-2.46	0.00313237	258064_at	At3g14680	CYP72A14; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.46	0.00083795	262977_at	At1g75490	transcription factor, putative similar to DREB2A GB:BAA33794 G1:3738230 from [Arabidopsis thaliana]
-2.47	0.00277478	249326_at	At5g40840	SYN2
-2.47	0.00050434	258827_at	At3g07150	hypothetical protein predicted by genefinder
-2.47	0.00002575	260498_at	At2g41710	putative AP2 domain transcription factor pFAM domain (PF00847); supported by full-length cDNA: Ceres:41462.
-2.48	0.0150858	249045_at	At5g44380	berberine bridge enzyme-like protein
-2.48	0.0019678	262291_at	At1g70790	zinc finger and C2 domain protein
-2.49	0.00809786	259217_at	At3g03620	unknown protein similar to F16N3.20 GB:AAD46034 [Arabidopsis thaliana]
-2.5	0.00667028	251245_at	At3g62090	PIL2 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE 2); protein binding / transcription factor
-2.5	0.00093852	263412_at	At2g28720	putative histone H2B ; supported by full-length cDNA: Ceres:14965.
-2.5	0.00072152	263866_at	At2g36950	putative farnesylated protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:19570.
-2.51	0.00005407	263350_at	At2g13360	AGT (ALANINE:GLYOXYLATE AMINOTRANSFERASE); alanine-glyoxylate transaminase
-2.51	0.00541441	266746_s_at	At2g02930	ATGSTF3 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3); glutathione transferase
-2.52	0.00035333	246612_at	At5g35320	putative protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:38281.
-2.52	0.00144492	247819_at	At5g58350	WNK4 (WITH NO K (=LYSINE) 4); kinase/ protein kinase
-2.52	0.00263543	264402_at	At2g25140	CLPB4 (CASEIN LYTIC PROTEINASE B4); ATP binding / ATPase/ nucleotide binding / protein binding
-2.54	0.0021168	256513_at	At1g31480	SGR2 (SHOOT GRAVITROPISM 2); phospholipase A1
-2.54	0.00053714	267286_at	At2g23640	putative seed maturation protein
-2.55	0.00774413	261405_at	At1g18740	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:40753.
-2.56	0.01622365	245627_at	At1g56800	AtGolS2 (Arabidopsis thaliana galactinol synthase 2); transferase, transferring glycosyl groups / transferase
-2.56	0.00066703	251350_at	At3g61040	CYP76C7; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-2.56	0.00003997	260459_at	At1g68240	hypothetical protein predicted by gencan+
-2.58	0.00142877	261564_at	At1g01720	ATAF1; transcription activator/ transcription factor
-2.59	0.0021401	251428_at	At3g60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-2.6	0.0099357	252825_at	At4g39890	AtRABH1c (Arabidopsis Rab GTPase homolog H1c); GTP binding / protein binding
-2.61	0.00009366	253163_at	At4g35750	putative protein E1B 19K/Bc1-2-interacting protein Nip2, Homo sapiens, PIR2:138864
-2.61	0.00488405	254263_at	At4g23493	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:270232
-2.61	0.00791415	255602_at	At4g01026	Expressed protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:36229.
-2.62	0.00115995	260546_at	At2g43520	ATTI2; serine-type endopeptidase inhibitor
-2.63	0.00530872	258923_at	At3g10450	SCPL7 (SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 7); serine-type carboxypeptidase
-2.64	0.00061034	259911_at	At1g72680	CAD1 cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative
-2.64	0.00089567	262314_at	At1g70810	unknown protein contains similarity to zinc finger and C2 domain protein G1:9957238 from [Arabidopsis thaliana]
-2.65	0.01381949	249465_at	At5g39720	AIG2L (AVIRULENCE INDUCED GENE 2 LIKE PROTEIN)
-2.66	0.00005655	266355_at	At2g01400	hypothetical protein predicted by gencan; supported by full-length cDNA: Ceres:2422.

ANEXO II

-2.67	0,00174134	246133_at	At5g20960	AAO1 (ARABIDOPSIS ALDEHYDE OXIDASE 1); aldehyde oxidase/ indole-3-acetaldehyde oxidase
-2.67	0,00059898	263647_at	At2g04690	unknown protein
-2.71	0,00069634	248625_at	At5g48880	PKT2 (PEROXISOMAL 3-KETO-ACYL-COA THIOLEASE 2); acetyl-CoA C-acyltransferase/ catalytic
-2.71	0,00010361	262527_at	At1g17010	SRG1-like protein Strong homology to SRG1 protein, a new member of the Fe(II)/ascorbate oxidase superfamily
-2.72	0,01932352	254839_at	At4g12400	stress-induced protein sti1-like protein stress-induced protein sti1 -Glycine max.PID:q872116
-2.73	0,0053529	254580_at	At4g19390	putative protein ; supported by cDNA: gi_14190356_gb_AF378856.1_AF378856
-2.74	0,00104231	252183_at	At3g50740	UGT72E1 (UDP-glucosyl transferase 72E1); UDP-glucosyltransferase/ coniferyl-alcohol glucosyltransferase
-2.75	0,00036112	259520_at	At1g12320	hypothetical protein
-2.76	0,00007102	257841_at	At3g25260	nitrate transporter, putative similar to nitrate transporter (NLT1) GB:AA28086 [Arabidopsis thaliana]
-2.77	0,02080162	248657_at	At5g48570	ROF2 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / FK506-binding protein, putative
-2.78	0,01382904	247774_at	At5g58660	putative protein fruit ripening expressed protein, Lycopersicon esculentum, EMBL:LEETHYBR
-2.78	0,0271754	249575_at	At5g37670	low-molecular-weight heat shock protein - like cytosolic class I small heat-shock protein HSP17.5, Castanea sativa
-2.78	0,00027422	252515_at	At3g46230	ATHSP17.4
-2.82	0,00392479	254396_at	At4g21680	peptide transporter - like protein peptide transporter (ptr1) - Hordeum vulgare, AF023472
-2.83	0,00007746	263985_at	At2g42750	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:15743.
-2.83	0,00105939	265095_at	At1g03880	CRU2 (CRUCIFERIN 2); nutrient reservoir
-2.84	0,01868872	248932_at	At5g46050	PTR3 (PEPTIDE TRANSPORTER 3); dipeptide transporter/ transporter/ tripeptide transporter
-2.84	0,00007009	263320_at	At2g47180	ALG1S1 (Arabidopsis thaliana galactinol synthase 1); transferase, transferring glycosyl groups / transferase
-2.86	0,00009598	252089_at	At3g52110	putative protein
-2.86	0,00029868	264663_at	At1g09970	LRR XI-23; ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase
-2.89	0,00659415	249454_at	At5g39520	expressed protein predicted protein, Synechocystis sp., PIR:S77152; supported by full-length cDNA: Ceres: 5331.
-2.91	0,00026256	255844_at	At2g33580	putative protein kinase contains a protein kinase domain profile (PD0C00100)
-2.92	0,00215308	256454_at	At1g75280	NADPH oxidoreductase, putative similar to GI:1708420 from [Arabidopsis thaliana]
-2.94	0,00002811	247128_at	At5g66110	atfp6-like protein
-2.95	0,00058164	247463_at	At5g62210	embryo-specific protein - like embryo-specific protein 3, Arabidopsis thaliana, PIR:T48490
-2.95	0,00060981	267313_at	At2g34740	putative protein phosphatase 2C
-2.96	0,00224096	265675_at	At2g32120	HSP70T-2 (HEAT-SHOCK PROTEIN 70T-2); ATP binding
-2.99	0,00243617	258322_at	At3g22740	HMT3; homocysteine S-methyltransferase
-3	0,0144089	254339_at	At4g22100	BGLU3 (BETA GLUCOSIDASE 2); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
-3.02	0,01089221	247293_at	At5g64510	putative protein similar to unknown protein (pir IT03813)
-3.03	0,00050504	248544_at	At5g50240	PIMT2 (PROTEIN-L-ISOASPARTATE METHYLTRANSFERASE 2)
-3.03	0,00060524	262505_at	At1g21680	unknown protein ESTs gb N96028, gb F14286, gb T20680, gb F14443, gb AA657300 and gb N65244
-3.04	0,01373827	248676_at	At5g48850	ATSD11 (SULPHUR DEFICIENCY-INDUCED 1); binding
-3.05	0,00001614	250539_at	At5g08560	WD-repeat protein-like ; supported by cDNA: gi_15450909_gb_AY054535.1
-3.05	0,00260385	259410_at	At1g13340	hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-3.05	0,00092604	262310_at	At1g70840	MLP31 (MLP-LIKE PROTEIN 31)
-3.08	0,00010397	245136_at	At2g45210	putative auxin-regulated protein
-3.11	0,000695	251066_at	At5f01880	putative protein RING-H2 finger protein RHA3a - Arabidopsis thaliana, EMBL:AF078824
-3.11	0,00018188	266321_at	At2g46660	CYP78A6; electron carrier/ heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding
-3.12	0,00005749	262609_at	At1g13930	unknown protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:1505.
-3.12	0,03382708	263492_at	At2g42560	putative seed maturation protein
-3.13	0,00220015	266265_at	At2g29340	putative tropinone reductase ; supported by cDNA: gi_14334839_gb_AY035093.1
-3.14	0,00531029	263433_at	At2g22240	MIPS2 (MYO-INOSITOL-1-PHOSPHATE SYNTHASE 2); binding / catalytic/ inositol-3-phosphate synthase
-3.15	0,00011452	262281_at	At1g68570	peptide transporter, putative similar to PEPTIDE TRANSPORTER PTR2-B GB:P46032 from [Arabidopsis thaliana]
-3.18	0,00359227	248332_at	At5g52640	ATHSP90.1 (HEAT SHOCK PROTEIN 90.1); ATP binding / unfolded protein binding
-3.2	0,00040018	267041_at	At2g34315	unknown protein
-3.21	0,00489626	262656_at	At1g14200	unknown protein location of EST TAT5A03; 5 end, gb Z26679
-3.23	0,00158568	248188_at	At5g54070	AT-HSFA9; DNA binding / transcription factor
-3.28	0,00170313	245243_at	At1g44414	hypothetical protein predicted by genemark.hmm
-3.28	0,00288493	249752_at	At5g24660	LSU2 (RESPONSE TO LOW SULFUR 2)
-3.34	0,00056654	265425_at	At2g20770	GCL2 (GCR2-LIKE 2); catalytic
-3.35	0,00007857	258263_at	At3g15780	unknown protein
-3.37	0,00037237	246944_at	At5g25450	ubiquinol--cytochrome-c reductase-like protein ubiquinol--cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2)
-3.42	0,00019285	263296_at	At2g38800	unknown protein
-3.44	0,00226632	254691_at	At4g17840	hypothetical protein ; supported by full-length cDNA: Ceres: 38412.
-3.47	0,01094126	256186_at	At1g51680	4CL1 (4-COUMARATE:COA LIGASE 1); 4-coumarate-CoA ligase
-3.55	0,0000307	250793_at	At5g05600	leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:13012.
-3.58	0,00362131	261838_at	At1g16030	Hsp70b (heat shock protein 70B); ATP binding
-3.63	0,0284125	254059_at	At4g25200	ATHSP23.6-MITO (MITOCHONDRION-LOCALIZED SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 23.6)
-3.7	0,00005341	265567_at	At2g05580	unknown protein predicted by genefinder
-3.8	0,00035448	252320_at	At3g48580	endoxylglucan transferase-like protein EXGT1 (endoxylglucan transferase) - Pisum sativum, EMBL:AB015428
-3.84	0,00007612	262858_at	At1g14940	major latex protein type3 identical to major latex protein type3 GB:CAA63027 GI:1107495 [Arabidopsis thaliana]
-3.85	0,01171668	263374_at	At2g20560	putative heat shock protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:25528.
-3.86	0,00002865	250028_at	At5g18130	putative protein similar to unknown protein (gb AAF00631.1); supported by full-length cDNA: Ceres:10299.
-4.11	0,00302921	245501_at	At4g15620	hypothetical protein
-4.11	0,00000601	261007_at	At1g26400	hypothetical protein similar to reticuline oxidase-like protein GB:CAB45849 GI:5262223 from [Arabidopsis thaliana]
-4.23	0,01005935	262911_s_at	At1g59860	heat shock protein, putative similar to heat shock protein GI:19617 from [Medicago sativa]
-4.34	0,0041677	260978_at	At1g53540	17.6 kDa heat shock protein (AA 1-156) identical to GI:4376161 from [Arabidopsis thaliana]
-4.36	0,00052001	248242_at	At4g36600	putative protein
-4.55	0,00034058	250296_at	At5g12020	HSP17.6II (17.6 KDA CLASS II HEAT SHOCK PROTEIN)
-4.56	0,00025979	262431_at	At1g47540	trypsin inhibitor 2, putative similar to trypsin inhibitor 2 GI:4902896 from [Sinapis alba]
-4.6	0,00252842	252563_at	At3g45970	ATEXLA1 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE A1)
-4.69	0,00039774	262099_s_at	At1g59500	GH3.4; indole-3-acetic acid amido synthetase
-4.81	0,0018882	260248_at	At1g74310	ATHSP101 (ARABIDOPSIS THALIANA HEAT SHOCK PROTEIN 101); ATP binding / ATPase
-5.07	0,0009408	266590_at	At2g46240	BAG6 (BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 6); calmodulin binding / protein binding
-5.55	0,0007804	263150_at	At1g54050	heat-shock protein, putative similar to heat-shock protein GI:472939 from [Helianthus annuus]
-6.27	0,00214596	262148_at	At1g52560	chloroplast-localized small heat shock protein
-6.58	0,00000173	246238_at	At4g36670	sugar transporter like protein
-6.78	0,0009338	255811_at	At4g10250	ATHSP22.0
-6.78	0,0000339	261755_at	At1g08170	histone H2B, putative similar to GB:AA15915 from [Chaetopterus variopedatus] (J. Mol. Evol. 46 (1), 64-73 (1998))
-6.89	0,00201162	266294_at	At2g29500	putative small heat shock protein ; supported by full-length cDNA: Ceres:25828.
-7.49	0,0001905	265817_at	At2g18050	HIS1-3 (HISTONE H1-3); DNA binding / nucleosomal DNA binding