



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

Influencia del nitrato, ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en la transición dormición-germinación de semillas de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. sometidas a “*post-maduración*”

TESIS DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

Néstor Carrillo Barral

Licenciado en Biología

2016



La Dra. Raquel Iglesias Fernández y la Dra. M^a del Carmen Rodríguez Gacio, como Directoras de la Tesis de Doctorado titulada:

«Influencia del nitrato, ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en la transición dormición-germinación de semillas de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. sometidas a “*post-maduración*”»

Presentada por D. Néstor Carrillo Barral

Alumno del Programa de Doctorado en Ingeniería Biotecnológica

Autorizan la presentación de la tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado, y que como Directoras de la misma no incurre en las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

LAS DIRECTORAS

Dra. Raquel Iglesias Fernández

Dra. M^a del Carmen Rodríguez Gacio

EL DOCTORANDO

Néstor Carrillo Barral



La Dra. Raquel Iglesias Fernández y la Dra. M^a del Carmen Rodríguez Gacio, como Directoras de la tesis titulada: «Influencia del nitrato, ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA) en la transición dormición germinación de semillas de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. sometidas a “*post-maduración*”».

Por la presente DECLARO:

Que la tesis presentada por D. Néstor Carrillo Barral es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando ha tenido participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Santiago de Compostela, a de de 2016

Dra. Raquel Iglesias Fernández

Dra. M^a del Carmen Rodríguez Gacio





RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, en el marco de un proyecto dirigido por el Prof. Ángel Jesús Matilla Carro, catedrático de Fisiología Vegetal, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación titulado “La eliminación de la dormición mediante after-ripening: efecto del nitrato y el ABA sobre el cross-talk etileno/GA y la expresión de genes DELLA (CGL2009-11425)”, y ha sido dirigido por la Dra. Raquel Iglesias Fernández y la Dra. M^a del Carmen Rodríguez Gacio.

El autor, Néstor Carrillo Barral, ha sido beneficiario de un contrato predoctoral de la Xunta de Galicia (PRE/2012/323; diciembre 2012 – noviembre 2015).

En primer lugar me gustaría agradecer sinceramente al Prof. Ángel Jesús Matilla Carro el haberme acogido en su grupo de investigación para la realización de una Colaboración, un Proyecto Fin de Máster y, finalmente, la Tesis Doctoral que ve la luz en esta memoria. Su amor y dedicación por el trabajo han supuesto un referente para mí desde el primer día, y su respaldo ha sido fundamental para llegar al momento en el que ahora me encuentro.

Quisiera agradecer también el trabajo de dirección realizado por las Doctoras M^a del Carmen Rodríguez Gacio y Raquel Iglesias Fernández, así como la formación que me han dado en las diferentes técnicas experimentales y su ayuda en la redacción de esta memoria. Su paciencia y dedicación son uno de los ingredientes principales de este trabajo.

Por último, quisiera mostrar mi agradecimiento a la Prof.^a Pilar Carbonero Zalduegui, catedrática de la Universidad Politécnica de Madrid. El tiempo que he pasado en su laboratorio en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, su amplia experiencia en la Biotecnología de las semillas, y en la investigación en general, han sido de inestimable ayuda.



AGRADECIMIENTOS

Cuando miro hacia atrás en el tiempo puedo ver que el camino que me ha conducido hasta este momento no comienza con mi matrícula en la etapa de Tesis, ni con los primeros días de trabajo en el laboratorio, sino que se extiende mucho más atrás y abarca gran parte de mi vida. A lo largo de este trayecto son numerosas las personas que me han ayudado de una u otra manera, pero solamente dos lo han hecho todos y cada uno de los días. Muchas gracias a mi padre y a mi madre.

Me gustaría mostrar también mi sincera gratitud a varias personas que se lo han ganado con creces:

A Ángel, Victoria, Manuel, M^a Ángeles, M^a del Carmen, Teresa y a todas las personas que han pasado por el Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Farmacia, por haber puesto color a mi día a día. Gracias a Begoña, por esa extraña cualidad de ser como es, y a Yolanda, por haber sido una gran amiga en las duras y en las maduras.

A Elena, Vicky, Fátima, Nuria, María y Patri, por haber mantenido viva la lumbre del hogar, esa que le permite a uno recobrar fuerzas para afrontar un nuevo día.

A toda la gente del CBGP que me acogió con calidez cuando me encontraba lejos de mi tierra, y especialmente a Raquel, cuya sincera preocupación por mí fue más allá de sus funciones.

A Rosa, por entenderme mejor de lo que yo mismo me entiendo.

A mi hermana, que es y siempre será la mujer de mi vida.

A Tañia, que ha luchado mis batallas, sufrido mis derrotas y disfrutado mis victorias. Solo aspiro a lograr darte tanto como he recibido.



Como resultado del trabajo desarrollado durante esta Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos en revistas del SCI:

- **Carrillo-Barral, N.**, Matilla, A.J., Iglesias-Fernández, R. y Rodríguez-Gacio, M. (2013) Nitrate-induced early transcriptional changes during imbibition in non-after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds. *Physiologia Plantarum* 148: 560-573.
- **Carrillo-Barral, N.**, Matilla, A.J., del Carmen Rodríguez-Gacio, M. e Iglesias-Fernández, R. (2014) Nitrate affects *sensu-stricto* germination of after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds by modifying expression of *SoNCED5*, *SoCYP707A2* and *SoGA3ox2* genes. *Plant Science* 217: 99-108.
- **Carrillo-Barral, N.**, Matilla, A.J., García-Ramas, C. y Rodríguez-Gacio, M.C. (2015) ABA-stimulated *SoDOG1* expression is after-ripening inhibited during early imbibition of germinating *Sisymbrium officinale* seeds. *Physiologia Plantarum* 155: 457-471.

Durante el período de realización de esta Tesis, y en relación con los temas tratados en la misma, se ha publicado también la siguiente revisión:

- Matilla, A.J., **Carrillo-Barral, N.** y Rodríguez-Gacio, M.C. (2015) An update on the role of *NCED* and *CYP707A* ABA metabolism genes in seed dormancy induction and the response to after-ripening and nitrate. *Journal of Plant Growth Regulation* 34: 274-293.

Como fruto de una colaboración, durante una estancia en el laboratorio de la Prof. Pilar Carbonero Zalduegui, en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas de la Universidad Politécnica de Madrid, se ha publicado el siguiente artículo:

- Iglesias-Fernández, R., Barrero-Sicilia, C., **Carrillo-Barral, N.**, Oñate-Sánchez, L. y Carbonero, P. (2013) *Arabidopsis thaliana* bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene *AtMAN7*. *The Plant Journal* 74: 767-780.



RESUMEN	<i>i</i>
ABREVIATURAS	<i>iii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA SEMILLA	3
1.1.1. La estructura de la semilla	3
1.2. DESARROLLO DE LA SEMILLA: EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA Y MADURACIÓN	5
1.2.1. Embriogénesis zigótica	6
1.2.2. Maduración de la semilla	8
1.2.2.1. Regulación transcripcional de la maduración	10
1.3. DORMICIÓN	11
1.3.1. Regulación hormonal de la dormición	12
1.3.1.1. ABA y dormición	13
1.3.1.2. Otras hormonas implicadas en la dormición	15
1.3.2. Regulación ambiental y genética de la dormición	16
1.4. AFTER-RIPENING (AR; POST-MADURACIÓN)	20
1.4.1. Regulación hormonal del AR	21
1.4.2. Regulación ambiental y genética del AR	22
1.4.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y AR	23
1.5. GERMINACIÓN	24
1.5.1. Regulación hormonal de la germinación	28
1.5.1.1. Giberelinas (GAs) y germinación	28
1.5.1.2. Otras hormonas implicadas en la germinación	30
1.5.2. Nitrato (NO ₃ ⁻) y germinación	32
1.5.3. Regulación ambiental y genética de la germinación	33
1.6. <i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop	35
ANEXO I: “An update on the role of NCED and CYP707A ABA metabolism genes in seed dormancy induction and the response to after-ripening and nitrate”	39
2. OBJETIVOS	61
3. CAPÍTULO 1: “Nitrate-induced early transcriptional changes during imbibition in non-after-ripened <i>Sisymbrium officinale</i> seeds”	65
4. CAPÍTULO 2: “Nitrate affects sensu-stricto germination of after-ripened <i>Sisymbrium officinale</i> seeds by modifying expression of <i>SoNCED5</i>, <i>SoCYP707A2</i> and <i>SoGA3ox2</i> genes”	81
5. CAPÍTULO 3: “ABA-stimulated <i>SoDOG1</i> expression is after-ripening inhibited during early imbibition of germinating <i>Sisymbrium officinale</i> seeds”	97
6. DISCUSIÓN GENERAL	117
7. CONCLUSIONES	129
8. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	133



RESUMEN

La semilla es el *propágulo* utilizado por las plantas Espermatófitas para perpetuarse, y constituye un hito trascendental en la historia evolutiva de las especies vegetales. Su éxito evolutivo radica en la adquisición de la tolerancia a la desecación y la existencia de un período de inactividad metabólica inducida en la fase final de su desarrollo (denominada dormición primaria) que le permite asegurar la dispersión y la supervivencia de la descendencia durante largos períodos de tiempo. La regulación hormonal de la dormición y la germinación está determinada principalmente por la relación ABA/GAs. Mientras que las GAs promueven la germinación, el ABA actúa como hormona clave en el establecimiento y mantenimiento de la dormición. *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., la especie utilizada en este estudio, es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Brassicaceae. La dormición primaria en *S. officinale* es intensa y para provocar su pérdida se precisa un almacenamiento a baja humedad relativa y temperaturas medio-altas; proceso conocido como “after-ripening” (AR) o post-maduración. La germinación de sus semillas es dependiente de nitrato (NO_3^-), dependencia que es aminorada por el AR. En esta Memoria se describe, desde una perspectiva integradora, la influencia del AR, NO_3^- , GAs y ABA en la capacidad germinativa de la semillas de *S. officinale*. Se demuestra por primera vez que el NO_3^- estimula la expresión de *SoGA3ox2* (biosíntesis de GAs) y *SoCYP707A2* (catabolismo de ABA) durante la imbibición de las semillas no durmientes, mientras que altera negativamente la expresión de *SoRGL2* (regulador negativo de la señalización de GAs). Durante la imbibición de semillas durmientes (AR0), el NO_3^- disminuye la expresión de *SoNCED6,9* (biosíntesis de ABA), *SoRGL2* y *SoABI5* (señalización de ABA) y aumenta la de *SoCYP707A2*. La expresión de *SoDOGI* (gen relacionado con la respuesta a ABA) durante la imbibición disminuye durante el transcurso de la germinación respecto a semilla seca; hecho que ocurre en todos los regímenes de AR estudiados (AR7 y AR20). La presencia de NO_3^- en el medio de imbibición reduce la expresión de *SoDOGI* en las semillas más durmientes. La adición exógena de ABA y NO_3^- estimula la transcripción de *SoDOGI* durante las 6 primeras horas de imbibición en semillas AR0. Todo ello indica que las semillas AR7 son más sensibles a la influencia del NO_3^- que las semillas AR0 y que esta diferencia radica principalmente en la capacidad de síntesis de GAs bioactivas y no tanto en el metabolismo del ABA o en la señalización de ambas hormonas.



ABREVIATURAS

8'-OH-ABA	ABA 8'-hidroxilasa
α -XIL	α -xilosidasas
β -CYC	Licopeno β -ciclaza
AAO	<u>ABA Aldehido Oxidasa</u>
ABA	Ácido abscísico
ABA-GE	Glucosil éster de ABA
ABC	<u>ATP Binding Cassette</u>
ABI	<u>ABA INSENSITIVE</u>
ACO	<u>ACC Oxidasa</u>
AIP2	<u>ABI3 INTERACTING PROTEIN 2</u>
ale	aleurona
AMP1	<u>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1</u>
AR	<u>After-Ripening</u>
AREB3	<u>Absciscic acid Responsive Element Binding Protein 3</u>
BR	Brasinoesteroides
C	Cotiledones
CDS	Secuencia codificante
CK	Citoquininas
Col	Columbia
Cvi	<u>Cape verde islands</u>
CWMEs	Enzimas hidrolíticas o modificadoras de la pared celular
CYP707A	Citocromo P450 monooxigenasa (ABA 8'-hidroxilasa)
CZ	Zona chalazal
CZE	Endospermo chalazal
DAG	<u>DOF AFFECTING GERMINATION</u>
DAP	Días tras la polinización
DEP	DESPIERTO
DMAPP	Dimetilallil difofato
DOF	<u>DNA binding with One zinc Finger</u>

DOG1	<u>Delay Of Germination 1</u>
DPA	Ácido dihidrofaseico
DZ	Diniconazole
e	Embrión
Ed	Epidermis
ET	Etileno
EXPA	α -expansina
EXPs	Expansinas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTs	<u>Factores Transcripcionales</u>
FUS3	FUSCA3
GA2ox	GA2-oxidasa
GA3ox	GA3-oxidasa
GA20ox	GA20-oxidasa
GAI	<u>Gibberellic Acid Insensitive</u>
GAs	Giberelinas
GGPP	Geranil-geranil difosfato
GID1	<u>GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1</u>
Gm	Meristemo inferior
HR	<u>Humedad Relativa</u>
Hs	Hipófisis
HSP	<u>Heat Shock Proteins</u>
IDPs	Proteínas intrínsecamente desordenadas
IEF	Isoelectroenfoque
IPP	Isopentenil difosfato
JA	Ácido jasmónico
KO	<u>Knock Out</u>
LEA	<u>Late Embryogenesis Abundant</u>
LEC	<u>LEAFY COTYLEDON</u>
Ler	Landsberg erecta

MANs	Endo-β-mananasas
me	Embrión maduro
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MCE	Endospermo micropilar
MVA	Mevalonato
NCED	9'- <i>Cis</i> -Epoxicarotenoide Dioxigenasa
ND	<u>N</u> o <u>D</u> urmiente
NERP	<u>N</u> - <u>E</u> nd <u>R</u> ule <u>P</u> athway
NiR	<u>N</u> itrito <u>R</u> eductasa
NIS	Señal de importación al núcleo
NLS	Señal de localización al núcleo
NO	Óxido nítrico
NO ₃ ⁻	Nitrato
NR	<u>N</u> itrato <u>R</u> eductasa
P	Parénquima de reserva
PAC	Proantocianidinas
PA	Ácido faseico
PB	Paclobutrazol
PBZ	Paclobutrazol
PC	Pared Celular
Pc	Procambium
PCD	Muerte celular programada
PD	Dormición fisiológica
Pd	Prodermis
PDS	Fitoeno desaturasa
PEN	Endospermo periférico
PHS	<u>P</u> re- <u>H</u> arvest <u>S</u> prouting
Phy	Fitocromo
PIF	<u>P</u> HYTOCROME <u>I</u> NTERACTING <u>F</u> ACTOR
PIL5	<u>P</u> HYTOCROME <u>I</u> NTERACTING <u>F</u> ACTOR3- <u>L</u> IKE5
PIPs	Proteínas intrínsecas de la membrana plasmática
PLA3/GO	PLASTOCHRON3/GOLIATH

PP2C	Proteín-fosfatasa tipo 2C
PSY	Fitoeno sintasa
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RACE	Amplificación rápida de los extremos del cDNA
RE	Rotura del endospermo
RGA	Repressor of <u>GA</u>
RGL	<u>RGA Like</u>
RM	Meristemo apical de la raiz
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	PCR semicuantitativa en tiempo real
S	Suspensor
SDR	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
SM	Meristemo apical del brote
SNF1	<u>Sucrose-Nonfermenting kinase 1</u>
SnRK2	Proteín-quinasa tipo SNF1
SPT	SPATULA
TIPs	Proteínas intrínsecas del tonoplasto
V	Tejido vascular
VP8	VIVIPAROUS8
XTH	Xiloglucano-endotransglicosilasa/hidrolasa
Y2H	<u>Yeast two Hybrid</u>
ZEP	<u>Zeaxantina Epoxidasa</u>



1. INTRODUCCIÓN



1.1. LA SEMILLA

La semilla es el *propágulo* utilizado por las plantas Espermatófitas para perpetuarse, y constituye un hito trascendental en la historia evolutiva de las especies vegetales. Su éxito evolutivo radica en la adquisición de la tolerancia a la desecación y de un período de inactividad metabólica como fase final de su desarrollo. Esta ventaja adaptativa denominada **dormición** es un hecho relativamente reciente en la escala evolutiva (Willis *et al.*, 2014), y le permite asegurar la dispersión y la supervivencia de la descendencia durante largos períodos de tiempo (Linkies *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011). De los dos grandes grupos de Espermatófitas, Gimnospermas y **Angiospermas**, éstas últimas son las que han logrado una mayor diversidad y expansión de sus semillas, lo cual está asociado a la rápida diversificación de las Angiospermas durante el Cretácico y su prevalencia posterior (Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005; Linkies *et al.*, 2010, Weitbrecht *et al.*, 2011).

Las semillas desempeñan un papel fundamental en la agricultura ya que una rápida y uniforme germinación garantiza la óptima productividad de las cosechas. Además, las semillas son una fuente primaria de alimento, especialmente las de cereales y leguminosas (Finch-Savage y Bassel, 2015). Según datos de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura; <http://www.fao.org>), las semillas de tan solo cinco cereales (arroz, trigo, maíz, mijo y sorgo) constituyen el 60% del aporte calórico de la población mundial, hecho que demuestra la importancia socio-económica de este recurso natural. Existen numerosos productos alimentarios derivados de las semillas, como las harinas, los aceites vegetales, el café, la cerveza o el chocolate. Además, los aceites vegetales, obtenidos a partir del procesamiento de diversas semillas oleaginosas, son utilizados en la fabricación de multitud de productos como jabones, lubricantes, tintas, plásticos y como base para perfumes (Walker, 2004).

1.1.1. La estructura de la semilla

La semilla está formada por un embrión diploide y por tejidos de origen embrionario (endospermo triploide) y materno (cubierta seminal o testa, nucela, etc.). El **embrión** maduro está formado comúnmente por el eje embrionario (radícula e hipocótilo) y el/los cotiledón/es (morfológicamente similares a las hojas). El eje embrionario presenta una polaridad apical-

INTRODUCCIÓN

basal: en el extremo apical (plúmula) se encuentra el meristemo caulinar y en el extremo basal (radícula) el meristemo primario de la raíz (De Smet *et al.*, 2010; Fig. 1a-d).

Se diferencian dos tipos de Angiospermas en función del número de cotiledones: Dicotiledóneas (ej. Brasicáceas, Solanáceas, etc.) y Monocotiledóneas (ej. Gramíneas). Las semillas de Dicotiledóneas contienen dos cotiledones (Fig. 1b, c) que suelen actuar como tejidos de reserva de nutrientes. Durante la embriogénesis y la maduración de estas semillas, los nutrientes almacenados en el endospermo son movilizados a los cotiledones y este tejido es parcial o totalmente reabsorbido por el embrión. En algunas especies, como las Brasicáceas *Sisymbrium officinale* y *Arabidopsis thaliana*, el endospermo no es completamente reabsorbido por el embrión en formación, sino que es reducido a una monocapa celular externa denominada **capa de aleurona** (Ingram, 2010; Sun *et al.*, 2010). Las semillas de Monocotiledóneas presentan un único cotiledón, modificado en dos estructuras diferentes: el escutelo y el coleóptilo (Fig. 1d). La función principal del escutelo es movilizar y absorber las sustancias de reserva almacenadas en el **endospermo** (tejido triploide de origen embrionario; semillas endospermicas; Yu *et al.*, 2015). El coleóptilo cumple una función protectora de la plúmula. Además, la raíz también está cubierta por una estructura de origen embrionario en forma de vaina, denominada coleorriza (Xi y Zheng, 2011).

La **testa** o **cubierta seminal** es la envoltura más externa de la semilla y tiene un origen materno ya que se desarrolla a partir de los tegumentos del óvulo (Linkies *et al.*, 2010). Las capas celulares que conforman la cubierta seminal sufren un proceso de “muerte celular programada” durante la maduración, siendo por tanto un tejido inerte en la semilla madura.

Clásicamente, se ha considerado a la testa como un tejido protector del embrión frente a alteraciones mecánicas y químicas y también se ha relacionado con distintas estrategias de dispersión de la semilla. Actualmente, se ha enfatizado en la importancia de este tejido como mediador de señales medioambientales, controlando procesos tan importantes como la dormición y germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Huang *et al.*, 2008).

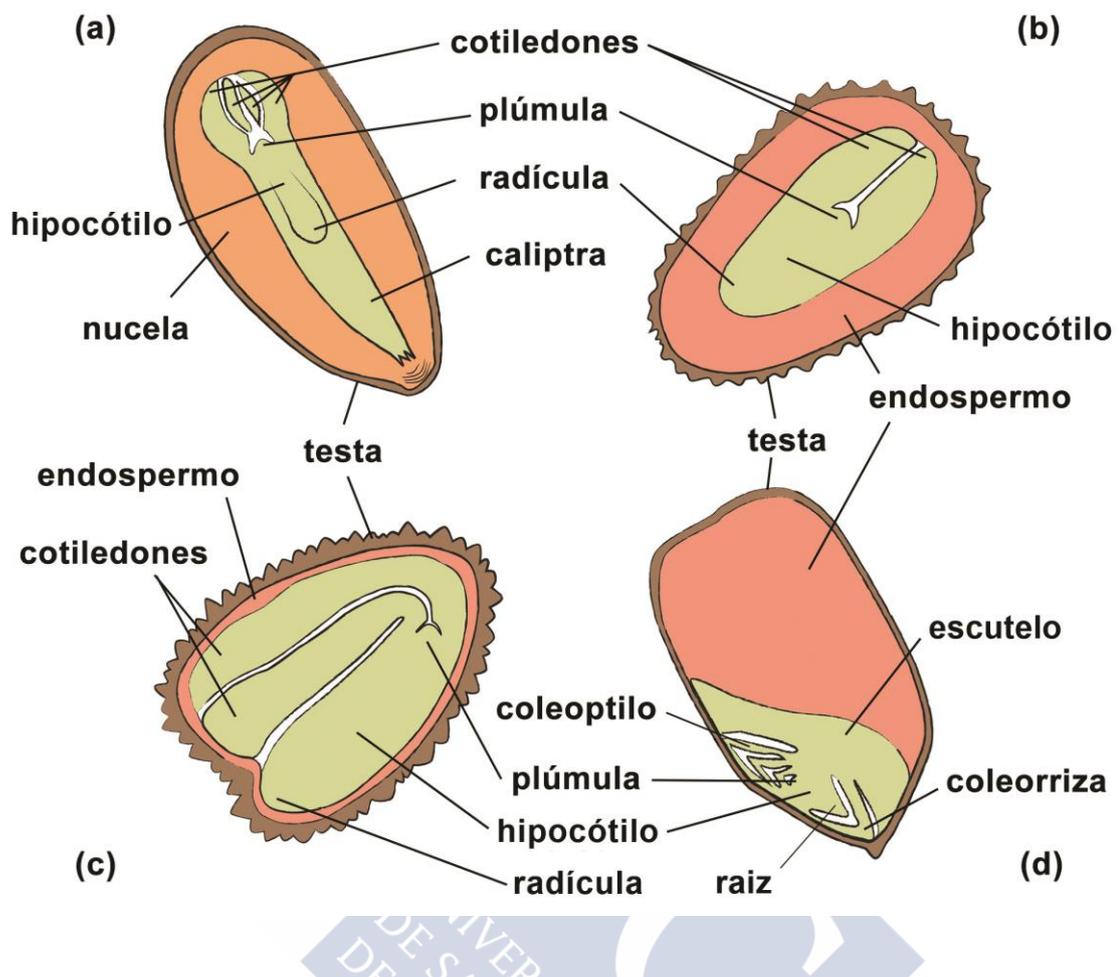


Figura 1: Estructura de la semilla madura en diferentes especies. (a) *Pinus sp.*, Gimnosperma. (b) *Nicotiana benthamiana*, Angiosperma dicotiledónea con abundante endospermo. (c) *Sisymbrium officinale*, Angiosperma dicotiledónea con endospermo monoestratificado. (d) *Zea mays*, Angiosperma monocotiledónea. Elaboración propia.

1.2. DESARROLLO DE LA SEMILLA: EMBRIOGÉNESIS ZIGÓTICA Y MADURACIÓN

El desarrollo de la semilla se divide en dos grandes fases: la **embriogénesis zigótica**, en la que se produce la formación del embrión, y la **maduración**, en la cual la semilla almacena sustancias de reserva y finalmente adquiere un estado de quiescencia (De Smet *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

1.2.1. Embriogénesis zigótica

La embriogénesis zigótica comprende todos los cambios que se producen desde la formación del cigoto hasta la maduración del embrión (Matilla, 2008) y comienza con la fusión de los gametos femenino y masculino. El gameto femenino (ovocélula) está dentro del óvulo (primordio seminal), que está constituido por la nucela (correspondiente al megasporangio femenino) rodeada de una capa (Gimnospermas) o dos capas (Angiospermas) de tejido materno denominadas integumentos (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Linkies *et al.*, 2010). Durante la polinización, el tubo polínico entra en contacto con el óvulo y se produce la fecundación. En Angiospermas tiene lugar el característico proceso de la doble fecundación, en el que una célula espermática se une a la ovocélula para formar el cigoto ($2n$), y otra célula espermática se une a la célula central binucleada para formar el endospermo triploide (Dumas y Rogowsky, 2008). Los tejidos maternos, como la nucela y el pericarpo, son sometidos a “muerte celular programada” y degeneran. Esta circunstancia permite la redistribución de los componentes celulares hacia los tejidos filiales (endospermo y embrión; Domínguez y Cejudo, 2014).

Durante la embriogénesis temprana se produce una gran actividad mitótica en el embrión y se establecen los ejes basal-apical, radial y la simetría bilateral. En esta fase tiene lugar el proceso de histodiferenciación y se establecen también el conjunto de células que formarán los meristemos apicales. Todos estos elementos son fundamentales ya que se mantienen a lo largo de toda la vida de la planta (Matilla, 2008; De Smet *et al.*, 2010). A pesar de que hay una gran actividad mitótica en la fase inicial embriogénica, no ocurre un gran incremento en el tamaño del embrión. Sin embargo, el endospermo crece mucho más rápido debido a un aumento del volumen celular y a múltiples divisiones nucleares sin citocinesis. Este hecho da lugar a un característico endospermo en estado cenocítico (Fig. 2a). Esta forma de crecimiento del endospermo no ocurre en todas las semillas; pero es con diferencia la más común en Angiospermas. En definitiva, gran parte del crecimiento en volumen de la semilla se debe inicialmente al endospermo (Friedman y Ryderson, 2009; Ingram, 2010).

Durante esta primera fase del desarrollo embrionario, son de vital importancia los gradientes de auxina, ya que regulan el establecimiento de la polaridad del embrión, así como la posterior distribución de las diferentes partes del mismo (Zhao, 2012). Las citoquininas tienen también un papel muy destacado y asociado a la gran actividad mitótica que se produce

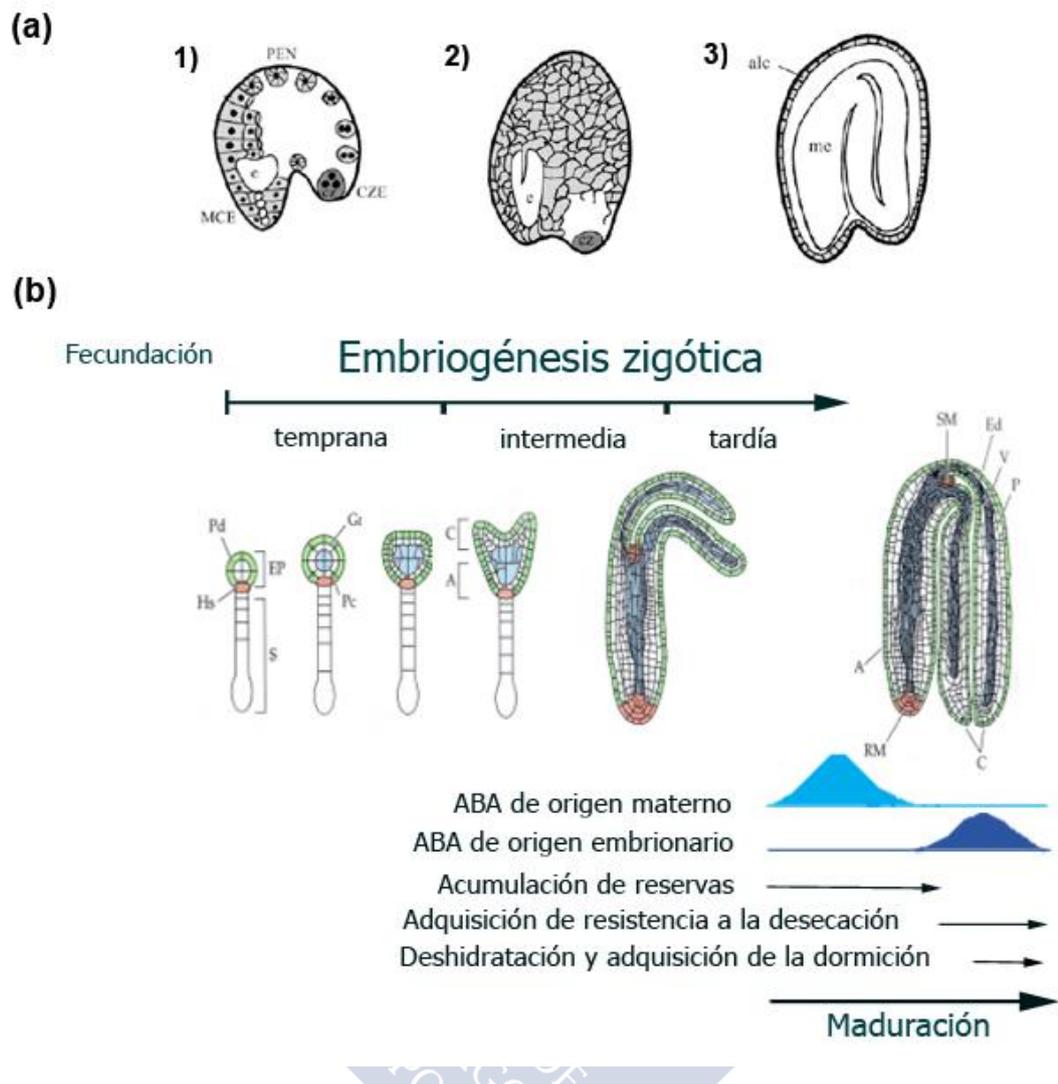


Figura 2: (a) Fases del desarrollo de la semilla de *A. thaliana*. 1) Celularización de endospermo: CZ, zona chalazal; CZE, endospermo chalazal; e, embrión; MCE, endospermo micropilar; PEN, endospermo periférico. 2) Endospermo celularizado. 3) Endospermo residual: ale, aleurona; me, embrión maduro. Adaptado de Olsen (2004). (b) Distintas fases del desarrollo del embrión de *Arabidopsis thaliana*, de izquierda a derecha: preglobular, globular, bastón, corazón, torpedo y embrión maduro. En el estado pre-globular, la célula apical se divide para formar el embrión propiamente dicho (EP), mientras que la basal da lugar al suspensor (S). Durante la embriogénesis, la protodermis (Pd) origina la epidermis (Ed), el meristemo inferior (Gm) da lugar al parénquima de reserva (P), el procambium (Pc) al tejido vascular (V), y la hipófisis (Hs) a los meristemos apicales de la raíz (RM) y del brote (SM). C, cotiledones. En la parte inferior se indican los eventos más importantes que ocurren durante la maduración de la semilla. Adaptado de Bewley *et al.* (2000).

en el embrión (Müller y Sheen, 2008; Murai, 2014). Aunque las auxinas y las citoquininas son las hormonas más importantes durante la embriogénesis temprana, no se puede descartar la participación de otras hormonas. Un ejemplo es el caso del ácido abscísico (ABA) que en

INTRODUCCIÓN

A. thaliana se produce en la planta madre y es transportado a la semilla en formación para evitar el aborto del embrión. No obstante, esto no se ha podido demostrar en leguminosas (Matilla, 2008). Posteriormente, disminuyen las divisiones nucleares en el endospermo, se produce la celularización y se reduce el aumento de volumen en la semilla (Sundaresan, 2005). Al mismo tiempo, se reducen las divisiones celulares en el embrión y el crecimiento es debido exclusivamente a la expansión de las células previamente formadas. A medida que crece el embrión, el endospermo se va degradando para dejar espacio y aportar nutrientes al embrión (Fig. 2a). En esta fase, las citoquininas pierden su importancia, siendo las auxinas y las giberelinas (GAs) las hormonas principales (Matilla, 2008).

Durante el desarrollo del embrión, en muchos casos, la zona micropilar se celulariza completamente mientras que la chalazal permanece multinucleada y participa en la acumulación de nutrientes. Durante la germinación de semillas de *Lepidum sativum*, el análisis del transcriptoma entre estos extremos del endospermo señala importantes diferencias entre ellos a medida que crece el embrión y el endospermo es reabsorbido (Linkies *et al.*, 2009). En la mayoría de Angiospermas, permanece una(s) capa(s) de endospermo que actúa(n) como barrera para el crecimiento de la radícula en la zona micropilar, participando así en el control de la germinación. Al mismo tiempo, los integumentos del óvulo se modifican para dar lugar a la testa de la semilla, cuya principal función es la protección del embrión frente a alteraciones tanto mecánicas como químicas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006).

1.2.2. Maduración de la semilla

La maduración de la semilla comienza durante la embriogénesis tardía, una vez ha finalizado el proceso de morfogénesis del embrión. A lo largo de esta fase cesa el crecimiento, se produce la síntesis y almacenamiento de sustancias de reserva y, en la mayoría de las plantas, la semilla adquiere resistencia a la desecación y se induce la dormición. En las etapas anteriores del desarrollo, los tejidos maternos son los que regulan los diferentes procesos embriogénicos. Sin embargo, este papel es transferido a los tejidos de origen zigótico durante la maduración (Holdsworth *et al.*, 2008a).

La maduración puede entenderse como una “fase intrusiva” en la que se detiene el ciclo vital de la planta y la semilla entra en un estado de quiescencia fuertemente regulado por factores ambientales. La maduración no es por tanto un proceso obligatorio en el desarrollo de la planta. Así, los embriones extraídos de la semilla antes del proceso de maduración pueden desarrollarse normalmente y generar una nueva plántula (Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005). Durante la maduración temprana e intermedia se acumulan gran cantidad de compuestos de reserva, que son esenciales para la germinación y el establecimiento de la nueva plántula. Los compuestos de reserva pueden ser carbohidratos, lípidos o proteínas que son fundamentales como fuente de energía, de esqueletos carbonados y de aminoácidos durante la germinación (Baud *et al.*, 2002; Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005). Los distintos compuestos de reserva de las semillas varían de unas especies a otras. Además de las proteínas, en las semillas de cereales (ej. maíz, trigo o cebada) abundan los carbohidratos (almidón, almacenado principalmente en el endospermo), y en las oleaginosas (girasol o colza) las sustancias de reserva mayoritarias son lípidos (almacenadas en los cotiledones; Matilla, 2008). También es importante el almacenamiento de sustancias inorgánicas importantes para el correcto funcionamiento metabólico de la semilla durante la germinación (Lanquar *et al.*, 2005). Durante la maduración tardía se produce la síntesis de proteínas Late Embryogenesis Abundant (LEA) y Heat Shock Proteins (HSP), asociadas a la adquisición de tolerancia a la desecación. Aunque estas proteínas fueron descritas originalmente en semillas, se han encontrado también en varios órganos vegetativos de la planta (así como en cianobacterias y algunos invertebrados), y están asociadas a la resistencia o tolerancia frente a distintos tipos de estrés abiótico que implican la deshidratación de las células del organismo (Hand *et al.*, 2011). Las proteínas LEA de plantas se han clasificado en varios grupos. La predicción de su estructura ha determinado que la mayoría son proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) en estado hidratado, que adquieren una estructura más ordenada cuando se encuentran en un estado de parcial o total deshidratación. Aunque se han descrito numerosas funciones posibles para las proteínas LEA, parecen ser críticas para la protección de enzimas, evitando la formación de agregados y con ello la pérdida de su función catalítica, y por otra parte la estabilización de las diferentes membranas de la célula durante la deshidratación. El proceso de maduración finaliza con la adquisición de la dormición (Holdsworth *et al.*, 2008a; Hinch y Thalhammer, 2012).

INTRODUCCIÓN

1.2.2.1. Regulación transcripcional de la maduración

Si durante la embriogénesis son las auxinas y las citoquininas las que tienen un papel principal, el ABA es la hormona clave durante la maduración (Slater *et al.*, 2013). Durante la maduración temprana e intermedia se produce un incremento notable en los niveles de ABA libre de origen materno, que es fundamental para el correcto desarrollo de la semilla y para evitar la germinación prematura (viviparismo; Frey *et al.*, 2004; Gubler *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2015a). Durante la maduración tardía se reducen los niveles de ABA materno, el cual pasa a ser de origen zigótico (Fig. 2b; Gutierrez *et al.*, 2007; Slater *et al.*, 2013).

Se han identificado numerosos Factores Transcripcionales (FTs) asociados específicamente con la maduración (Brandon *et al.*, 2010). En *Arabidopsis* se han descrito cuatro FTs maestros implicados en la maduración y el establecimiento de la dormición: FUSCA 3 (FUS3), ABA INSENSITIVE 3 (ABI3), LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) y LEC2 (Raz *et al.*, 2001). FUS3, ABI3 y LEC2 pertenecen a la familia B3 de FTs, unas proteínas específicas de plantas cuyo dominio de unión a DNA reconoce el elemento en *cis*- RY (RY: 5'-CATGCAT-3') en los promotores de los genes que regula. Sin embargo, LEC1 reconoce el elemento en *cis*- 5'-CCAAT-3' (Giraudat *et al.*, 1992; Lotan *et al.*, 1998; Luerssen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001). Aunque los mutantes *lec1*, *lec2*, *fus3* y *abi3* comparten varias características fenotípicas, cada uno de ellos presenta también rasgos propios. Por una parte, los cuatro muestran una reducción en la dormición y en la expresión de proteínas de reserva (Raz *et al.*, 2001; Gutierrez *et al.*, 2007). Pero también presentan fenotipos específicos como la ausencia de degradación de clorofila en la semilla seca (*abi3*), reducción de la sensibilidad al ABA (*abi3* y *lec1*), acumulación de antocianinas (*fus3*, *lec1* y *lec2*), defectos en la diferenciación del cotiledón (*lec1*, *lec2* y *fus3*) o en la sensibilidad a la deshidratación (*abi3*, *fus3* y *lec1*). FUS3, ABI3, LEC1 y LEC2 funcionan como una red reguladora en la que cada miembro tiene funciones concretas, pero al mismo tiempo son capaces de afectar a los demás miembros de la red (Holdsworth *et al.*, 2008a).

Se han descrito varios elementos reguladores en *cis*-, que interaccionando con sus respectivos FTs, participan en la expresión de genes que codifican proteínas de reserva. Entre los mejor caracterizados se encuentran la caja 5'-ACGT-3', el motivo 5'-AACA-3' y el elemento 5'-CATGCA-3', que son reconocidos por FTs de las familias bZIP, MYB y B3 respectivamente (Ezcurra *et al.*, 1999; Vicente-Carbajosa y Carbonero, 2005). El motivo

5'-ACGT-3' es reconocido por FTs tipo bZIP, como AtbZIP10 y AtbZIP25, que activan transcripcionalmente la expresión genes que codifican proteínas de reserva en semillas de *Arabidopsis* y cuya actividad se ve potenciada por su interacción con ABI3 (Lara *et al.*, 2003). Además el FT de la familia bZIP ABI5, no sólo reconoce el motivo en *cis*- descrito, sino que además interactúa físicamente con ABI3 de forma sinérgica en la regulación de la expresión génica durante la maduración y la germinación de la semilla (Nakamura *et al.*, 2001; Nakabayashi *et al.*, 2005; Gazzarrini y Tsai, 2015).

1.3. DORMICIÓN

A lo largo de su historia evolutiva, las plantas han desarrollado mecanismos para adaptarse a las condiciones y variaciones de su entorno, entre ellas los cambios debidos a los ciclos estacionales. Para la mayoría de las plantas, la época del año en la que se produce la dispersión de las semillas no es la óptima para el establecimiento de la siguiente generación ya que, aunque se diesen las condiciones necesarias para la germinación, las plántulas resultantes no sobrevivirían. La dormición es un estado fisiológico de la semilla que impide su germinación inmediata en condiciones favorables (Weitbrecht *et al.*, 2011).

La dormición puede definirse, por tanto, como la incapacidad temporal de una semilla viable e intacta para completar la germinación cuando se encuentra en condiciones favorables. No obstante, a pesar de la simplicidad conceptual, la dormición es un proceso realmente complejo y fuertemente regulado por factores tanto internos como externos (Hilhorst *et al.*, 2007; Bentsink y Koornneef, 2008). Para entender mejor el proceso de dormición y la transición dormición-germinación no se puede considerar la dormición como un simple bloqueo de la germinación, sino más bien como un estado fisiológico-molecular de la semilla que determina cuales son las condiciones necesarias para que ésta pueda germinar. De esta manera, a medida que se reduce el nivel de dormición, el rango de condiciones ambientales favorables para la germinación se hace cada vez más amplio (Fenner y Thompson, 2005; Graeber *et al.*, 2012).

Existen diferentes tipos de dormición, clasificadas por Baskin y Baskin (2004) en cinco grandes grupos: fisiológica (PD), morfológica, morfofisiológica, física y combinatoria. De todas ellas, la PD es la más extendida y la mejor estudiada. La PD puede dividirse en dos

INTRODUCCIÓN

tipos: no profunda (**dormición primaria**) y profunda (**dormición secundaria**). La PD profunda no puede eliminarse mediante el tratamiento con GAs, y cuando el embrión se separa de la semilla no es capaz de generar plántulas normales. Estas semillas requieren varios meses de estratificación en frío antes de poder germinar. La PD no profunda es reversible por un tratamiento con GAs y en algunas semillas también puede eliminarse mediante estratificación o almacenamiento en seco (post-maduración o *After-Ripening*, AR). En este tipo de PD, cuando el embrión es separado del resto de la semilla es capaz de generar plántulas viables. La PD no profunda está determinada por factores fisiológicos del embrión y/o de los tejidos que lo rodean (Baskin y Baskin, 2004; Zhou *et al.*, 2015).

La **dormición primaria** se establece durante la maduración de la semilla. Si la dormición es demasiado leve la semilla puede germinar antes del momento propicio, causando la muerte de la plántula. Una dormición demasiado profunda provoca un retraso de la germinación, de forma que la planta resultante no aprovechará completamente la estación del crecimiento. En el caso de una dormición excepcionalmente profunda, la semilla puede incluso llegar a perder viabilidad (Fenner y Thompson, 2005; Donohue *et al.*, 2010). Una vez se ha superada la dormición primaria, si no se dan las condiciones necesarias para la germinación, la semilla puede entrar en un estado de **dormición secundaria**. En la naturaleza la dormición secundaria permite a la semilla sobrevivir hasta que las condiciones ambientales sean de nuevo propicias (Finch-Savage y Leubner- Metzger, 2006; Footitt *et al.*, 2011). De este modo, las semillas pueden permanecer largo tiempo en el suelo (“banco de semillas”) disminuyendo y aumentando su estatus de dormición para adaptarse a las condiciones ambientales y germinar en el momento más propicio (Cadman *et al.*, 2006).

1.3.1. Regulación hormonal de la dormición

La regulación hormonal de la dormición y la germinación está determinada principalmente por la relación ABA/GAs (Nambara *et al.*, 2010). Mientras que las GAs promueven la germinación, el ABA actúa como hormona clave en el establecimiento y mantenimiento de la dormición (Finkelstein *et al.*, 2008; Finkelstein, 2013).

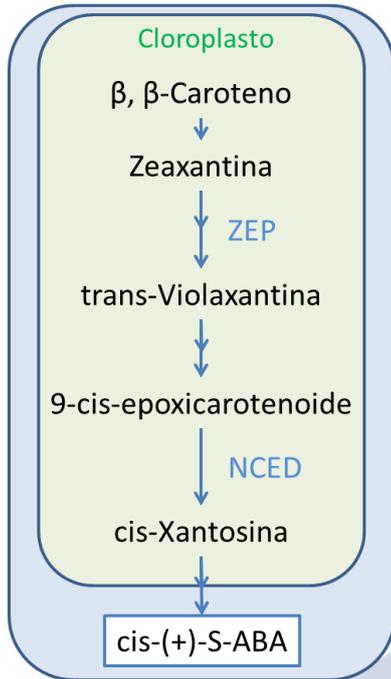
1.3.1.1. ABA y dormición

El contenido de ABA de la semilla está determinado por su biosíntesis y su catabolismo (Fig. 3a). Químicamente, el ABA es un isoprenoide que contiene 15 átomos de carbono y que no deriva directamente de un sesquiterpeno (C15), sino de la modificación y escisión de la zeaxantina, un caroteno de 40 carbonos. La zeaxantina es convertida a trans-violaxantina mediante la Zeaxantina Epoxidasa (ZEP), y ésta a un 9'-*cis*-epoxicarotenoide que puede ser 9'-*cis*-neoxantina o 9'-*cis*-violaxantina. El siguiente paso de la ruta lo lleva a cabo la 9'-Cis-Epoxicarotenoide Dioxigenasa (NCED), que cataliza la escisión del 9'-*cis*-epoxicarotenoide (C40) en *cis*-xantosina (C15) y un subproducto de 25 carbonos. Mediante la acción de una deshidrogenasa y una oxidasa, la *cis*-xantosina es transformada en *cis*(+)-S-ABA, la forma bioactiva de la hormona (Fig. 3a; Nambara y Marion-Poll, 2005). La reacción catalizada por NCED es el principal paso limitante en la ruta biosintética de ABA, por lo que esta actividad enzimática tiene un papel clave en del contenido de ABA presente en un momento y tejido concreto de la planta (Matilla *et al.*, 2015).

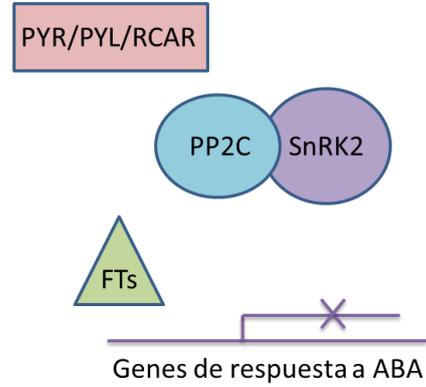
En *Arabidopsis*, la familia NCED está formada por nueve miembros, de los cuales solamente cinco (AtNCED2, 3, 5, 6 y 9) participan en la biosíntesis de ABA. Los cinco miembros de la familia muestran distintos patrones y lugares de expresión en la planta, así como diferentes funciones en el desarrollo y en las respuestas a factores externos. Tres de estos genes *AtNCED6*, *9* y en menor medida *AtNCED5*, se expresan en la semilla durante el desarrollo y son importantes para el establecimiento y mantenimiento de la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2012). Los mutantes *Knock Out* (KO) de los genes *AtNCED6*, *9* y en menor medida *AtNCED5*, así como los del gen *ABAI* que codifica el enzima ZEP, muestran alteraciones fenotípicas derivadas de la disminución de los niveles de ABA tanto en la dormición como en la germinación (Barrero *et al.*, 2005, 2008).

El catabolismo de ABA comienza con una hidroxilación de *cis*(+)-S-ABA en las posiciones C-7', C-8' o C-9', siendo la de C-8' la vía predominante catabolizada por la ABA 8'-hidroxilasa (8'-OH-ABA), una citocromo P450, enzima codificada por cuatro

(a) Anabolismo de ABA



(c) Señalización de ABA



(b) Catabolismo de ABA

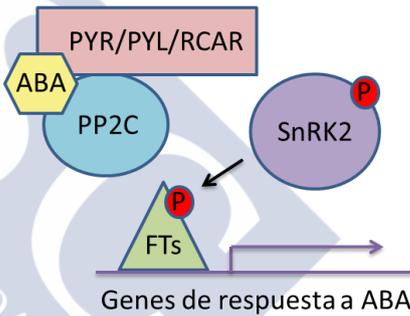
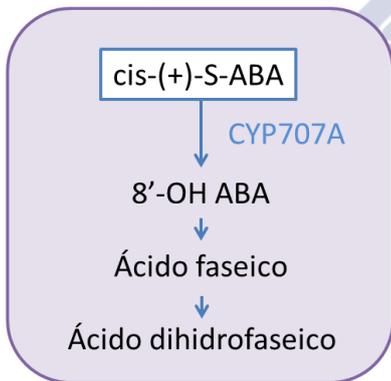


Figura 3: (a): Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de ABA; NCED, *9-Cis-Epoxicarotenoide Oxidasa*; ZEP, *Zeaxantina Epoxidasa*. (b) Ruta de degradación de ABA; CYP707A, *ABA 8'-hidroxilasa*. (c): Ruta de señalización de ABA, incluyendo los receptores PYR/PYL/RCAR, las proteín-fosfatasas PP2C, las quinasas SnRK2, *SNF1-Related protein Kinase 2*, y factores de transcripción regulados por ABA. Elaboración propia.

miembros de la familia génica *CYP707A* en *Arabidopsis* (Fig 3b). Aunque el 8'-OH-ABA retiene cierta actividad, esta molécula se transforma rápidamente a ácido faseico y ácido dihidrofaseico, que son formas inactivas de ABA (Nambara y Marion-Poll, 2005). Los cuatro

miembros de la familia CYP707A en *Arabidopsis*, al igual que ocurre con la familia NCED, se expresan diferencialmente en las plantas y participan en diferentes procesos (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009). CYP707A1 es la principal proteína implicada en el catabolismo de ABA durante la maduración de las semillas, mientras que CYP707A2 asume este papel en la fase final de la maduración y durante la germinación (Okamoto *et al.*, 2006).

Aunque se conoce muy poco acerca de los mecanismos de transporte de ABA entre diferentes células, se ha observado que durante la imbibición de semillas durmientes, el endospermo produce y libera ABA hacia el embrión impidiendo así la germinación (Lee *et al.*, 2010). Se han descrito recientemente cuatro transportadores tipo ATP Binding Cassette (ABC) implicados en la movilización de ABA en las células del endospermo del embrión. Dos de ellos actúan exportando ABA desde el endospermo (AtABC-G25 y AtABC-G31) y otros dos importándolo a las células del endospermo (AtABC-G30 y AtABC-G40; Kang *et al.*, 2015).

La acción de cualquier fitohormona está determinada no solo por sus niveles bioactivos, sino también por su ruta de señalización celular. La señalización del ABA en la célula comienza por un grupo de proteínas de la familia PYR/PYL/RCAR que actúan como receptores (Fig. 3c). El complejo hormona-receptor se une a un grupo de proteín-fosfatasa tipo 2C (PP2C), reguladoras negativas de la respuesta a ABA, y las inactiva. En ausencia de ABA, PP2C inactiva a SnRK2s, un grupo de proteín-quinasa tipo Sucrose-Nonfermenting kinase 1 (SNF1) que actúan como efectores positivos de la respuesta a ABA. La inactivación de PP2C por el complejo hormona-receptor permite la activación de SnRK2s, que actúan desencadenando numerosas respuestas asociadas a ABA (Hauster *et al.*, 2011; Hubbard *et al.*, 2011). Entre las principales dianas de SnRK2s se encuentra un grupo de FT tipo bZIP que incluye a ABI5 y Abscisic acid Responsive Elements Binding protein 3 (AREB3). Estos factores se unen a los elementos ABRE (5'-ACGTGTC-3') presentes en los promotores de genes regulados por ABA (Raghavendra *et al.*, 2010; Graeber *et al.*, 2012).

1.3.1.2. Otras hormonas implicadas en la dormición

Aunque el ABA es la hormona más importante en el establecimiento y mantenimiento de la dormición de las semillas (Finkelstein, 2013), no es la única implicada. La importancia

INTRODUCCIÓN

de las GAs es innegable ya que la transición dormición-germinación radica en una relación ABA/GAs. No obstante, las GAs actúan principalmente como promotores de la germinación, por lo que se hablará detalladamente de su papel más adelante.

Se ha observado que la sobreacumulación de auxinas en la semilla aumenta los niveles de dormición, mientras que la sobreexpresión de genes implicados en su catabolismo provoca una inducción de la germinación. El ABA inhibe la elongación del embrión durante la germinación, en parte mediante la inducción de la señalización de auxinas (Belin *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). La reducción de la dormición mediada por AR está asociada a una disminución de la sensibilidad a auxinas y estas hormonas podrían afectar a la señalización de ABA durante la regulación de la dormición y la germinación (Liu X *et al.*, 2013).

El ácido jasmónico aplicado exógenamente retrasa la germinación, pero por el momento su papel en la germinación es poco claro (Shu *et al.*, 2015b).

La influencia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre las principales hormonas implicadas en la transición dormición-germinación (ABA/ GAs) se ha estudiado en algunas especies. En cebada, la interacción de ROS con las enzimas del metabolismo y señalización de ABA y GAs controlan el nivel de dormición de las semillas (Bahin *et al.*, 2011). En *Arabidopsis*, la adición exógena de H₂O₂ incrementa la expresión de genes implicados en el catabolismo de ABA y en la biosíntesis de GAs, aunque dicha influencia parece ser dependiente de óxido nítrico (NO; Liu *et al.*, 2010).

1.3.2. Regulación ambiental y genética de la dormición

En muchas especies la dormición de la semilla puede eliminarse mediante un almacenamiento a bajas temperaturas y alta humedad relativa (estratificación en frío), o baja humedad y temperaturas medio-altas (AR). Aunque la temperatura parece ser el factor ambiental más importante en la regulación de la dormición, se ha demostrado que otros factores como la luz o el nitrato pueden tener un papel relevante (Fig. 4; Finch-Savage y Leubner- Metzger, 2006). Al mismo tiempo que la exposición a determinadas temperaturas altera el nivel de dormición de la semilla, el nitrato determina el rango de temperatura que resulta favorable para la germinación. Cuando la temperatura no se encuentra dentro del rango

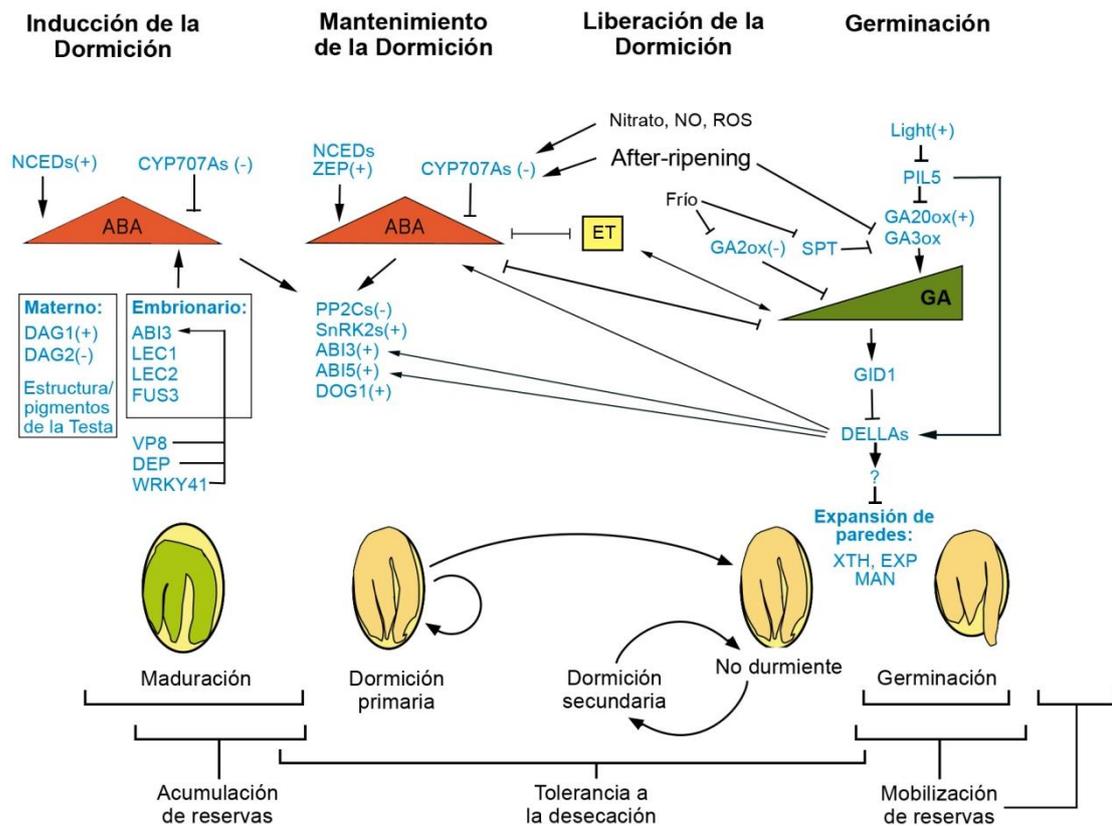


Figura 4: Representación esquemática de los procesos moleculares que regulan la inducción, mantenimiento y liberación de la dormición. Los símbolos (+) ó (-) indican un efecto regulador positivo o negativo, respectivamente. En la inducción de la dormición participan factores de origen materno y embrionario. Los factores implicados en la liberación de la dormición actúan fundamentalmente regulando el balance y la señalización de ABA y GAs. ABI, ABA INSENSITIVE; CYP707As, Citocromo P450; DAG, DOF: DNA binding with One zinc Finger AFFECTING GERMINATION; DEP, DESPIERTO; DOG1, Delay Of Germination 1; ET, etileno; EXP, expansina; FUS3, FUSCA 3; GA2ox, GA2-oxidasa; GA3ox, GA3-oxidasa; GA20ox, GA20-oxidasa; GID1, GIBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1; LEC, LEAFY COTYLEDON; MAN, endo-β-mananasas; NCEDs, 2'-Cis-Epoxicarotenoide Dioxygenasas; NO, óxido nítrico; PIL5, PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5; PP2C, proteína fosfatasa tipo 2C; ROS, especies reactivas de oxígeno; SnRK2, SNF1-Related protein Kinase 2; SPT, SPATULA; XTH, xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa; VP8, VIVIPAROUS8; ZEP, Zeaxantina Epoxidasa. Adaptado de Finkelstein *et al.* (2008).

requerido se produce una terminación de la germinación y la posible entrada en un estado de dormición secundaria. Este proceso está relacionado con un incremento en el contenido de ABA de la semilla, en el que están implicados NCED9 y, en menor medida, NCED5 y NCED2 (Toh *et al.*, 2008).

INTRODUCCIÓN

Las proteínas DELLA, reguladores negativos de la respuesta a GAs, junto con los FTs ABI3 y ABI5, reguladores positivos de la respuesta a ABA, son necesarios para el mantenimiento de la dormición (López-Molina *et al.*, 2001; Penfield *et al.*, 2006a, b; Penfield y King, 2010). Las proteínas DELLA también pueden promover el aumento de los niveles de ABA en semillas (Piskurewicz *et al.*, 2008).

Por otra parte, las semillas con alto grado de pigmentación en sus cubiertas presentan elevados niveles de dormición y alteraciones en su longevidad. La pigmentación de las semillas depende del contenido en proantocianidinas (PAC; compuestos flavonoides), presentes en sus cubiertas seminales o en otras estructuras envolventes (pericarpo, etc.). Durante la maduración de la semilla, las PAC interactúan con distintos elementos de las paredes celulares, provocando un engrosamiento de las distintas capas celulares de la testa, proporcionando así una mayor resistencia mecánica y reduciendo la permeabilidad al agua, a los gases y a las hormonas. Además, la naturaleza antioxidante de las PAC favorece la inhibición de la degradación oxidativa del ABA (Groos *et al.*, 2002; Sweeney *et al.*, 2006; Debeaujon *et al.*, 2000, 2007; Wada *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado, la dormición primaria se establece durante la maduración de la semilla y la mutación de los genes que codifican los FTs ABI3, FUS3, LEC1 y LEC2, provoca graves alteraciones en el grado de dormición de las mismas (Fig. 4). Se han descrito varios factores que regulan la dormición a través de estos cuatro reguladores transcripcionales (Graeber *et al.*, 2012). Uno de los ejemplos mejor estudiados es el gen *VIVIPAROUS8* (*VP8*) de maíz, que codifica el FT *VP8*, y que a su vez regula al gen *ABI3*, cuya mutación causa también viviparismo (Suzuki *et al.*, 2008). Sus FTs ortólogos en arroz (*PLASTOCHRON3/GOLIATH*, *PLA3/GO*) y en *A. thaliana* (*ALTERED MERISTEM PROGRAM1*, *AMP1*) también afectan a la dormición, por lo que dicho mecanismo parece estar conservado a lo largo de la evolución en plantas (Kawakatsu *et al.*, 2009; Griffiths *et al.*, 2011). La expresión de *ABI3* está también regulada por DESPIERTO (DEP), que influye en la señalización de ABA durante el desarrollo. Recientemente se ha descrito que WRKY41 controla directamente la transcripción de *ABI3* durante la maduración y la germinación. Tanto DEP como WRKY41 son reguladores de la dormición y germinación en *Arabidopsis* (Barrero *et al.*, 2010b; Ding *et al.*, 2014).

Los genes *DAG1* y *DAG2* (*DOF*: DNA binding with One zinc Finger AFFECTING GERMINATION) codifican FT parálogos que se expresan en el tejido materno durante el

desarrollo de la semilla y que tienen un efecto opuesto sobre el potencial germinativo de la descendencia (Fig. 4). DAG1 activa la expresión de genes maternos que favorecen la dormición, mientras que DAG2 reprime esta activación mediante su unión al mismo elemento en *cis*-, o interaccionando directamente con DAG1 (Gualberti *et al.*, 2002; Papi *et al.*, 2002).

Mediante el estudio de las variaciones naturales en el grado de dormición en distintos ecotipos de *Arabidopsis* se identificó el gen *Delay Of Germination1* (*DOG1*) como un locus de carácter cuantitativo (QTL: *Quantitative Trait Locus*) asociado con el nivel de dormición de las semillas. El gen *DOG1* se transcribe durante la maduración de la semilla (Bentsink *et al.*, 2006), y disminuye progresivamente hasta la fase de semilla seca desapareciendo finalmente a lo largo de la imbibición (Nakabayashi *et al.*, 2012). Las semillas durmientes contienen una elevada cantidad de la proteína DOG1, que no disminuye después de un tratamiento de AR. Se ha propuesto que el AR podría actuar mediante la inactivación de la proteína DOG1, y no mediante su degradación, basándose en el hecho de que DOG1 cambia su punto isoeléctrico cuando la semilla es sometida a AR (Nakabayashi *et al.*, 2012). Mediante estudios de doble híbrido en levaduras (*Yeast two Hybrid*, Y2H) se han identificado varias proteínas que interaccionan físicamente con DOG1. Una de estas proteínas es PDF1, una proteína-fosfatasa tipo 2A. Los mutantes *pdf1* muestran un incremento de los niveles de dormición, al contrario de lo que ocurre con los mutantes *dog1* (Miatton, 2012). Los autores de dicho estudio han sugerido que DOG1 en su estado activo está fosforilada, siendo desactivada mediante la desfosforilación catalizada por PDF1. Así mismo, se ha descrito que las semillas cuya proteína DOG1 es incapaz de unirse consigo misma presentan un menor nivel de dormición. También se ha propuesto que el AR está asociado con modificaciones de DOG1, las cuales podrían alterar dicha capacidad de la proteína para unirse consigo misma, inhibiendo así su función (Nakabayashi *et al.*, 2015). Por otro lado, la funcionalidad de DOG1 es dependiente de ABA (Bentsink *et al.*, 2006). Por ello, se ha propuesto que DOG1 influye en la dormición al afectar a los niveles de ABA durante el desarrollo de la semilla, siendo residuales los niveles de *DOG1* en semilla seca (Nakabayashi *et al.*, 2012; Vaistij *et al.*, 2013). Recientemente, se han descrito varios mecanismos epigenéticos relacionados con la regulación de la dormición. Entre ellos se incluyen factores relacionados con la metilación del DNA, y la ubiquitinación y deacetilación de histonas (Nonogaki, 2014).

1.4. *AFTER-RIPENING* (AR; POST-MADURACIÓN)

Se conocen diversas formas por las que se pueden reducir el grado de dormición de la semilla. El almacenamiento de las semillas en condiciones de baja humedad y temperaturas medio-altas (AR) provoca una pérdida de dormición lenta y gradual. La capacidad de la semilla para responder a las diferentes condiciones que reducen la dormición varía en función de la especie (Finch-Savage *et al.*, 2007). La necesidad de AR, en semillas cuya dispersión ocurre en primavera-verano, retrasa su germinación hasta otoño; de modo que las plántulas no se ven sometidas a las condiciones de alta temperatura y baja humedad características del verano, como ocurre en *S. officinale* (Iglesias-Fernández y Matilla, 2009; Weitbrecht *et al.*, 2011).

El AR no provoca una pérdida absoluta de la dormición sino que aumenta progresivamente la capacidad de la semilla para responder a condiciones que favorecen la germinación. El tiempo necesario para completar este proceso es muy variable en función de la especie, la profundidad de la dormición de la semilla y las condiciones del almacenamiento (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Iglesias-Fernández *et al.*, 2011a).

Los principales efectos del AR son:

- Aumento del rango de temperatura para germinar (Oracz *et al.*, 2007; Iglesias-Fernández y Matilla, 2009).
- Disminución de los niveles y sensibilidad al ABA (Grappin *et al.*, 2000; Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Cadman *et al.*, 2006).
- Aumento de los niveles y sensibilidad a GAs o disminución de su requerimiento (Cadman *et al.*, 2006).
- Pérdida de requerimientos lumínicos para la germinación en semillas que no germinan en oscuridad, y aumento en la sensibilidad a la luz en semillas que no germinan incluso en su presencia (Battla y Benech-Arnold, 2005).
- Pérdida del requerimiento de nitrato (NO_3^-) en el medio de germinación en semillas de plantas nitrófilas (Alboresi *et al.*, 2005).
- Aumento de la velocidad de germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth *et al.*, 2008a; Iglesias-Fernández y Matilla, 2009).

1.4.1. Regulación hormonal del AR

Aunque se han estudiado en detalle las consecuencias fisiológicas del AR, los mecanismos moleculares que lo gobiernan son todavía muy poco conocidos. En general, el AR está asociado a una disminución en el contenido de ABA, aunque su magnitud varía en función de la especie. En tabaco, *Arabidopsis* y cebada, el AR provoca la disminución en el contenido de ABA en la semilla seca debido al aumento de la expresión de genes implicados en su catabolismo (Fig. 4; *AtCYP707A2* en *Arabidopsis* y *HvABA8'OH-1* en cebada; Millar *et al.*, 2006; Liu A *et al.*, 2013). La pérdida de dormición debida al AR suele asociarse también a un incremento en los niveles de GAs en dicotiledóneas; no obstante, esta relación no parece darse en cereales (Liu A *et al.*, 2013; Hauvermale *et al.*, 2015). En *S. officinale*, se ha descrito que el AR aumenta la expresión de los genes *SoGA3ox2* y *SoGA20ox2*, implicados en la biosíntesis de GAs, durante la imbibición temprana de las semillas (Iglesias-Fernández y Matilla, 2009). Durante el AR, existe una regulación cruzada de los niveles de ABA y GAs. El ABA actúa como represor de genes implicados en la biosíntesis de GAs (Seo *et al.*, 2006), mientras que las GAs reprimen aquellos implicados en la biosíntesis de ABA (Shu *et al.*, 2013).

La sensibilidad de la semilla a ABA y GAs también se altera durante el proceso de AR debido a numerosos factores tales como la luz o la temperatura (Penfield y King, 2010; Hauvermale *et al.*, 2015). La pérdida de dormición está asociada a una disminución de la sensibilidad a ABA en *Arabidopsis*. En esta especie el AR provoca una disminución de la expresión del gen que codifica el receptor de ABA PYR1, así como la de otros genes implicados en la señalización del ABA tales como *SnRK2.1*, *SnRK2.4* y, en menor medida, *ABI3* y *ABI5* (Footitt *et al.*, 2011). En cebada, el AR provoca una disminución en la expresión de *HvAIP2* (*ABI3-INTERACTING PROTEIN 2*), regulador positivo de la respuesta a ABA (Barrero *et al.*, 2009). Resultados similares se han observado en trigo (Liu A *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, el AR incrementa la expresión del gen que codifica el receptor citoplasmático de GAs *GID1* (*GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1*; Hauvermale *et al.*, 2015).

A este puzle se suman varios FTs con dominio AP2 capaces de alterar el metabolismo de ABA y GA (Shu *et al.*, 2015b). Uno de estos factores es *ABI4*, cuyo gen se expresa principalmente durante el desarrollo y germinación de semillas. *ABI4* actúa como regulador positivo de la dormición primaria, provocando un incremento en el contenido de ABA y una

INTRODUCCIÓN

reducción en el de GAs bioactivas, modificando la expresión de los genes implicados en su metabolismo (Shu *et al.*, 2013; Wind *et al.*, 2013). La transcripción de *ABI4* está regulada por SPATULA (SPT), un FT que actúa como regulador negativo de la germinación en respuesta al frío y la luz (Fig. 4; Penfield *et al.*, 2005; Vaistij *et al.*, 2013). Otro FT del tipo AP2, CHOTTO 1, actúa también como regulador positivo de la dormición y lo hace *aguas arriba* en la misma señalización que *ABI4* (Yamagishi *et al.*, 2009; Shu *et al.*, 2015b).

1.4.2. Regulación ambiental y genética del AR

El estatus de AR de las semillas depende principalmente de la temperatura y el contenido de humedad de las mismas, determinado en gran medida por la Humedad Relativa (HR) a la cual son almacenadas. Las condiciones de temperatura y HR durante el proceso de AR determinan de forma conjunta la velocidad a la que se produce la pérdida de dormición (Bazin *et al.*, 2011; Basbouss-Serhal *et al.*, 2015). El AR afecta a semillas viables no imbibidas con un bajo grado de hidratación. Sin embargo, hay un valor mínimo de hidratación por debajo del cual el AR no tiene efecto. Dicho valor se encuentra generalmente entre el 8-15% de agua siendo variable en función de la especie y, en general, es menor en las semillas oleaginosas que en las amiláceas (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011a; Weitbrecht *et al.*, 2011).

Existe debate acerca de la existencia de actividad transcripcional y traduccional en la semilla seca y la importancia que pueda tener en el AR. Debido al bajo contenido hídrico de la semilla seca tanto la transcripción como la traducción no se consideran posibles. Sin embargo, el descubrimiento mediante resonancia magnética nuclear de protón de pequeñas zonas altamente hidratadas en la semilla seca de tabaco sometida a AR, ha puesto de manifiesto la existencia de un espacio físico en donde la traducción y la transcripción podrían tener lugar (Leubner-Metzger, 2005). En *Nicotiana plumbaginifolia* y *Hordeum vulgare* se han observado cambios transcriptómicos en semillas sometidas a AR, siendo mucho mayor el número de transcritos que reducen su abundancia que aquellos que la aumentan (Bove *et al.*, 2005; Leymarie *et al.*, 2007). Leubner-Metzger (2005) demostró la existencia de ciertos niveles de transcripción y traducción del gen que codifica la β -1,3-glucanasa en semillas secas de tabaco sometidas a AR. En semillas de *A. thaliana* ecotipo Cape yerde islands (Cvi) con AR, se observó la reducción de la expresión de 30 transcritos en relación a las semillas

durmientes (Finch-Savage *et al.*, 2007). Las semillas de mutantes deficientes en ABA, y por lo tanto no durmientes, siguen sufriendo cambios a nivel transcriptómico cuando son sometidas a AR de forma similar a las no mutantes. Estos datos sugieren que el AR y la dormición podrían ser procesos relacionados pero genéticamente diferentes (Carrera *et al.*, 2008; Iglesias-Fernández *et al.*, 2011a). Sin embargo, en semilla seca de trigo y girasol no se han observado cambios transcripcionales significativos y asociados específicamente al AR. Recientemente, se han asociado al AR cambios transcripcionales en genes implicados en el metabolismo de ABA, GAs y auxinas durante la imbibición de las semillas de arroz (Du *et al.*, 2015). Se ha sugerido que la reducción de algunos transcritos asociados al AR podría ser debida a procesos no enzimáticos como la oxidación y la degradación mediada por ROS (Meimoun *et al.*, 2014).

A nivel proteómico, durante el AR se produce la acumulación de proteínas de reserva, así como de otras relacionadas con el metabolismo energético. Estas proteínas no parecen estar relacionadas directamente con la pérdida de dormición sino con la actividad metabólica durante la imbibición (Chibani *et al.*, 2006).

1.4.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y AR

La acumulación de ROS en la semilla parece ser un factor importante en la pérdida de la dormición asociada al AR. En semillas de girasol sometidas a AR se produce un incremento de ROS, provocando la carbonilación específica de proteínas y la oxidación de mRNAs (Oracz *et al.*, 2007; Bazin *et al.*, 2011). Dichas modificaciones en las proteínas pueden alterar sus propiedades, cambiar su afinidad por determinados sustratos o acelerar su degradación. En el caso de proteínas de reserva, la carbonilación puede acelerar su movilización al hacerlas más susceptibles a la proteólisis (Job *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, se produce un incremento en los niveles de ROS durante la imbibición de semillas sometidas a AR en comparación con semillas durmientes. No obstante, dicho incremento no se ha podido observar en semilla seca (Leymarie *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, el silenciamiento de *rbohB* y *rbohD*, genes que codifican NADPH oxidasas, ambos implicados en la producción de ROS, da lugar a semillas con alto grado de dormición y baja sensibilidad al AR. Por otro lado, el silenciamiento del gen que codifica la *catalasa2*, implicada en la eliminación de

INTRODUCCIÓN

H₂O₂, produce semillas con un bajo grado de dormición (Müller *et al.*, 2009; Leymarie *et al.*, 2012).

1.5. GERMINACIÓN

El proceso de germinación comienza con la toma de agua por parte de la semilla seca y finaliza con la emergencia de la radícula/raíz a través de los tejidos que la rodean (germinación *sensu stricto*). En algunas semillas, como en *A. thaliana*, *S. officinale* o *L. sativum*, la germinación ocurre en dos pasos: donde la ruptura de la cubierta seminal precede a la emergencia radicular a través del endospermo micropilar (Fig. 6; Müller *et al.*, 2006; Iglesias-Fernández y Matilla, 2010; Iglesias-Fernández *et al.*, 2011b). La germinación constituye un punto crítico en el ciclo vital de una planta, ya que determina el momento y las condiciones en las que se establece la plántula y condiciona su desarrollo. Al mismo tiempo, durante la germinación, la semilla es muy vulnerable, tanto a sufrir daños e infecciones como al estrés ambiental. El control de la velocidad y homogeneidad de la germinación de una población de semillas son importantes características agronómicas determinantes en el rendimiento de las cosechas (Linkies y Leubner-Metzger, 2012; Rajjou *et al.*, 2012).

La imbibición de la semilla se divide comúnmente en tres fases bien diferenciadas (Fig. 5). Aunque muchos de los procesos que ocurren en la semilla no se ciñen a estas tres fases, la toma de agua puede servir como una referencia temporal a la hora de describir el resto de eventos que tienen lugar durante la germinación. Inicialmente se produce una entrada rápida y pasiva de agua (**Fase I**), destinada a la rehidratación de los tejidos de la semilla seca. La **Fase I** ocurre tanto en semillas durmientes como no durmientes ya que es un proceso eminentemente físico debido al bajo potencial hídrico (Ψ) de la semilla seca. Durante esta hidratación inicial tiene lugar una importante pérdida de solutos al medio de imbibición y son significativos los daños sufridos por la semilla durante la deshidratación y posterior rehidratación (Matilla *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2012). La hidratación de la semilla seca no es uniforme sino que progresa de forma diferente según el tejido. Además, existen zonas principales de entrada de agua como la zona micropilar (Manz *et al.*, 2005; Nonogaki *et al.*, 2010). En la **Fase II**, la toma de agua se reduce casi por completo pero existe una gran actividad metabólica. Durante la Fase II, la integración de factores ambientales y el estado

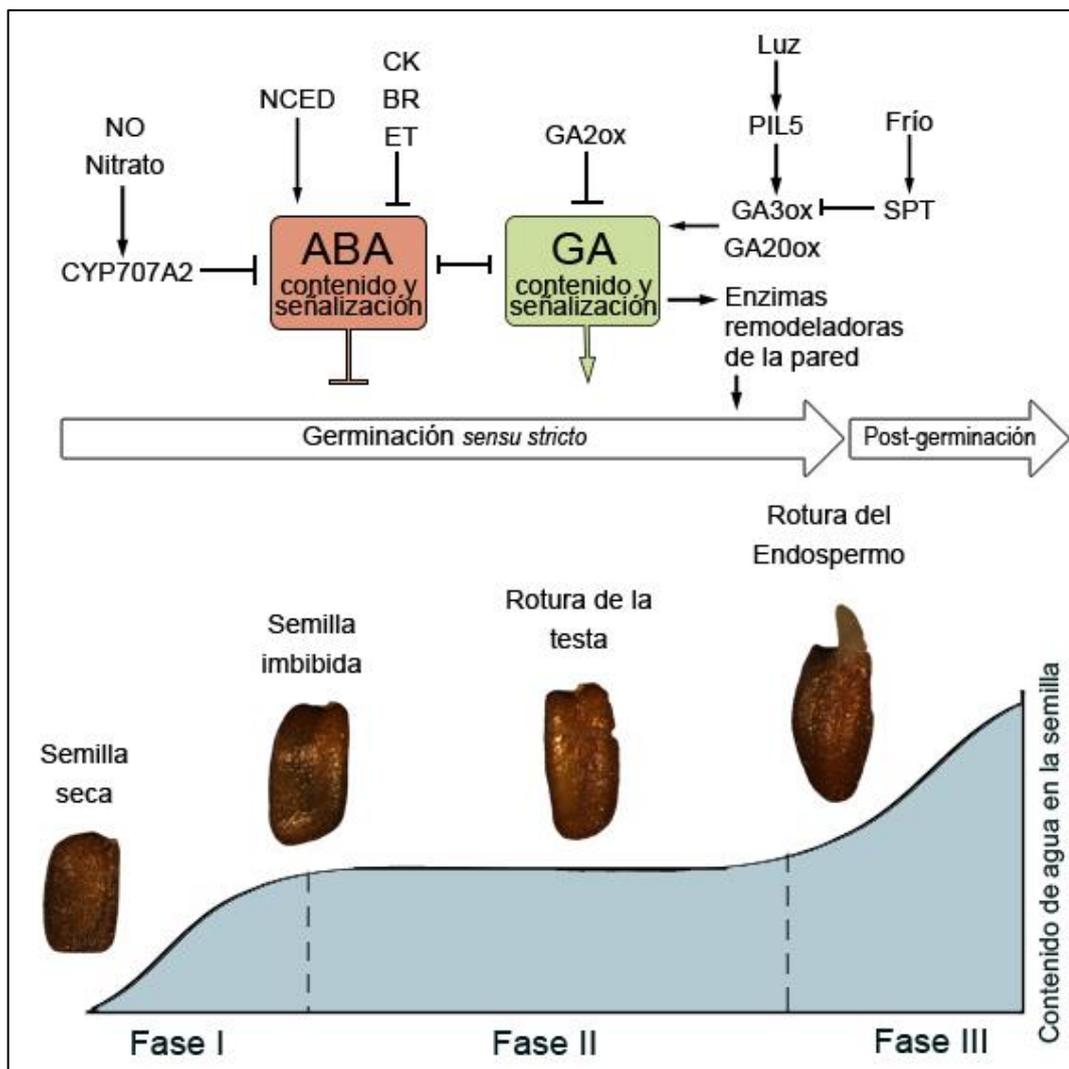


Figura 5: Progresión del proceso de germinación. En la parte superior se indican los factores más importantes en la regulación de la germinación: ABA, ácido abscísico; BR, brasinoesteroides; CK, citoquininas; CYP707A2, citocromo P450; ET, etileno; GA, giberelinas; NCED, 9'-*Cis*-Epoxicarotenoide Dioxigenasa; NO, óxido nítrico; GA2ox, GA2-oxidasa; GA3ox, GA3-oxidasa; GA20ox, GA20-oxidasa; PIL5, PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 3-LIKE 5; SPT, SPATULA. En la parte inferior, representación de la evolución del contenido de agua en la semilla durante la imbibición las semillas de *S. officinale*. Elaboración propia.

fisiológico de la semilla determinan si se va a producir la entrada en la Fase III y la posterior germinación. Cuando las condiciones ambientales son las requeridas para la germinación, la semilla progresa hacia la **Fase III** en la que se reactiva de nuevo la toma de agua y se produce la emergencia del embrión y en ella participan proteínas de canales hídricos (acuaporinas), y las proteínas intrínsecas de la membrana plasmática (PIPs) y del tonoplasto (TIPs; van der Willigen *et al.*, 2006; Nonogaki *et al.*, 2010).

INTRODUCCIÓN

Para que la germinación *sensu stricto* ocurra, la fuerza de empuje del embrión debe superar la resistencia ejercida por los tejidos que lo rodean (ej.: cubierta seminal y endospermo). Los efectos más notables de las cubiertas seminales durante la germinación incluyen el control de la entrada de agua, la resistencia mecánica a la emergencia del embrión y la regulación del intercambio de gases. Recientemente, se ha descrito que el endospermo en dicotiledóneas, o la coleorriza en monocotiledóneas, tiene un papel activo en el control de la germinación (Barrero *et al.*, 2009; Piskurewicz *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2014; González-Calle *et al.*, 2015). La fuerza de empuje del embrión viene determinada por el crecimiento del mismo, el cual no se produce en el ápice radicular sino en la región situada en la zona de transición entre la radícula y el hipocótilo (Sliwinska *et al.*, 2009). La elongación se debe a un proceso de expansión (no mitótico) de las células del eje embrionario (radícula + hipocótilo) que se prolonga hasta que la germinación se ha completado. Recientemente se ha descubierto en *Arabidopsis* que las constricciones mecánicas impuestas por la geometría 3D de las células de la radícula y el hipocotilo determinan los patrones de crecimiento del embrión (Bassel *et al.*, 2014). La expansión celular, y por ende la elongación del eje embrionario, está determinada por la degradación/modificación de las Paredes Celulares (PC), así como por un aumento en la turgencia celular a causa de la entrada de agua.

En las semillas cuya germinación transcurre en dos pasos, la rotura de la testa se produce durante la Fase II, mientras que es en la Fase III cuando ocurre la ruptura del endospermo y la emergencia radicular (Fig. 6) y comienzan las divisiones celulares que darán lugar a la nueva plántula. La fuerza de empuje del embrión provoca la ruptura de la cubierta seminal, por lo que es un proceso eminentemente mecánico (Bentsink y Koornneef, 2008). Sin embargo, la rotura del endospermo micropilar se produce por el debilitamiento de las PC de las células que lo constituyen. La modificación/degradación de las PC de las células en expansión del eje embrionario, así como de las células del endospermo micropilar durante la germinación, está gobernada por numerosas enzimas hidrolíticas o modificadoras de la PC (CWMEs), tales como mananasas (MANs), expansinas (EXPs), xiloglucano-endotransglicosilasas/hidrolasas (XTH), alfa-xilosidasas (α -XIL) y celulasas (Sampedro *et al.*, 2001; Nonogaki *et al.*, 2010; Iglesias-Fernández *et al.*, 2011b, c; Bassel *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2014; González-Calle *et al.*, 2015).

Durante la imbibición ocurren importantes cambios metabólicos en la semilla. En las **Fases I-II** de la imbibición se produce la reparación de los daños producidos en la semilla durante su desecación, almacenamiento y posterior rehidratación. Estas reparaciones incluyen la restauración de la integridad de las membranas y la población mitocondrial, la reparación de los daños oxidativos sufridos por los ácidos nucleicos y las isomerizaciones espontáneas de algunos residuos amino-ácidos de proteínas, tales como los de asparragina (Ogé *et al.*, 2008; Waterworth *et al.*, 2010; Ventura *et al.*, 2012). En estas fases también se restablece el metabolismo energético, cuyo principal factor condicionante es la disponibilidad de oxígeno en la semilla, limitada por las cubiertas seminales y por la abundancia de agua en el medio de imbibición (Benamar *et al.*, 2008). La glucólisis predomina mientras existe una limitación en el oxígeno disponible; sin embargo, la ruta de las pentosas fosfato-ciclo de krebs se hace más importante con la reactivación mitocondrial (Weitbrecht *et al.*, 2011). Las proteínas también pueden actuar como fuente de energía, aunque en general funcionan aportando aminoácidos para la síntesis de nuevas proteínas durante la germinación (Angelovici *et al.*, 2011).

En la semilla seca, se encuentran almacenados gran cantidad de transcritos y proteínas (Fu *et al.*, 2005; Nakabayashi *et al.*, 2005). En experimentos realizados con inhibidores de la transcripción y traducción, se ha podido observar que mientras la traducción es completamente necesaria para la germinación, no ocurre lo mismo con la transcripción. A pesar de ello, existe una elevada actividad transcripcional en semillas durante la germinación que, aunque podría no ser estrictamente necesaria, acelera este proceso considerablemente (Rajjou *et al.*, 2004). Los cambios en el transcriptoma son diferentes en función del tejido de la semilla, y se deben tanto a la formación de nuevos transcritos como a la degradación selectiva de otros (ej.: los relacionados con la señalización del ABA; Bassel *et al.*, 2008; Nonogaki *et al.*, 2010). El proteoma de la semilla varía notablemente durante la imbibición respecto a la semilla seca. Mientras que muchas proteínas abundantes en la semilla seca son degradadas rápidamente, otras poco abundantes como las proteínas ribosómicas, se sintetizan abundantemente durante la germinación, pero sólo en semillas no durmientes (Preston *et al.*, 2009).

INTRODUCCIÓN

1.5.1. Regulación hormonal de la germinación

Al igual que ocurre con la dormición (ap. 1.3), las dos fitohormonas clave en el control de la germinación son el ABA y las GAs y más concretamente la relación GAs/ABA. Dicha relación se incrementa aproximadamente diez veces durante la Fase II de la germinación de *A. thaliana* (Piskurewicz *et al.*, 2008; Nonogaki *et al.*, 2010; Miransari y Smith, 2014). El contenido de ABA en semillas secas es relativamente alto y disminuye rápidamente durante la imbibición, independientemente del grado de dormición de la semilla. En semillas en dormición secundaria (ej.: termoinhibición), los niveles de ABA aumentan durante la imbibición a causa de la síntesis *de novo* de esta hormona. La germinación se ve notablemente inhibida por la presencia de ABA exógeno en el medio de imbibición, por lo que la reducción de los niveles de esta hormona parece ser un prerrequisito importante para la germinación (Nambara *et al.*, 2010). Las GAs contrarrestan el papel inhibitorio del ABA y, aunque se encuentran en niveles fisiológicamente relevantes en la semilla seca sometida a AR (no durmiente), su síntesis se incrementa notablemente durante la imbibición (Fase II; Shu *et al.*, 2015b).

La biosíntesis y señalización de ABA están localizadas en el endospermo de las semillas. Recientemente, se ha descrito el transporte de ABA desde el endospermo al embrión mediado por proteínas tipo ABC (Piskurewicz *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Linkies *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). La biosíntesis de GAs durante la germinación está localizada principalmente en el hipocótilo, la radícula y el endospermo micropilar (Ogawa *et al.*, 2003). De forma general, se considera que las GAs controlan la expansión celular que ocurre en el eje radicular durante la germinación de *Arabidopsis*, controlando la ruptura tanto de la cubierta seminal como la del endospermo micropilar. Además, el ABA dificulta el debilitamiento del endospermo micropilar controlando los procesos moleculares implicados en este debilitamiento (Piskurewicz *et al.*, 2009; Gazzarrini y Tsai, 2015).

1.5.1.1. Giberelinas (GAs) y germinación

Existen más de 130 GAs descubiertas en plantas y hongos pero muy pocas son formas bioactivas, como GA₁, GA₃ o GA₄. El resto son en gran parte intermediarios biosintéticos o

productos del catabolismo de las GAs bioactivas (Sreepriya *et al.*, 2014). Todas las formas bioactivas de GAs son diterpenoides ácidos derivados del ent-kaureno, el cual se sintetiza en proplastidios y es exportado al citoplasma. Mediante la acción de varias citocromo P450 monooxigenasas, el ent-kaureno se transforma en GA₁₂, la primera GA de la ruta. La GA₁₂ sufre diversas oxidaciones por dos rutas paralelas dando lugar a varias GAs intermedias y, finalmente, a las formas bioactivas. En el caso de las GAs activas (GA₁, y GA₄), las reacciones enzimáticas clave de la ruta son catalizadas por GA20-oxidasas (GA20ox) y GA3-oxidasas (GA3ox; Fig. 6). La inactivación de GAs puede producirse mediante una 2β-hidroxiación catalizada por GA2-oxidasas (GA2ox; Yamaguchi, 2008). Tanto la estratificación en frío como la luz roja, ambos factores inductores de la germinación, provocan un aumento en los niveles de GAs bioactivas mediante el incremento en la expresión de los genes que codifican GA3ox y GA20ox (Fig. 5; Kucera *et al.*, 2005). Por el contrario, los genes que codifican GA2ox se expresan en semillas durmientes y son estimulados por factores ambientales inhibidores de la germinación, como la oscuridad o las altas temperaturas (Ogawa *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2004; Sun, 2008; Penfield y King, 2010).

La señalización de las GAs en la célula comienza con el grupo de proteínas GID1 (GA-INSENSITIVE DWARF1), que funcionan como receptores solubles de GAs (Fig. 6; Nakijama *et al.*, 2006). GID1 se une a las formas bioactivas de GAs con una gran afinidad, lo cual provoca un cambio conformacional en la región N-terminal del receptor (Murase *et al.*, 2008). El complejo GA-GID interactúa con las proteínas DELLA, reguladores negativos de la respuesta a GAs, promoviendo su ubiquitinación para ser degradada por el complejo proteosomal 26S. De las cinco proteínas DELLA descritas en *Arabidopsis* (Repressor of GA, RGA; Gibberellic Acid Insensitive, GAI; RGA-like1-3, RGL1-3), RGL2 es la que tiene una mayor influencia como represor de la germinación siendo degradada en presencia de GAs, y estimulando la síntesis de ABA y la actividad de ABI3 y ABI5 (Piskurewicz *et al.*, 2008; Gallego-Bartolomé *et al.*, 2010; Hauvermale *et al.*, 2012; Gazzarrini y Tsai, 2015).

(a) Metabolismo de GA

(b) Señalización de GA

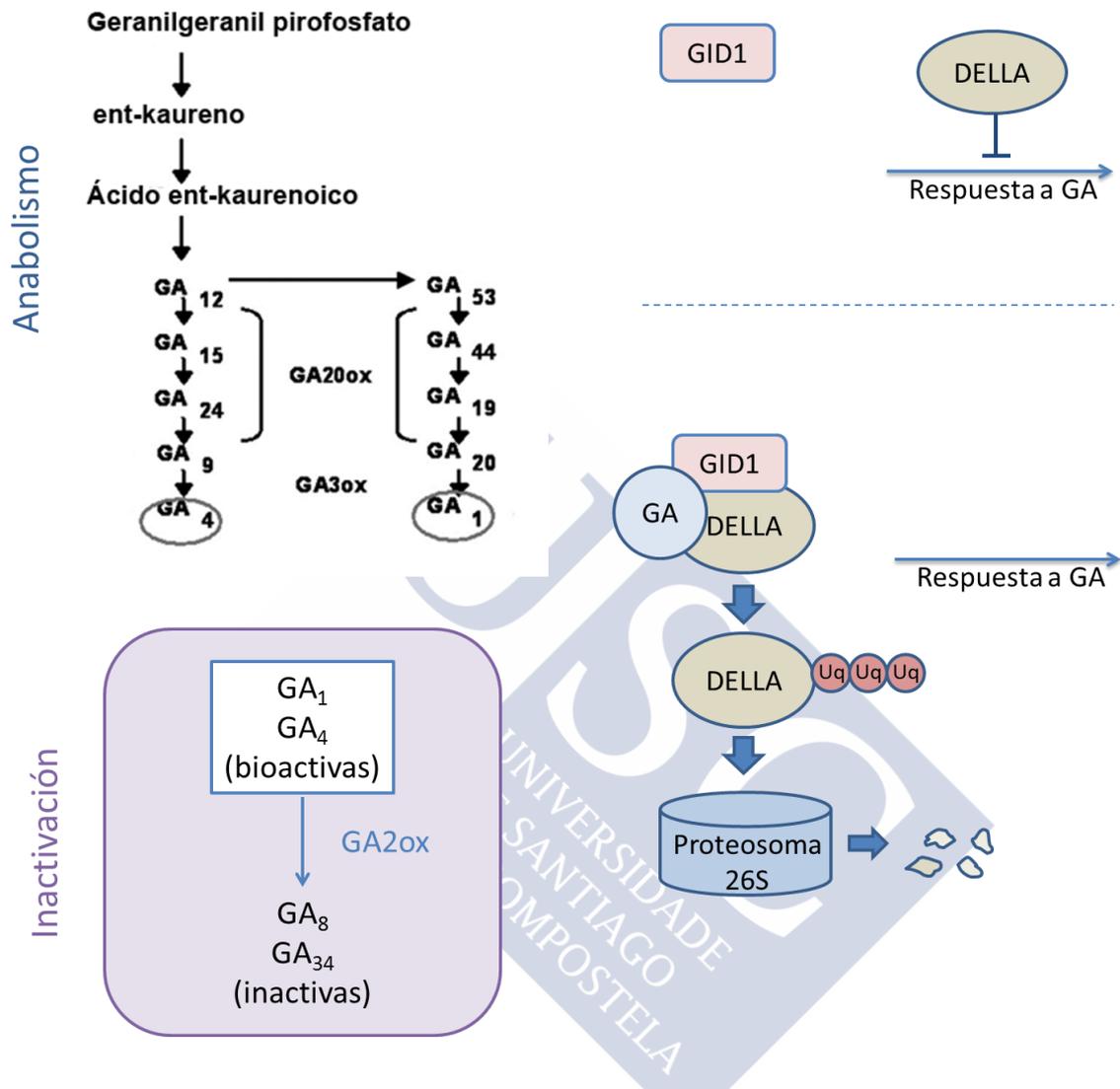


Figura 6: (a): Representación esquemática de las rutas de biosíntesis e inactivación de giberelinas (GAs) bioactivas, incluyendo las enzimas consideradas como las principales reguladoras de estas rutas. GA2ox, GA2-oxidasa; GA3ox, GA3-oxidasa; GA20ox, GA20-oxidasa. Adaptado de Fagoaga *et al.* (2007). (b): Ruta de señalización de GAs. En presencia de la hormona, el receptor GID1, GIBERELLIN-INSENSITIVE DWARF 1, promueve la poliubiquitinación y posterior degradación proteosómica de las proteínas DELLA, reguladoras negativas de la respuesta a GAs. Elaboración propia.

1.5.1.2. Otras hormonas implicadas en la germinación

El **etileno** es una hormona gaseosa. La aplicación exógena de etileno promueve la germinación en diferentes tipos de semillas en dormición primaria y secundaria. Algunos

tratamientos capaces de eliminar la dormición provocan un incremento en la producción de etileno (Gallardo *et al.*, 1991; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008; Corbineau *et al.*, 2015). La concentración de etileno en la semilla aumenta durante el transcurso de la germinación de varias especies, entre ellas el trigo, el maíz, la soja o el arroz (Arc *et al.*, 2013). En especies como *A. thaliana*, *L. sativum*, *S. officinale* o *Brassica rapa* se ha descrito un incremento de la expresión de los genes implicados en la síntesis de etileno durante la germinación (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2004; Linkies *et al.*, 2009; Iglesias-Fernández y Matilla, 2010). Las semillas de mutantes de *Arabidopsis* insensibles a etileno muestran elevados niveles de ABA y germinan más lentamente que el fenotipo silvestre. Dichos mutantes muestran alteraciones en la expresión de genes implicados en las rutas de síntesis y catabolismo de ABA (Fig. 5). En *L. sativum* y *A. thaliana* el etileno promueve el debilitamiento del endospermo micropilar al actuar como regulador negativo de la señalización de ABA (Cheng *et al.*, 2009; Linkies *et al.*, 2009; Arc *et al.*, 2013).

El $\text{NO}\cdot$ es un radical libre inorgánico y gaseoso, que debido a su naturaleza puede difundir a través de las membranas celulares y actuar sobre un amplio rango de dianas; actualmente su estatus como fitohormona está siendo considerado. El principal lugar de síntesis de $\text{NO}\cdot$ parece ser el endospermo ya que el $\text{NO}\cdot$ no tiene efecto sobre el crecimiento de embriones aislados (Bethke *et al.*, 2007a). El $\text{NO}\cdot$ disminuye la sensibilidad a ABA en semillas durmientes y provoca un incremento en la expresión de *CYP707A2* durante la germinación (Fig. 6), lo cual reduce los niveles de ABA activo rompiendo la dormición (Bethke *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2007). Se ha postulado que las modificaciones post-traduccionales de proteínas, tales como la S-nitrosilación de cisteínas y la nitración de tirosinas, son una de las principales dianas del $\text{NO}\cdot$ (Arc *et al.*, 2013). Recientemente, se ha descubierto que la S-nitrosilación de la cisteína-153 de ABI5, mediada por el $\text{NO}\cdot$, provoca su degradación durante la imbibición de las semillas de *Arabidopsis*, reduciendo así la señalización del ABA y facilitando la germinación (Albertos *et al.*, 2015).

Tanto las **citoquininas** como los **brasinoesteroides** actúan favoreciendo la germinación, aunque su efecto es mucho menor que el de las GAs. El mecanismo de acción de ambas hormonas se ha vinculado con la regulación negativa de la señalización del ABA (Xi y Yu, 2010; Wang *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2015b).

1.5.2. Nitrato (NO_3^-) y germinación

El NO_3^- representa una fuente de N muy importante para la planta, pero también actúa como molécula señalizadora en diferentes procesos del desarrollo. En el caso de la transición dormición-germinación, el NO_3^- actúa disminuyendo el nivel de dormición y favoreciendo la germinación (Finch-Savage *et al.*, 2007). La adición de NO_3^- al medio de imbibición incrementa la germinación tanto en *Arabidopsis* como en *S. officinale* (Alboresi *et al.*, 2005; Iglesias-Fernández *et al.*, 2007). Dicho efecto se observa también cuando el NO_3^- es suministrado a la planta madre durante el desarrollo de las flores y frutos (Alboresi *et al.*, 2005). Se ha evaluado si el efecto del NO_3^- sobre la germinación podría ser nutricional; no obstante la adición de otras fuentes de nitrógeno al medio de germinación no genera el mismo efecto. La asimilación de nitrato como nutriente depende de su reducción mediante las actividades Nitrato Reductasa (NR) y Nitrito Reductasa (NiR). En *Arabidopsis* la mutación de *NIA1* y *NIA2*, genes que codifican NRs, reduce la actividad NR en el tallo a un 0,5% y provoca un incremento considerable de los niveles de NO_3^- en la planta. Aunque dichos mutantes tienen un crecimiento más lento, asociado seguramente a la limitación nutricional de N, el nivel de dormición de sus semillas es generalmente menor que el de las no mutantes y responde de forma similar a la presencia de NO_3^- tanto en el medio de imbibición como en la planta madre. Estos datos parecen descartar que los efectos del NO_3^- o de alguno de sus derivados sean meramente nutricionales (Alboresi *et al.*, 2005).

Los mecanismos por los que el NO_3^- altera la transición dormición-germinación son poco conocidos. En estudios transcriptómicos las alteraciones transcripcionales provocadas por elevados niveles de NO_3^- en la planta madre se parecen a las asociadas con la estratificación o el AR, produciéndose una reducción en los niveles de ABA en la semilla, asociado a un aumento de la expresión génica de *CYP707A2* (Fig. 5; Matakiaadis *et al.*, 2009). Otros experimentos sugieren que el NO_3^- podría disminuir también el requerimiento de GAS durante la germinación. Aunque este hecho podría estar también relacionado con la reducción del contenido de ABA en la semilla (Alboresi *et al.*, 2005). En *Arabidopsis* y *S. officinale*, la sensibilidad de las semillas al NO_3^- varía cuando son sometidas a AR (Finch-Savage *et al.*, 2007; Iglesias-Fernández y Matilla, 2009). Estos datos sugieren una interacción molecular entre el AR y el NO_3^- como reguladores de la transición dormición-germinación (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011a)

1.5.3. Regulación ambiental y genética de la germinación

La influencia de la luz en los procesos de dormición y germinación está mediada por la acción de los fitocromos. En semillas embebidas, los fitocromos A y B (PhyA y PhyB) activados por la luz transmiten su señal al núcleo, a través de la desestabilización de PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5), un FT del tipo PIF (subgrupo de la familia bHLH) que actúa como regulador negativo de la germinación. En oscuridad, PIL5 incrementa la expresión de genes implicados en la biosíntesis de ABA y en el catabolismo de GAs, mientras que reduce la de los genes relacionados con el catabolismo de ABA y síntesis de GAs (Gabriele *et al.*, 2005). Además, PIL5 induce la expresión del gen que codifica la proteína DELLA RGL2 en el eje radicular y de genes que codifican FTs que median la señalización de ABA en el endospermo micropilar (ABI3 y ABI5; Piskurewicz *et al.*, 2008, 2009; Oh *et al.*, 2007, 2009). Recientemente, se ha descrito que existe una interacción directa entre PIL5 y el promotor de *SOMNUS*, gen que codifica un FT con dedo de zinc (tipo CCCH) que controla el metabolismo del ABA y GAs (Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2013). PIL5 también se ha relacionado con el control transcripcional de genes implicados en el metabolismo de otras hormonas, como auxinas, brasinoesteroides o jasmonatos, y con la represión de la expresión de genes que codifican enzimas modificadoras de la pared celular, como EXPs, XTHs (Oh *et al.*, 2009). Otro FT de tipo PIF, SPATULA (SPT), también es un regulador negativo de la germinación, mediando principalmente la respuesta de la semilla a bajas temperaturas (Penfield *et al.*, 2005). SPT inhibe la germinación disminuyendo la sensibilidad de las semillas a GAs, posiblemente mediante la interacción con proteínas DELLA, y alterando el contenido de GAs, mediante la represión transcripcional de los genes *GA3ox1* y *GA3ox2* (Fig. 5). En condiciones de baja temperatura, SPT desaparece, lo cual desencadena un aumento del contenido y la sensibilidad a GA (Oh *et al.*, 2006, 2007; Feng *et al.*, 2008; Holdsworth *et al.*, 2008a).

Tanto el debilitamiento del endospermo como la expansión de las células de eje embrionario (hipocótilo+radícula) son procesos clave en el control de la germinación por GAs, las cuales inducen la expresión de genes que codifican enzimas remodeladoras de la pared celular (Fig. 5; Weitbrecht *et al.*, 2011). Algunos ejemplos son:

INTRODUCCIÓN

- Expansinas: las α -expansinas (EXPA) son un grupo de proteínas que facilitan la expansión de las paredes celulares. Los genes que codifican estas proteínas se expresan tanto en el endospermo como en el eje embrionario durante la germinación (Nonogaki *et al.*, 2007; Bassel *et al.*, 2014). En tomate, se ha observado que *LeEXPA4* se expresa en el endospermo micropilar coincidiendo con el debilitamiento del mismo (Chen y Bradford, 2000). En *Arabidopsis*, *AtEXP2* se expresa exclusivamente durante la germinación en el endospermo micropilar y su expresión está inducida por GAs y no por ABA (Ogawa *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2014). Sin embargo, *AtEXPA5*, *AtEXPA8* y *AtEXPA15* se expresan fundamentalmente en el eje embrionario durante la germinación de las semillas de *Arabidopsis* (Bassel *et al.*, 2014).
- Xiloglucano-endotransglicosilasas/hidrolasas (XTHs): estas enzimas actúan hidrolizando las cadenas de xiloglucano, una de las hemicelulosas más abundantes de la pared celular. En tomate, *LeXET4* se expresa exclusivamente en el endospermo micropilar contribuyendo al debilitamiento del mismo y su expresión está inducida por GAs y no por ABA (Nonogaki *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, *AtXTH9* y *AtXTH19* se expresan fundamentalmente en el eje embrionario en expansión durante la imbibición (Bassel *et al.*, 2014).
- Endo- β -mananasas (MANs): estas enzimas participan en la degradación de mananos presentes en el endospermo. La expresión de genes que codifican MANs ocurre durante la germinación de diversas especies, como *A. thaliana*, *L. sativum*, *Lycopersicon esculentum* y *Brachypodium distachyon* (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011b, c; Morris *et al.*, 2011; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012; González-Calle *et al.*, 2015). En *Arabidopsis*, los genes *AtMAN2*, *5*, *6* y *7* se expresan abundantemente durante la imbibición; y los mutantes con pérdida de función *man6* y *man7* germinan más lentamente que el fenotipo silvestre. Además, la expresión de *AtMAN2*, *5*, *6* y *7* está restringida al endospermo micropilar y al ápice radicular durante la germinación (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011b, c). La expresión de *AtMAN7* está inducida por GAs, pero permanece inalterada por ABA (Iglesias-Fernández *et al.*, 2013). En tomate, se ha localizado la expresión de *LeMAN2* en la zona micropilar justo antes de la emergencia radicular

(Gong y Bewley, 2007). En semillas de *L. sativum*, se demostró la importancia de *LesamAN7* en la germinación (Morris *et al.*, 2011). Recientemente, se ha anotado la familia génica de las MANs en *Brachypodium distachyon*, la planta modelo para las Poaceae; se ha observado que *BdMAN2*, *BdMAN4* y *BdMAN6* se expresan durante la imbibición y sus transcritos se encuentran localizados en la coleoriza y en el ápice radicular durante la germinación. Estos datos sugieren que las MANs podrían tener un papel importante en el debilitamiento de la coleoriza, así como en el crecimiento por expansión de la raíz en monocotiledóneas (González-Calle *et al.*, 2015).

- Celulasas: las celulasas o endo- β -1,4-glucanasas, son enzimas clave en la degradación de la celulosa y se expresan durante la germinación. En *Coffea arabica* dicha actividad se incrementa notablemente durante el inicio del ablandamiento del endospermo (da Silva *et al.*, 2004). En tomate la expresión de *LeCel55* aumenta en la zona micropilar justo antes de la protrusión radicular (Bradford *et al.*, 2000).

1.6. *Sisymbrium officinale* (L.) Scop

Sisymbrium officinale (L.) Scop., la especie objeto de este estudio, es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Brassicaceae. Esta planta es oriunda de Europa, del norte de África y de Oriente Próximo y se encuentra representada en toda la Península Ibérica, donde recibe el nombre común de erísimo o hierba de los cantores. Su tamaño oscila entre los 50 y los 90 cm, sus flores son de color amarillo pálido (Fig. 7a) y sus frutos son silicuas constituidas de valva y rostro, que alcanzan los 13-19 mm en la maduración (Fig. 7b; Castroviejo *et al.*, 2003). Sus semillas tienen forma irregular, con un embrión completamente desarrollado. El tamaño de la semilla oscila entre 0.5 y 1 mm aproximadamente, y su color varía entre el amarillo y el marrón (Fig. 7c; Iglesias-Fernández *et al.*, 2007; Iglesias Fernández, 2009). Dichas diferencias están asociadas a su posición en la silicua y posiblemente a la disponibilidad de nutrientes provenientes de la planta madre (Luzuriaga *et al.*, 2006). La capacidad germinativa está directamente relacionada con el grado de coloración de la semilla, de tal forma que las semillas más oscuras presentan una mayor capacidad germinativa. En *S. officinale*, al igual que en otras Brasicáceas, existe un desfase temporal entre la rotura de la testa y la subsiguiente ruptura del endospermo que en esta especie es

INTRODUCCIÓN

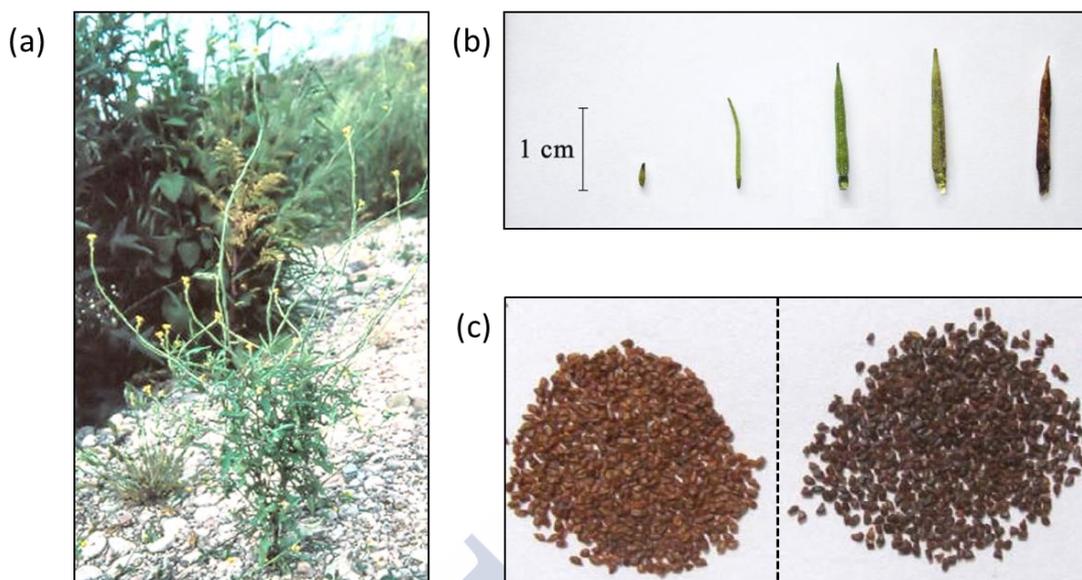


Figura 7: (a): Planta adulta de *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. (b): Silicuas en distintas fases del desarrollo. (c) Dos poblaciones de semillas con diferencias en el color de su cubierta seminal. Las imágenes (a) y (c) han sido adaptadas de Iglesias-Fernández *et al.* (2007).

monoestratificado (Iglesias-Fernández *et al.*, 2007; Iglesias Fernández, 2009; Iglesias-Fernández y Matilla, 2010).

En el momento de la dispersión, las semillas de *S. officinale* se encuentran en dormición primaria y al permanecer en el suelo pueden presentar ciclos de dormición secundaria anuales. La dormición disminuye en otoño e invierno, y aumenta de nuevo en verano, estando dichos cambios asociados a alteraciones en la sensibilidad a la luz, a la temperatura y el nitrato (Bouwmeester y Karseen, 1993; Derk y Karssen, 1993). La dormición primaria de *S. officinale* es intensa, necesita ser sometida a AR durante varios meses para eliminarla por completo, característica que hace a esta especie interesante para abordar el estudio fisiológico-molecular del AR. El AR en esta especie altera los patrones de expresión de varios genes que codifican oxidasas implicadas en el metabolismo de GAs (GA3ox y GA20ox) y de etileno (ACC Oxidasa, ACO), siendo ambas hormonas inductoras de la germinación (Iglesias-Fernández y Matilla, 2009).

No obstante, se conoce muy poco acerca del papel del AR sobre el metabolismo y señalización de ABA, la principal hormona implicada en el mantenimiento de la dormición. La germinación de *S. officinale* depende fuertemente del contenido de nitrato en la semilla. La presencia de nitrato en el medio de imbibición estimula notablemente la germinación; esta

dependencia es atenuada por el AR. La luz roja estimula la germinación de las semillas en presencia de nitrato, y la acción del nitrato parece ser dependiente, al menos en parte, de la biosíntesis y señalización de GAs (Hilhorst *et al.*, 1986; Hilhorst, 1990; Iglesias Fernández, 2009; Iglesias-Fernández y Matilla, 2010).







ANEXO I:

“An update on the role of NCED and CYP707A ABA metabolism genes in seed dormancy induction and the response to after-ripening and nitrate” (2015) *Journal of Plant Growth Regulation* 34: 274-293.



<http://link.springer.com/article/10.1007/s00344-014-9464-7>





2. OBJETIVOS



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido financiado por el proyecto CGL2009-11425 (MICINN; IP Prof. A.J. Matilla Carro). En investigaciones previas de nuestro Grupo se determinó la influencia del *after-ripening* (AR) sobre el metabolismo del etileno y GAs durante la germinación de semillas de *Sisymbrium officinale*, las cuales tienen carácter nitrófilo. Las conclusiones derivadas de estos estudios previos nos condujeron a profundizar en la influencia del nitrato y GAs durante el proceso de AR y también a explorar la participación del ABA debido a su papel clave en la dormición de semillas (revisado en Matilla *et al.*, 2015; **Anexo I** en la **Introducción General**). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se plantearon los **Objetivos** principales que se exponen a continuación:

- 1- Caracterización de la influencia del nitrato, ABA y GAs en la germinación de semillas de *S. officinale* **no sometidas a AR** (durmientes). Para ello: (i) se realizaron ensayos de germinación con ABA, GAs e inhibidores de la síntesis de los mismos, así como en presencia de NO_3^- (KNO_3); (ii) se analizó la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo y la señalización de ABA y GAs (*SoNCED*, *SoCYP707A*, *SoABI5*, *SoGA2ox*, *SoGA3ox*, *SoGA20ox* y *SoRGL2*), durante la germinación en presencia/ausencia de ABA, GAs y NO_3^- ; (iii) se evaluaron las alteraciones histológicas que sufren las semillas durante la germinación. Estos resultados han sido publicados en: “*Nitrate-induced early transcriptional changes during imbibition in non-after-ripened Sisymbrium officinale seeds*” (2013) *Physiologia Plantarum* 148: 560-573 (**Capítulo 1**).
- 2- Caracterización de la influencia del NO_3^- , ABA y GAs en la germinación de semillas de *S. officinale* **sometidas a AR** (no durmientes). Para ello: (i) se realizaron ensayos de germinación añadiendo al medio de imbibición ABA, GAs e inhibidores de la síntesis de los mismos, así como también NO_3^- (KNO_3); y (ii) se analizó la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo y la señalización de ABA y GAs (*SoNCED*, *SoCYP707A*, *SoABI5*, *SoGA2ox*, *SoGA3ox*, *SoGA20ox* y *SoRGL2*), durante el desarrollo y germinación en presencia/ausencia de ABA, GAs y NO_3^- . Estos resultados han sido publicados en: “*Nitrate affects sensu-stricto germination of after-ripened Sisymbrium officinale seeds by modifying expression of SoNCED5, SoCYP707A2 and SoGA3ox2 genes*” (2014) *Plant Science* 217: 99-108 (**Capítulo 2**).

OBJETIVOS

- 3- Caracterización de *SoDOG1* en la germinación de semillas de *S. officinale*. Para ello: (i) se aisló la secuencia codificante *SoDOG1* y se analizó utilizando herramientas bioinformáticas con el fin de confirmar su identidad; y (ii) se evaluó la expresión de *SoDOG1* durante el desarrollo y germinación de semillas sometidas a distintos regímenes de AR, así como en presencia/ausencia de ABA, GAs y NO_3^- en el medio de imbibición. Estos resultados han sido publicados en: “*ABA-stimulated SoDOG1 expression is after-ripening inhibited during early imbibition of germinating *Sisymbrium officinale* seeds*” (2015) *Physiologia Plantarum* 155: 457-471 (Capítulo 3).





3. CAPÍTULO 1:

“Nitrate-induced early transcriptional changes during imbibition in non-after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds” (2013) *Physiologia Plantarum* 148: 560-573.



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.2012.01720.x/full>





4. CAPÍTULO 2:

“Nitrate affects *sensu-stricto* germination of after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds by modifying expression of *SoNCED5*, *SoCYP707A2* and *SoGA3ox2* genes” (2014) *Plant Science* 217: 99-108.



<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945213002707>





5. CAPÍTULO 3:

“ABA-stimulated *SoDOG1* expression is after-ripening inhibited during early imbibition of germinating *Sisymbrium officinale* seeds” (2015) *Physiologia Plantarum* 155: 457-471.



<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ppl.12352/full>







6. DISCUSIÓN GENERAL



Los mecanismos por los que se pierde la dormición en las semillas constituyen un puzzle cuya comprensión es aún escasa. Sin embargo, no hay duda de que existe un fuerte control hormonal coordinado por ABA y GAs. El ABA es necesario para el establecimiento y mantenimiento de la dormición durante la maduración y dispersión de la semilla, mientras que las GAs actúan como inductoras de la germinación. La relación GAs/ABA en la semilla viene determinada por el balance entre el anabolismo y catabolismo de ambas hormonas (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Nonogaki *et al.*, 2007; Gubler *et al.*, 2008; Finkelstein *et al.*, 2008; Holdsworth *et al.*, 2008a; Yamaguchi, 2008; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2009; Nambara *et al.*, 2010; Shu *et al.*, 2015b). Durante la germinación, la biosíntesis de GAs está localizada en la radícula, hipocótilo y endospermo micropilar, mientras que la degradación del ABA ocurre en el endospermo y el embrión (Ogawa *et al.*, 2003; Lefebvre *et al.*, 2006; Okamoto *et al.*, 2006). Las semillas de algunas especies son capaces de disminuir su dormición mediante el almacenamiento en seco (baja humedad) a una temperatura media-alta, proceso conocido como *after-ripening* (AR, *post-maduración*). El AR conduce a una menor restricción de las condiciones óptimas de germinación: mayor rango de temperatura y disminución del requerimiento del NO_3^- , entre otros. Además, el AR provoca una reducción en el contenido y señalización de ABA, así como el aumento de los niveles y sensibilidad a las GAs (Derkx *et al.*, 1993; Alboresi *et al.*, 2005; Kucera *et al.*, 2005; Finch-Savage *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2008; Gubler *et al.*, 2008; Holdsworth *et al.*, 2008a; Iglesias-Fernández *et al.*, 2011a). Por otra parte, el NO_3^- es un factor implicado en la disminución de la dormición, probablemente a través de mecanismos de señalización propios, que se ha relacionado con el AR. Un buen ejemplo de ello son las semillas de *Sisymbrium officinale*, cuya germinación está afectada por el NO_3^- y el AR (Alboresi *et al.*, 2005; Iglesias-Fernández *et al.*, 2007; Iglesias-Fernández y Matilla, 2009, 2010). Nuestro Grupo de Investigación liderado por el Prof. Ángel J. Matilla, en el marco de un proyecto nacional MICINN (CGL2004-01996/BOS), inició el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en la interacción entre GAs y etileno durante la dormición y germinación de las semillas nitrófilas de *S. officinale* sometidas a AR. Entre otros resultados, estas investigaciones llevaron a concluir que: (i) la pérdida de la dormición mediante AR es dependiente de la síntesis de GAs bioactivas; (ii) la semilla seca de *S. officinale* es capaz de realizar la transcripción génica; (iii) el AR acelera la emergencia radicular en ausencia de NO_3^- en el medio de imbibición, al cual el AR es incapaz de reemplazar, **sugiriendo la existencia de un**

DISCUSIÓN GENERAL

cross-talk AR/NO₃⁻. Además, la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis o inactivación de GAs (SoGA3ox2, SoGA20ox2, SoGA2ox2) durante el período de imbibición y emergencia radicular de *S. officinale* sugiere que la participación de las GAs difiere en semillas con y sin AR. Sin embargo, se desconoce si esta intervención es directa o si el ABA colabora en la misma (Iglesias Fernández, 2009). Todos estos antecedentes son la génesis del trabajo expuesto en esta Memoria, en donde se describe, desde una perspectiva integradora, la influencia del AR, NO₃⁻, GAs y ABA en la capacidad germinativa de las semillas de *S. officinale*, y cuyos resultados han sido previamente publicados en revistas indexadas en el SCI (Carrillo-Barral *et al.*, 2013, 2014, 2015).

Influencia del metabolismo y señalización del ABA en la inducción de la dormición de semillas de *S. officinale* L.

La dormición primaria se establece en la planta madre, es inherente a todas las semillas y forma parte del programa de desarrollo de las mismas (Hilhorst y Toorop, 1997). Durante el desarrollo de la semilla, la inducción y el mantenimiento de la dormición, la acumulación de reservas y la adquisición de la tolerancia a la desecación están controladas por el ABA (Finkelstein *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2010; Nambara *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Finkelstein, 2013). Durante el desarrollo de las semillas de *S. officinale*, se analizó la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del ABA (biosíntesis: *SoNCED5*, 6, 9; catabolismo: *SoCYP707A2*) y señalización (*SoABI5*), así como la expresión de *SoRGL2* (gen que codifica una proteína DELLA, regulador negativo de la respuesta a GAs). Estos genes se seleccionaron teniendo en cuenta la información previa descrita en *A. thaliana* (Tablas Suplementarias S1-S2 en Carrillo-Barral *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, la familia génica *NCED* está representada por nueve miembros, de los cuales *AtNCED5*, 6 y 9 son esenciales para el establecimiento de la dormición primaria, y *AtNCED3* y 5 son necesarios para la adquisición de la tolerancia a la desecación (Cadman *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2012; Priya y Siva, 2015). La transcripción de *AtNCED5*, 6 y 9 está restringida a la semilla y no a las valvas del fruto (silicua) como ocurre con *AtNCED2* y 3 (Lefebvre *et al.*, 2006; Kanno *et al.*, 2010). En *S. officinale*, la expresión génica de *SoNCED5*, 6 y 9 alcanza un máximo en el estadio 2 (estadio intermedio del desarrollo

embriogénico), y en menor intensidad en el estadio 5 (maduración), sugiriendo una relación directa con la inducción de la dormición y la tolerancia a la desecación. Estos datos de expresión coinciden con los patrones de acumulación de ABA en las silicuas en desarrollo previamente descritos en *Arabidopsis* (Finkelstein *et al.*, 2008; Kanno *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Martínez-Andújar *et al.*, 2011). Los mutantes deficientes en *AtNCED6* y *AtNCED9* contienen bajos niveles de ABA en semilla seca comparados con los del fenotipo silvestre (Lefebvre *et al.*, 2006). En *S. officinale*, la expresión de *SoNCED6* en semilla seca no sometida a AR (AR0; semilla durmiente) y en el estadio 5 del desarrollo es cuantitativamente similar. Estos resultados apuntan a un papel principal de *SoNCED6* en la inducción y en el mantenimiento de la dormición, al igual que ocurre con *AtNCED6* en *Arabidopsis* (Martínez-Andújar *et al.*, 2011).

La familia génica *CYP707A2* incluye genes que codifican enzimas ABA-8'-hidroxilasas, piezas fundamentales en el catabolismo del ABA (Kushiro *et al.*, 2004; Nambara y Marion-Poll, 2005; Nambara *et al.*, 2010; referencias en Tabla Suplementaria S1 en Carrillo-Barral *et al.*, 2014). La expresión de *SoCYP707A2* durante el desarrollo de la semilla de *S. officinale*, presenta dos máximos: el primero tras la polinización y el segundo en el estadio 5 (al igual que ocurre con *AtNCED5*, 6 y 9). El primer máximo, justo después de la polinización, indica una relación con la eliminación del ABA residual proveniente del proceso de fecundación, facilitando así el desarrollo temprano del embrión. Como ya se indicó anteriormente, la homeostasis de ABA en los órganos vegetales es dependiente del balance entre su biosíntesis y su catabolismo, por lo que la acumulación de *SoCYP707A2* en el estadio 5 del desarrollo no entra en conflicto con la expresión de *SoNCED5*, 6 y 9. Además, su ortólogo en *Arabidopsis* (*CYP707A2*) se expresa abundantemente en las etapas finales del desarrollo de la semilla y su silenciamiento provoca un incremento en el contenido de ABA en estas etapas (Okamoto *et al.*, 2006).

ABI5 es un FT que regula la respuesta a ABA, y RGL2 un regulador negativo de la respuesta a GAs (Holdsworth *et al.*, 2008a; Piskurewicz *et al.*, 2009; Graeber *et al.*, 2012). Durante el desarrollo de la semilla, la expresión del *SoABI5* y *SoRGL2* describe una curva bimodal similar a la observada en *SoNCED5*, 6 y 9, alcanzado uno de los máximos durante la maduración. En su conjunto, estos resultados sugieren un bloqueo de la señalización de GAs y una estimulación de la de ABA durante la maduración de la semilla de *S. officinale*.

DISCUSIÓN GENERAL

El gen *DOG1* fue el primer locus asociado al control de la dormición en las semillas de *A. thaliana* (Bentsink *et al.*, 2006). En los mutantes *Knock-Out dog1*, el contenido de ABA de sus semillas es bajo, mientras que el de GAs es elevado. Además, el grado de dormición y la longevidad de estas semillas es menor que las del fenotipo silvestre (Nakabayashi *et al.*, 2012). Sin embargo, aunque el gen *BnaDOG1* de *Brassica napus* se induce durante el desarrollo, el grado de dormición de estas semillas es poco profundo (Née *et al.*, 2015); indicando que la expresión de *DOG1* no es suficiente para inducir la dormición. En esta Memoria se demuestra que: (i) el gen *SoDOG1* se induce durante el desarrollo de las semillas de *S. officinale*, alcanzando un máximo en los estadios finales de la maduración, y (ii) sus transcritos son abundantes en semilla seca durmiente (AR0; Carrillo-Barral *et al.*, 2015). La acumulación de *SoDOG1* en semilla seca y su perfil de expresión durante el desarrollo son similares a los de *SoABI5* y *SoRGL2* y sugieren una relación con la inducción y el mantenimiento de la dormición de la semilla, como ocurre en *A. thaliana* (Bentsink *et al.*, 2006; Chiang *et al.*, 2011; Nakabayashi *et al.*, 2012; Finkelstein *et al.*, 2013; Carrillo-Barral *et al.*, 2014; Nonogaki, 2014). Muy recientemente, se ha demostrado que la proteína DOG1 debe unirse consigo misma para que sea funcional “in vivo”. Asimismo, se ha observado en distintas accesiones de *Arabidopsis* diferentes capacidades de DOG1 para formar homodímeros, lo que parece contribuir a las variaciones en la intensidad de dormición de las semillas (Nakabayashi *et al.*, 2015).

Influencia del NO₃⁻ en la ruptura de la cubierta seminal de las semillas de *Sisymbrium officinale* L. durante la germinación *sensu stricto*

La germinación de *S. officinale* es dependiente del contenido de NO₃⁻ de sus semillas, de sus niveles en el medio de imbibición y del suministrado por la planta madre durante el desarrollo (Hilhorst, 1990; Iglesias-Fernández y Matilla, 2009, 2010). En la germinación de *S. officinale*, al igual que en otras Brasicáceas, la rotura de la testa y endospermo son dos procesos separados temporalmente (Müller *et al.*, 2006; Iglesias-Fernández y Matilla, 2010). Generalmente, se asume que la ruptura de la cubierta seminal es consecuencia de la fuerza producida por el eje embrionario en expansión promovida por GAs (Holdsworth *et al.*, 2008a; Piskurewicz *et al.*, 2009). En esta Memoria, se demuestra que la presencia de NO₃⁻ (KNO₃) en el medio de imbibición, tanto en semillas durmientes (AR0) como sometidas a AR (AR7:

siete meses de AR), estimula la ruptura de la testa y en menor medida la del endospermo (Carrillo-Barral *et al.*, 2013, 2014). Estos hallazgos confirman que el efecto del NO_3^- no es dependiente, al menos totalmente, del AR (Iglesias-Fernández y Matilla, 2009). En semillas imbibidas de *S. officinale*, el NO_3^- es capaz de sobrellevar la inhibición de la ruptura de la cubierta seminal en ausencia de GAs (ej.: paclobutrazol), tanto en semillas con AR0 como AR7. Estos resultados indican que el NO_3^- estimula la ruptura de la cubierta seminal a través de una vía independiente de GAs. Sin embargo, esta hipótesis requiere un estudio más pormenorizado.

En *Arabidopsis*, la presencia de NO_3^- en el medio de imbibición disminuye el contenido de ABA y reduce el grado de dormición de las semillas (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Matakiaadis *et al.*, 2009). Se ha descrito que el endospermo en Dicotiledóneas y la coleorriza en Monocotiledóneas son tejidos que responden a ABA durante la germinación (Piskurewicz *et al.*, 2008, 2009; Barrero *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). En *S. officinale*, el ABA es incapaz de inhibir la ruptura de la cubierta seminal, en presencia o ausencia de NO_3^- , en semillas AR0 y no durmientes (AR7 y AR20). Sin embargo, el ABA inhibe la ruptura del endospermo (RE), al igual que ocurre en *Lepidium sativum* o *A. thaliana* siendo este efecto revertido por GAs (Yamaguchi y Kamiya, 2001; Koornneef *et al.*, 2002; Kucera *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006; Carrillo-Barral *et al.*, 2013, 2014). La RE micropilar no se ve afectada por la presencia de ABA en el medio de germinación en semillas AR7 (AR óptimo), pero sí en semillas AR0 y AR20 (Carrillo-Barral *et al.*, 2014). Por el contrario, el efecto del ABA sobre la RE es independiente de la presencia de nitrato. Estos datos sugieren que el AR (óptimo) altera negativamente la sensibilidad al ABA del endospermo micropilar de las semillas imbibidas de *S. officinale*.

Por otro lado, se ha sugerido que las enzimas modificadoras de la pared celular facilitan la ruptura de la cubierta seminal al ser liberadas desde el endospermo y/o la radícula (Hilhorst *et al.*, 2010). En *A. thaliana*, al igual que en otras especies, las endo- β -manananasas (MANs) se han relacionado con la germinación (Queiroz *et al.*, 2012; Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012). *AtMAN5*, *AtMAN6* y *AtMAN7*, genes que codifican MANs en *Arabidopsis*, promueven la emergencia radicular mediante el debilitamiento de las paredes celulares del endospermo micropilar (Iglesias-Fernández *et al.*, 2011b, c). Durante la germinación, Lee *et al.*, (2012) describen que las MANs hidrolizarían el heteromanano presente en el mucílago de la semilla

DISCUSIÓN GENERAL

de *A. thaliana* pudiendo generar oligosacáridos señalizadores, los cuales tendrían un efecto promotor de la germinación. En *Brachypodium distachyon*, los mananos presentes en la coleorriza de la semilla son degradados en el transcurso de la germinación, indicando una relación con su debilitamiento y facilitando así la emergencia radicular (González-Calle *et al.*, 2015). En *S. officinale*, la actividad MAN es abundante en semilla seca AR7, y escasa en AR0, aumentando progresivamente en el transcurso de la imbibición en ambas poblaciones (Iglesias-Fernández y Matilla, 2009). La expresión de *SoMAN7* y *SoMAN6* aumenta concomitantemente con la germinación; y el NO_3^- únicamente estimula la acumulación de transcritos de *SoMAN6*. Estos datos sugieren que el NO_3^- participa en el debilitamiento de la cubierta seminal durante la germinación de *S.officinale* y que la actividad MAN es una diana de la señalización del NO_3^- .

Influencia del NO_3^- , ABA y GAs en la transición dormición-germinación de semillas de *S. officinale* L. sometidas a AR

El mantenimiento de la dormición durante la imbibición de semillas de *A. thaliana* requiere de la síntesis *de novo* de ABA. Aunque por el momento este proceso ha sido poco estudiado (Nambara *et al.*, 2010; Dekkers *et al.*, 2015). Uno de los propósitos de este trabajo ha sido determinar la influencia del NO_3^- , durante la imbibición de las semillas de *S. officinale* AR0 y AR7, en la expresión de genes que codifican enzimas relevantes en las síntesis o degradación de ABA (*SoNCED5*, *SoNCED6*, *SoNCED9* y *SoCYP707A2*). En semillas AR0 la expresión de *SoNCED6* y especialmente la de *SoNCED9* se incrementan en las primeras horas de imbibición en agua ó NO_3^- . Además, la transcripción de estos genes es menor en presencia de NO_3^- que en agua durante la imbibición tardía. Durante la imbibición de semillas AR7, la transcripción de *SoNCED5*, *SoNCED6* y *SoNCED9* disminuye respecto a semilla seca, aunque mantiene ciertos niveles de transcripción. NCED5, 6 y 9 han sido relacionados con la inducción de la dormición secundaria (termoinhibición) durante los períodos de imbibición temprana (Lefebvre *et al.*, 2006; Toh *et al.*, 2012; Referencias en Tabla Suplementaria S2 en Carrillo-Barral *et al.*, 2014).

En *Arabidopsis*, el gen *CYP707A2* es el principal responsable de la eliminación de ABA durante la imbibición temprana de la semilla, y participa en la respuesta a NO_3^- (Kushiro

et al., 2004; Okamoto *et al.*, 2006; Matakiadis *et al.*, 2009). Se ha propuesto que el NO_3^- disminuye el estatus de la dormición de las semillas de *A. thaliana* ecotipo *Cvi* (*Cape verde islands*) mediante la disminución del contenido de ABA (Ali-Rachedi *et al.*, 2004). Además, Matakiadis *et al.* (2009) indicaron que CYP707A2 es el principal responsable de la disminución del contenido de ABA en respuesta al NO_3^- endógeno. En semillas AR7 de *S. officinale*, la acumulación de los transcritos de *SoCYP707A2* es escasa durante la imbibición en agua, pero aumenta en presencia de NO_3^- . Sin embargo, en semillas AR0 la expresión de este gen es elevada en todos los estadios analizados, y también es inducida por NO_3^- . En *Hordeum vulgare*, el AR no altera la expresión de genes implicados en el anabolismo de ABA, pero sí lo hace de *HvGA3ox2*, *HvGA2ox3* y *HvCYP707A1* durante la imbibición de las semillas (Millar *et al.*, 2006; Gubler *et al.*, 2008). Estos resultados indican que el NO_3^- promueve la degradación del ABA durante la imbibición de las semillas de *S. officinale* AR0 y AR7, y que el AR disminuye su biosíntesis, mediante alteraciones en la expresión de *SoCYP707A2*, *SoNCED6* y *SoNCED9*, respectivamente.

En *A. thaliana*, la ruptura del endospermo está mediada por la señalización del ABA y no por su metabolismo (Bethke *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a). Los FTs ABI3 y ABI5 son importantes reguladores de la respuesta a ABA durante la germinación de las semillas de *A. thaliana* (López-Molina *et al.*, 2001, 2002; Piskurewicz *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). El ABA estimula la acumulación de ABI5 y su fosforilación, lo que provoca la activación de la proteína (Raghavendra *et al.*, 2010). En semillas AR0 de *S. officinale*, el NO_3^- disminuye la expresión de *SoABI5* durante las últimas horas de imbibición, al igual que ocurre con los genes implicados en el metabolismo de ABA (*SoNCED6* y 9). Estos resultados están en concordancia también con los obtenidos para *SoCYP707A2*, y sugieren, además de un efecto del NO_3^- y del AR en el metabolismo del ABA, también un efecto sobre su señalización. De forma similar, durante la germinación de *Arabidopsis*, uno de los derivados de nitrato ($\text{NO}\cdot$) promueve la degradación de ABI5 a través de la S-nitrosilación de la cisteína153, facilitando así la germinación de las semillas (Albertos *et al.*, 2015).

A diferencia del ABA, el contenido de GAs en la semilla es bajo durante la imbibición temprana y aumenta a medida que la germinación progresa. La relación GAs/ABA determina la capacidad germinativa de la semilla (Yamaguchi y Nambara, 2006). En las semillas de *S. officinale*, la adición de GAs al medio de imbibición tiene un efecto positivo sobre la rotura de

DISCUSIÓN GENERAL

la testa. En estas semillas, la transcripción de *SoGA3ox2*, *SoGA20ox2* incrementa durante el proceso de imbibición con respecto a la semilla seca; mientras que la expresión de *SoGA2ox6* tiende a disminuir. Durante la imbibición de las semillas AR0, el NO_3^- reduce la expresión *SoGA3ox2*, *SoGA20ox2* y *SoGA2ox6* sugiriendo que el efecto positivo del NO_3^- en la germinación no está causado por un incremento en el contenido de GAs. El efecto contrario es observado en semillas AR7, en donde el NO_3^- incrementa principalmente la expresión de *SoGA3ox2*. En semillas de Dicotiledóneas, el aumento del contenido de GAs, así como su señalización, participa en la pérdida de la dormición a través del AR. Sin embargo, en Monocotiledóneas como *Triticum aestivum*, el AR está asociado a una disminución en la señalización del ABA (Corbineau *et al.*, 2000; Kucera *et al.*, 2005; Holdsworth *et al.*, 2008a; Barrero *et al.*, 2012; Linkies y Leubner-Metzger, 2012; Liu *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, la proteína DELLA RGL2 se ha descrito como el principal regulador de la germinación en respuesta a GAs. RGL2 regula positivamente el contenido de ABA en la semilla y la función de ABI5. Además, el ABA induce tanto la expresión de RGL2 como la de ABI5 (Lee *et al.*, 2002; 2010). Durante la germinación de *A. thaliana*, las GAs provocan la degradación de RGL2, eliminando así la represión que ejerce sobre la germinación (Piskurewicz *et al.*, 2008, 2009; Lee *et al.*, 2010). En semillas de *S. officinale* (durmientes y no durmientes), el NO_3^- altera negativamente la expresión de *SoRGL2* durante la imbibición, indicando que modifica positivamente la señalización de GAs durante la germinación de las semillas de *S. officinale*.

La función de DOG1 durante la germinación de las semillas es un elemento poco estudiado. En *L. sativum*, se ha propuesto que *LesDOG1* no sólo participa en la inducción de la dormición, sino también en la germinación *sensu stricto* (Graeber *et al.*, 2010). En esta Memoria se evalúa el efecto del AR, el NO_3^- , el ABA y las GAs en la expresión de *SoDOG1* durante la germinación *sensu stricto* de *S. officinale* y se demuestra que sus transcritos se acumulan en semilla seca y disminuyen durante la imbibición en semillas AR0, AR7 y AR27. En *Arabidopsis*, los transcritos de *AtDOG1* están presentes tanto en semillas no durmientes como durmientes y su expresión disminuye rápidamente durante la imbibición temprana (Nakabayashi *et al.*, 2012). La presencia de NO_3^- en el medio de imbibición reduce la expresión de *SoDOG1* en semillas AR0 y AR27. Curiosamente, la adición exógena de ABA y NO_3^- estimula la transcripción de *SoDOG1* durante las 6 primeras horas de imbibición en semillas AR0. En *L. sativum*, se ha propuesto que el ABA reprime la germinación aumentando la expresión de *LesDOG1* via ABI3 y ABI5 (Graeber *et al.*, 2010).

Considerando que en las semillas de *S. officinale* AR7 el catabolismo de ABA está estimulado y su señalización reducida (Carrillo-Barral *et al.*, 2014), estos datos sugieren que la señalización del ABA es una de las vías a través de la cual se induce *SoDOG1*. Recientemente, se ha descrito que DOG1 controla la dormición en Brasicáceas mediante la represión de enzimas modificadoras de la pared celular inducidas por GAs (Graeber *et al.*, 2014). Sin embargo, en *S. officinale*, la adición de GAs al medio de imbibición no altera el patrón de expresión de *SoDOG1* en ninguno de los regímenes de AR estudiados (AR0 y AR7).

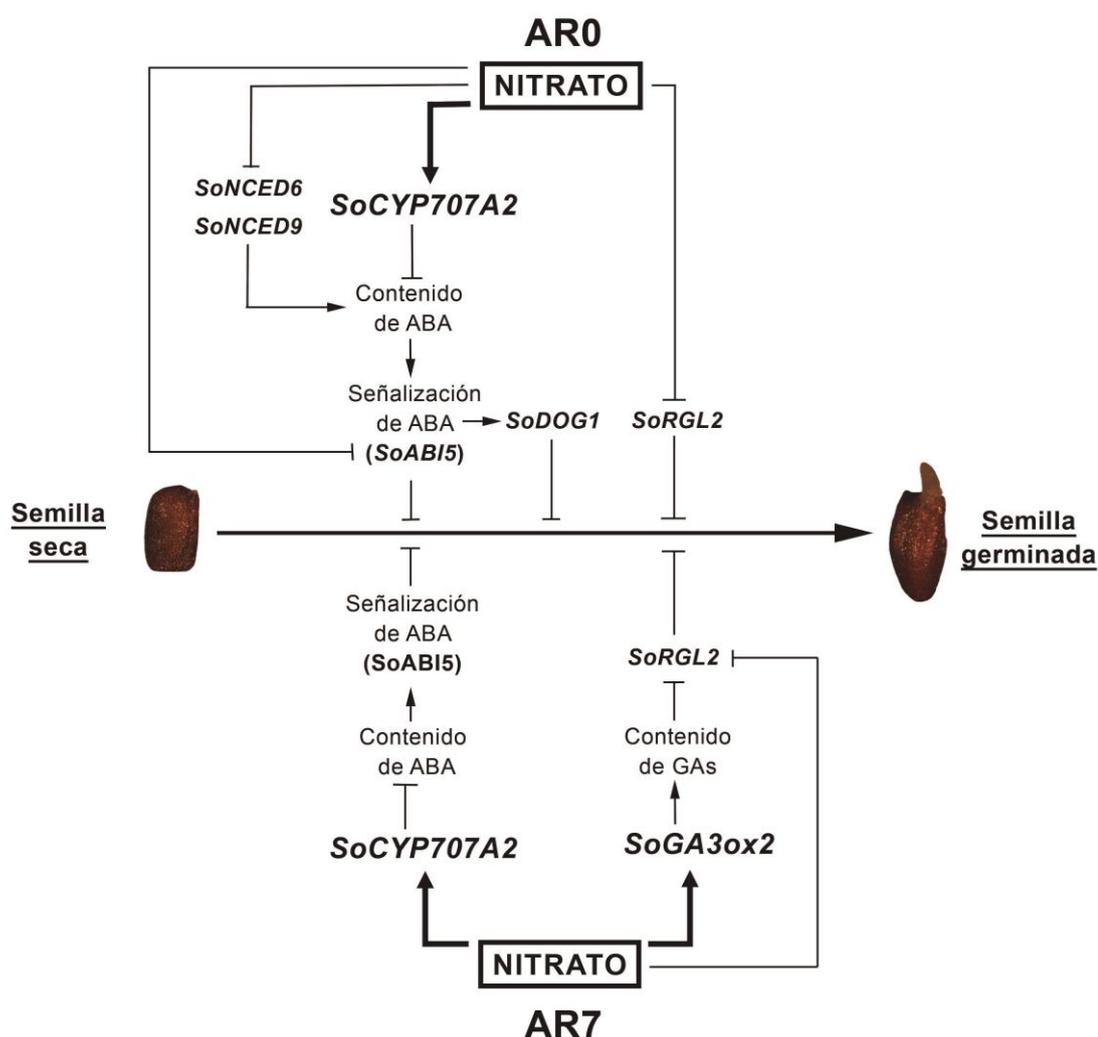


Figura 1: Modelo de la influencia del NO_3^- , el ABA y las GAs en la germinación de las semillas de *S. officinale* AR0 y AR7. El modelo está basado en los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral y los artículos que contiene (Carrillo-Barral *et al.*, 2013, 2014, 2015).

DISCUSIÓN GENERAL

En resumen (Fig. 1), el NO_3^- principalmente aumenta la expresión de *SoGA3ox2* y *SoCYP707A2* durante la imbibición de las semillas AR7 de *S. officinale*, mientras que altera negativamente la expresión de *SoRGL2*. Durante la imbibición de semillas AR0, el NO_3^- disminuye la expresión de *SoNCED6*, *SoNCED9*, *SoRGL2* y *SoABI5* y aumenta la de *SoCYP707A2*. Además, el ABA estimula la expresión de *SoDOG1* durante la imbibición en NO_3^- de semillas AR0. Todo ello indica que las semillas AR7 son más sensibles a la influencia del NO_3^- que las semillas AR0 y que esta diferencia radica principalmente en la capacidad de síntesis de GAs bioactivas y no tanto en el metabolismo del ABA o en la señalización de ambas hormonas. De esta forma, se justifica que la germinación de semillas AR0 sea más lenta que las de AR7 aún en presencia de NO_3^- , ya que la capacidad de síntesis de GAs en semillas AR0 es inferior a la de AR7, aunque el catabolismo de ABA está activo en ambas poblaciones.





7. CONCLUSIONES



Conclusión 1.

Durante el desarrollo de la semilla de *Sisymbrium officinale*, los perfiles de expresión de *SoNCED5*, *SoNCED6*, *SoNCED9*, *SoCYP707A2*, *SoABI5*, *SoRGL2* y *SoDOG1* describen una curva bimodal, alcanzado uno de los máximos tras la polinización y el otro en el estadio 5 (maduración). La acumulación de *SoCYP707A2* en el estadio 5 no entra en conflicto con la expresión de *SoNCED5*, 6 y 9 ya que la homeostasis de ABA en los órganos vegetales depende del balance entre su biosíntesis y su catabolismo. Estos datos sugieren un bloqueo de la señalización de GAs y una estimulación de la señalización y biosíntesis de ABA durante la inducción y el mantenimiento de la dormición de la semilla.

Conclusión 2.

La presencia de NO_3^- (KNO_3) en el medio de imbibición, tanto en semillas durmientes (AR0) como sometidas a AR (AR7), estimula la ruptura de la testa y en menor medida la del endospermo, confirmando así que el efecto del NO_3^- no es dependiente, al menos totalmente, del AR. Además, el NO_3^- es capaz de soportar la inhibición de la ruptura de la cubierta seminal en ausencia de GAs (ej.: paclobutrazol), sugiriendo que estimula la ruptura de la cubierta seminal a través de una vía independiente de GAs.

Conclusión 3.

Durante la imbibición de las semillas de *S. officinale*, el ABA es incapaz de inhibir la ruptura de la cubierta seminal, en presencia o ausencia de NO_3^- , en semillas durmientes (AR0) y no durmientes (AR7 y AR20), pero altera negativamente la ruptura del endospermo. El AR, y no el NO_3^- , modifica la influencia del ABA en este proceso, produciendo su ralentización en semillas AR0 y AR20 (AR supra-óptimo), pero no en las semillas AR7 (AR óptimo). Estos datos sugieren que el AR (óptimo) altera negativamente la sensibilidad al ABA en el endospermo micropilar de las semillas imbibidas de *S. officinale*.

Conclusión 4.

Durante la imbibición de las semillas AR0 de *S. officinale*, la adición de NO_3^- al medio de imbibición disminuye la expresión de *SoNCED6*, *SoNCED9*, mientras que estimula la de *SoCYP707A2*. Durante la germinación de las semillas AR7, el NO_3^- incrementa la expresión de *SoCYP707A2*, sin afectar a la de *SoNCED6* y *SoNCED9*. Estos datos sugieren que el NO_3^-

CONCLUSIONES

promueve la degradación del ABA y que el AR altera negativamente su biosíntesis en la semilla. En semillas AR0, el NO_3^- disminuye la expresión de *SoABI5* durante las últimas horas de imbibición, indicando que el NO_3^- y el AR afectan tanto al metabolismo del ABA como a su señalización.

Conclusión 5.

Durante la imbibición de semillas AR0, el NO_3^- reduce la expresión *SoGA3ox2*, *SoGA20ox2* y *SoGA2ox6*. Sin embargo, en semillas AR7, el NO_3^- incrementa principalmente la expresión de *SoGA3ox2*. En semillas durmientes y no durmientes, el NO_3^- altera negativamente la expresión de *SoRGL2* durante la imbibición. En su conjunto, estos datos sugieren que el efecto positivo del NO_3^- en la germinación de semillas AR0 no está causado por un incremento en el contenido de GAs, aunque sí modifica positivamente la señalización de GAs. Sin embargo, en semillas AR7, el NO_3^- parece estimular tanto la biosíntesis como la señalización de GAs.

Conclusión 6.

La expresión de *SoDOG1* durante la imbibición de semillas de *S. officinale* disminuye durante el transcurso de la germinación; este hecho ocurre en todos los regímenes de AR estudiados (AR0 y AR7). La presencia de NO_3^- en el medio de imbibición reduce la expresión de *SoDOG1* en semillas AR0 y AR27. La adición de ABA y NO_3^- estimula la transcripción de *SoDOG1* durante las 6 primeras horas de imbibición en semillas AR0. Estos datos indican que la señalización del ABA es una de las vías a través de la cual se induce *SoDOG1* durante la germinación de *S. officinale*.



8. BIBLIOGRAFÍA GENERAL



- Achard, P. y Genschik, P. (2009) Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* 60: 1085-1092.
- Agrawal, G.K., Yamazaki, M., Kobayashi, M., Hirochika, R., Miyao, A. y Hirochika, H. (2001) Screening of the rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion. Tagging of a zeaxanthin epoxidase gene and a novel OsTATC gene. *Plant Physiology* 125:1248-1257.
- Albertos, P., Romero-Puertas, M.C., Tatematsu, K., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Nambara, E. y Lorenzo, O. (2015) S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. *Nature Communications* 6: 8669.
- Alboresi, A., Gestin, C., Leydecker, M.T., Bedu, M., Meyer, C. y Truong, H.N. (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 28: 500-512.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P. y Jullien, M. (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: 479-488.
- Alonso, R., Oñate-Sánchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J. y Dröge-Laser, W. (2009) A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of *Arabidopsis* seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *The Plant Cell* 21: 1747-1761.
- Alonso-Blanco, C., Bentsink, L., Hanhart, C.J., Blankestijn-de Vries, H. y Koornneef, M. (2003) Analysis of natural allelic variation at seed dormancy loci of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 164: 711-729.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Angelovici, R., Galili, G., Fernie, A.R. y Fait, A. (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends in Plant Science* 15: 211-218.
- Angelovici, R., Fait, A., Fernie, A.R. y Galili, G. (2011) A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down *Arabidopsis* seed germination. *New Phytologist* 189: 148-159.
- Appelhagen, I., Thiedig, K., Nordholt, N., Schmidt, N., Huep, G., Sagasser, M. y Weisshaar, B. (2014) Update on transparent testa mutants from *Arabidopsis thaliana*: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta* 240: 955-970.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Arc, E., Sechet, J., Corbineau, F., Rajjou, L. y Marion-Poll, A. (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* 4: 63.
- Argyris, J., Truco, M.J., Ochoa, O., McHale, L., Dahal, P., Van Deynze, A., Michelmore, R.W. y Bradford, K.J. (2011) A gene encoding an abscisic acid biosynthetic enzyme (*LsNCED4*) collocates with the high temperature germination locus Htg6. 1 in lettuce (*Lactuca sp.*). *Theoretical and Applied Genetics* 122: 95-108.
- Ashikawa, I., Abe, F. y Nakamura, S. (2010) Ectopic expression of wheat and barley *DOG1*-like genes promotes seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Science* 179: 536-542.
- Ashikawa, I., Abe, F. y Nakamura, S. (2013) *DOG1*-like genes in cereals: investigation of their function by means of ectopic expression in *Arabidopsis*. *Plant Science* 208: 1-9.
- Ashikawa, I., Mori, M., Nakamura, S. y Abe, F. (2014) A transgenic approach to controlling wheat seed dormancy level by using *Triticeae* *DOG1*-like genes. *Transgenic Research* 23: 621-629.
- Bahin, E., Bailly, C., Sotta, B., Kranner, I., Corbineau, F. y Leymarie, J. (2011) Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signaling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant, Cell & Environment* 34: 980-993.
- Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C. y Li, W.W. (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research* 34: W369-W373.
- Barrero, J.M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P.L., Ponce, M.R. y Micol, J.L. (2005) A mutational analysis of the *ABAI* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* 56: 2071-2083.
- Barrero, J.M., Rodríguez, P.L., Quesada, V., Alabadi, D., Blázquez, M. A., Boutin, J.P., Marion-Poll, A., Ponce, M.R. y Micol, J.L. (2008) The *ABAI* gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 31: 227-234.
- Barrero, J.M., Talbot, M.J., White, R.G., Jacobsen, J.V. y Gubler, F. (2009) Anatomical and transcriptomic studies of the coleorhiza reveal the importance of this tissue in regulating dormancy in barley. *Plant Physiology* 150: 1006-1021.
- Barrero, J.M., Jacobsen, J. y Gubler, F. (2010a) Seed dormancy: approaches for finding new genes in cereals. En Pua, E.C. y Davey, M.R (Eds.) *Plant development biology-biotechnology perspectives* (pp. 361-381). Springer, Berlín.
- Barrero, J.M., Millar, A.A., Griffiths, J., Czechowski, T., Scheible, W.R., Udvardi, M., Reid, J.B., Ross, J.J., Jacobsen, J.V. y Gubler, F. (2010b) Gene expression profiling identifies two

regulatory genes controlling dormancy and ABA sensitivity in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Journal* 61: 611-622.

Barrero, J.M., Jacobsen, J.V., Talbot, M.J., White, R.G., Swain, S.M., Garvin, D.F. y Gubler, F. (2012) Grain dormancy and light quality effects on germination in the model grass *Brachypodium distachyon*. *New Phytologist* 193: 376-386.

Barrero, J.M., Cavanagh, C. y Gubler, F. (2013) High-throughput genetic dissection of seed dormancy. En Becraft, P.W. (Ed.) *Seed Genomics*. Oxford: Wiley Inc.

Basbous-Serhal, I., Leymarie, J. y Bailly, C. (2015) Fluctuation of *Arabidopsis* seed dormancy with relative humidity and temperature during dry storage. *Journal of Experimental Botany* 10.1093/jxb/erv439.

Baskin, J.M. y Baskin, C.C. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1-16.

Bassel, G.W., Fung, P., Chow, T.F.F., Foong, J.A., Provart, N.J. y Cutler, S.R. (2008) Elucidating the germination transcriptional program using small molecules. *Plant Physiology* 147: 143-155.

Bassel, G.W., Stamm, P., Mosca, G., de Reuille, P.B., Gibbs, D.J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M.J. y Smith, R.S. (2014) Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the *Arabidopsis* embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 8685-8690.

Batlla, D. y Benech-Arnold, R.L. (2005) Changes in the light sensitivity of buried *Polygonum aviculare* seeds in relation to cold-induced dormancy loss: development of a predictive model. *New Phytologist* 165: 445-452.

Baud, S., Boutin, J.P., Miquel, M., Lepiniez, L. y Rochat, C. (2002) An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 151-160.

Bazin, J., Langlade, N., Vincourt, P., Arribat, S., Balzergue, S., El-Maarouf-Bouteau, H. y Bailly, C. (2011) Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *The Plant Cell* 23: 2196-2208.

Belin, C., Megies, C., Hauserova, E. y Lopez-Molina, L. (2009) Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryogenic axis after germination by enhancing auxin signaling. *The Plant Cell* 21: 2253-2268.

Benamar, A., Rolletschek, H., Borisjuk, L., Avelange-Macherel, M.H., Curien, G., Mostefai, H.A., Andriantsitohaina, R. y Macherel, D. (2008) Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 10: 1268-1275.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C.J. y Koornneef, M. (2006) Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 103: 17042-17047.

Bentsink, L., Soppe, W. y Koornneef, M. (2007) Genetic aspects of seed dormancy. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 113-132). Oxford: Blackwell Publishing.

Bentsink, L. y Koornneef, M. (2008) Seed dormancy and germination. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 6: e0119.

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., Smeekens, S. y 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, U.S.A.* 107: 4264-4269.

Bethke, P.C., Libourel, I.G. y Jones, R.L. (2006a) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57: 517-526.

Bethke, P.C., Libourel, I.G., Reinöhl, V. y Jones, R.L. (2006b) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223: 805-812.

Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.Y., Still, D.W. y Jones, R.L. (2007a) The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173-1188.

Bethke, P.C., Libourel, I.G. y Jones, R.L. (2007b) Nitric oxide in seed dormancy and germination. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 153-175). Oxford: Blackwell Publishing.

Bewley, J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.

Bewley J.D., Hempel F.D., McCormick, S., Zambryski, P. (2000) Reproductive development. En Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. (Eds.), *Biochemistry & molecular biology of plants* (pp. 988-1043). Rockville, MD, U.S.A: American Society of Plant Biologist.

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. y Nonogaki, H. (2013) Seeds: physiology of development, germination and dormancy. New York: Springer.

Bouwmeester, H.J. y Karssen, C.M. (1993) Annual changes in dormancy and germination in seeds of *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. *New Phytologist* 124: 179-191.

Bove, J., Lucas, P., Godin, B., Oge, L., Jullien, M. y Grappin, P. (2005) Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control

during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology* 57: 593-612.

Bradford, K.J., Chen, F., Cooley, M.B., Dahal, P., Downie, B., Fukunaga, K.K., Gee, O.H., Gurusinghe, S., Mella, R.A., Nonogaki, H., Wu, C.T., Yang, H. y Yim, K.O. (2000) Gene expression prior to radicle emergence in imbibed tomato seeds. En Black, M., Bradford, K.J. y Vázquez-Ramos, J. (Eds.) *Seed Biology Advances and Applications* (pp. 231-252). UK: CABI, Wallingford.

Brandon, H.L., Cheng, C., Anhthu, Q.B., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbridge, R., Horvath, S., Drews, G.N., Fischer, R.L., Okamuro, J.K., Harada, J.J. y Goldberg, R.B. (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 107: 8063-8070.

Cadman, C.S.C., Toorop, P.E., Hilhorst, H.W.M. y Finch-Savage, W.E. (2006) Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *The Plant Journal* 46: 805-822.

Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L. y Holdsworth, M. (2008) Seed afterripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 53: 214-224.

Carrillo-Barral, N., Matilla, A.J., Iglesias-Fernández, R. y Rodríguez-Gacio, M. (2013) Nitrate-induced early transcriptional changes during imbibition in non-after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds. *Physiologia Plantarum* 148: 560-573.

Carrillo-Barral, N., Matilla, A.J., del Carmen Rodríguez-Gacio, M. e Iglesias-Fernández, R. (2014) Nitrate affects *sensu-stricto* germination of after-ripened *Sisymbrium officinale* seeds by modifying expression of *SoNCED5*, *SoCYP707A2* and *SoGA3ox2* genes. *Plant Science* 217: 99-108.

Carrillo-Barral, N., Matilla, A.J., García-Ramas, C. y Rodríguez-Gacio, M.C. (2015) ABA-stimulated *SoDOG1* expression is after-ripening inhibited during early imbibition of germinating *Sisymbrium officinale* seeds. *Physiologia Plantarum* 155: 457-471.

Castroviejo, S., Aedo, C., Cirujano, S., Laínz, M., Montserrat, P., Morales, R., Muñoz Garmendia, F., Navarro, C., Paiva, J. y Soriano, C. (2003) *Flora iberica* 4. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

Cheng, W.H., Chiang, M.H., Hwang, S.G. y Lin, P.C. (2009) Antagonism between abscisic acid and ethylene in *Arabidopsis* acts in parallel with the reciprocal regulation of their metabolism and signaling pathways. *Plant Molecular Biology* 71: 61-80.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Chen, F., y Bradford, K.J. (2000) Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiology* 124: 1265-1274.

Chiang, G.C., Barua, D., Kramer, E.M., Amasino, R.M. y Donohue, K. (2009) Major flowering time gene, FLOWERING LOCUS C, regulates seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 106: 11661-11666.

Chiang, G.C., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., Koornneef, M., Soppe, W.J.J., Donohue, K y de Meaux, J. (2011) *DOG1* expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology* 20: 3336-3349.

Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M. y Grappin, P. (2006) Proteomic analysis of seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 142: 1493-1510.

Chien, C.T., Kuo-Huang, L.L. y Lin, T.P. (1998) Changes in ultrastructure and abscisic acid level, and response to applied gibberellins in *Taxus mairei* seeds treated with warm and cold stratification. *Annals of Botany* 81: 41-47.

Chitnis, V.R., Gao, F., Yao, Z., Jordan, M.C., Park, S. y Ayele, B.T. (2014) After-ripening induced transcriptional changes of hormonal genes in wheat seeds: the cases of brassinosteroids, ethylene, cytokinin and salicylic acid. *PLoS ONE* 9: e87543.

Chiwocha, S.D., Cutler, A., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Yang, J., Ross, A.R. y 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. *The Plant Journal* 42: 35-48.

Chono, M., Honda, I., Shinoda, S., Kushiro, T., Kamiya, Y., Nambara, E., Kawakami, N., Kaneko, S. y Watanabe, Y. (2006) Field studies on the regulation of abscisic acid content and germinability during grain development of barley: molecular and chemical analysis of pre-harvest sprouting. *Journal of Experimental Botany* 57: 2421-2434.

Corbineau, F., Benamar, A. y Daniel, C. (2000) Changes in sensitivity to abscisic acid of the developing and maturing embryo of two wheat cultivars with different sprouting susceptibility. *Israel Journal of Plant Sciences* 48: 189-197.

Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C. y El-Maarouf-Bouteau, H. (2014) Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Frontiers in Plant Science* 5: 539.

Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S. y McCourt, P. (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273: 1239-1241.

Cutler, A.J. y Krochko, J.E. (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4: 472-478.

- Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R. y Abrams, S.R. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Reviews Plant Biology* 61: 651-679.
- da Silva, E.A.A., Toorop, P.E., van Aelst, A.C. y 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.
- da Silva, E.A., Toorop, P.E., Van Lammeren, A.A. y Hilhorst, H.W. (2008) ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. *Annals of Botany* 102: 425-433.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U. y Jürgens, G. (2010) Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* 61: 959-970.
- Dekkers, B.J., Costa, M.C.D., Maia, J., Bentsink, L., Ligterink, W. y Hilhorst, H.W. (2015) Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta* 241: 563-577.
- Debeaujon, I., Léon-Kloosterziel, K.M. y Koornneef, M. (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 403-414.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M. y Lepiniec, L. (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *The Plant Cell* 15: 2514-2531.
- Debeaujon, I., Lepiniec, L., Pourcel, L. y Routaboul, J.M. (2007) Seed coat development and dormancy. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 25-49). Oxford: Blackwell Publishing.
- DeBono, A.G. y Greenwood, J.S. (2006) Characterization of programmed cell death in the endosperm cells of tomato seed: two distinct death programs. *Botany* 84: 791-804.
- Derkx, M.P.M. y Karssen, C.M. (1993) Changing sensitivity to light and nitrate, but not to gibberellins regulates seasonal dormancy patterns in *Sisymbrium officinale* seeds. *Plant, Cell & Environment* 16: 469-479.
- Destefano-Beltrán, L., Knauber, D., Huckle, L. y Suttle, J.C. (2006) Effects of postharvest storage and dormancy status on ABA content, metabolism, and expression of genes involved in ABA biosynthesis and metabolism in potato tuber tissues. *Plant Molecular Biology* 61: 687-697.
- Ding, Z.J., Yan, J.Y., Li, G.X., Wu, Z.C., Zhang, S.Q. y Zheng, S.J. (2014) WRKY41 controls *Arabidopsis* seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA. *The Plant Journal* 79: 810-823.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Domínguez, F. y Cejudo, F.J. (2014) Programmed cell death (PCD): an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in Plant Science* 5: 366.

Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K. y Willis, C.G. (2010) Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 41: 293-319.

Du, W., Cheng, J., Cheng, Y., Wang, L., He, Y., Wang, Z. y Zhang, H. (2015) Physiological characteristics and related gene expression of after-ripening on seed dormancy release in rice. *Plant Biology* 17: 1156-1164.

Dumas, C. y Rogowsky, P. (2008) Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus - Biologies* 331: 715-725.

Ezcurra, I., Ellerstrom, M., Wycliffe, P., Stalberg, K. y Rask, L. (1999) Interaction between composite elements in the *napA* promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology* 40: 699-709.

Fagoaga, C., Tadeo, F.R., Iglesias, D.J., Huerta, L., Lliso, I., Vidal, A.M., Talón, M., Navarro, L., García-Martínez, J.L., Peña, L. (2007) Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a *GA20-oxidase* gene modifies plant architecture. *Journal of Experimental Botany* 58: 1407-1420.

Fang, J. y Chu, C. (2008) Abscisic acid and the pre-harvest sprouting in cereals. *Plant Signaling & Behavior* 3: 1046-1048.

Fenner, M. y Thompson, K. (2005) Seed dormancy. En Fenner, M. y Thompson, K. (Eds.), *The ecology of seeds* (pp. 97-110). Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Feng, S., Martínez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L-M. y Deng X.W. (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451: 475-479.

Feurtado, J.A. y Kermode, A.R. (2007) A merging of paths: abscisic acid and hormonal cross-talk in the control of seed dormancy maintenance and alleviation. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 176-223). Oxford: Blackwell Publishing.

Feurtado, J.A., Yang, J., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Abrams, S.R. y Kermode, A.R. (2007) Disrupting abscisic acid homeostasis in western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D. Don) seeds induces dormancy termination and changes in abscisic acid catabolites. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 46-54.

- Finch-Savage, W.E. y Leubner-Metzger, G. (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-523.
- Finch-Savage, W.E., Cadman, C.S., Toorop, P.E., Lynn, J.R. y 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 directly by environment specific sensing. *The Plant Journal* 51: 60-78.
- Finch-Savage, W.E., & Bassel, G.W. (2015) Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *Journal of Experimental Botany* 10.1093/jxb/erv490.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S. y Rock, C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14: S15-S45.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T. y Steber, C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology* 59: 387.
- Finkelstein, R.R. (2010) The role of hormones during seed development and germination. En Davies, P.J. (Ed.) *Plant Hormones* (pp. 549-573). Holanda: Springer.
- Finkelstein, R. (2013) Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 11: e0166.
- Fleet, C.M. y Williams, M.E. (2011) Gibberellins. Teaching Tools in Plant Biology: Lecture Notes. *The Plant Cell*. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H. y Finch-Savage, W.E. (2011) Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 108: 20236-20241.
- Footitt, S., Huang, Z., Clay, H.A., Mead, A. y Finch-Savage, W.E. (2013) Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *The Plant Journal* 74: 1003-1015.
- Fraser, P.D., Enfissi, E.M. y Bramley, P.M. (2009) Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 196-204.
- Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B. y Marion-Poll, A. (1999) Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Molecular Biology* 39: 1267-1274.
- Frey, A., Godin, B., Bonet, M., Sotta, B. y Marion-Poll, A. (2004) Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218: 958-964.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H.M. y Marion-Poll, A. (2012) Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal* 70: 501-512.
- Friedman, W.E. y Ryderson, K.C. (2009) Reconstructing the ancestral female gametophyte of angiosperms: insights from *Amborella* and other ancient lines of flowering plants. *American Journal of Botany* 96: 129-143.
- Fu, Q., Wang, B.C., Jin, X., Li, H.B., Han, P., Wel, K., Zhang, X. y Zhy, X.Y. (2005) Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38: 650-660.
- Gabriele, S., Rizza, A., Martone, J., Circelli, P., Costantino, P. y Vittorioso, P. (2010) The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1*. *The Plant Journal* 61: 312-323.
- Gallardo, M., del Mar Delgado, M., Sánchez-Calle, I.M. y Matilla, A.J. (1991) Ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid conjugation in thermoinhibited *Cicer arietinum* L. seeds. *Plant Physiology* 97: 122-127.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E.G., Marín, J.A., Prat, S., Blázquez, M.A. y Alabadí, D. (2010) Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1247-1256.
- Gao, F., Jordan, M.C. y Ayele, B.T. (2012) Transcriptional programs regulating seed dormancy and its release by after-ripening in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal* 10: 465-476.
- Gao, F. y Ayele, B.T. (2014) Functional genomics of seed dormancy in wheat: advances and prospects. *Frontiers in Plant Science* 5: 458.
- Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M. y McCourt, P. (2004) The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell* 7: 373-385.
- Gazzarrini, S. y Tsai, A.Y.L. (2015) Hormone cross-talk during seed germination. *Essays in Biochemistry* 58: 151-164.
- Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold, R. y Corbineau, F. (2008) Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *Journal of Experimental Botany* 59: 203-212.
- Gerjets, T., Scholefield, D., Foulkes, M.J., Lenton, J.R. y Holdsworth, M.J. (2010) An analysis of dormancy, ABA responsiveness, after-ripening and pre-harvest sprouting in

hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) caryopses. *Journal of Experimental Botany* 61: 597-607.

Gibbs, D.J., Bacardit, J., Bachmair, A. y Holdsworth, M.J. (2014) The eukaryotic N-end rule pathway: conserved mechanisms and diverse functions. *Trends in cell biology* 24: 603-611.

Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. y Goodman, H.M. (1992) Isolation of the *Arabidopsis* *Abi3* gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.

Gonai, T., Kawahara, S., Tougou, M., Satoh, S., Hashiba, T., Hirai, N., Kawaide, H., Kamiya, Y. y Yoshioka, T. (2004) Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellin. *Journal of Experimental Botany* 55: 111-118.

Gong, X., Bassel, G.W., Wang, A., Greenwood, J.S. y Bewley, J.D. (2005) The emergence of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- β -mannanase activity. *Annals of Botany* 96: 1165-1173.

Gong, X. y Bewley, J.D. (2007) Sorting out the LeMAN: endo- β -mannanase genes and their encoded proteins in tomato. *Seed Science Research* 17: 143-154.

González-Calle, V., Barrero-Sicilia, C., Carbonero, P. e Iglesias-Fernández, R. (2015) Mannans and endo- β -mananases (MAN) in *Brachypodium distachyon*: expression profiling and possible role of the *BdMAN* genes during coleorhiza-limited seed germination. *Journal of Experimental Botany* 66: 3753-3764.

Graeber, K., Linkies, A., Müller, K., Wunchova, A., Rott, A. y 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 Molecular Biology* 73: 67-87.

Graeber, K., Linkies, A., Wood, A.T. y Leubner-Metzger, G. (2011) A guideline to family-wide comparative state-of-the-art quantitative RT-PCR analysis exemplified with a Brassicaceae cross-species seed germination case study. *The Plant Cell* 23: 2045-2063.

Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. y Soppe, W.J.J. (2012) Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment* 35: 1769-1786.

Graeber, K., Voegelé, A., Büttner-Mainik, A., Sperber, K., Mummenhoff, K. y Leubner-Metzger, G. (2013) Spatiotemporal seed development analysis provides insight into primary dormancy induction and evolution of the *Lepidium* *Delay of Germination1* genes. *Plant physiology* 161: 1903-1917.

Graeber, K., Linkies, A., Steinbrecher, T., Mummenhoff, K., Tarkowská, D., Turečková, V., Ignatz, M., Sperber, K., Voegelé, A., Jong, H., Urbanová, T., Strnad, M. y Leubner-Metzger, G. (2014) DELAY OF GERMINATION 1 mediates a conserved coat-dormancy mechanism

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

for the temperature-and gibberellin-dependent control of seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 111: E3571-E3580.

Grappin, P., Bouinot, D., Sotta, B., Miginiac, E. y Jullien, M. (2000) Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition ABA synthesis imposes dormancy maintenance. *Planta* 210: 279-285.

Greenwood, J.S., Helm, M. y Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 102: 2238-2243.

Griffiths, J., Barrero, J.M., Taylor, J., Heliwell, C.A. y Gubler, F. (2011) ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PLoS One* 6: e20408-e20408.

Groos, C., Gay, G., Perretant, M.R., Gervais, L., Bernard, M., Dedryver, F. y Charmet, G. (2002) Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a whitexred grain bread-wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 39-47.

Gualberti, G., Papi, M., Bellucci, L., Ricci, I., Bouchez, D., Camilleri, C., Constantino, P. y 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. y Jacobsen, J.V. (2005) Dormancy release, ABA and pre-harvest sprouting. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 183-187.

Gubler, F., Hughes, T., Waterhouse, P., y Jacobsen, J. (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. *Plant Physiology* 147: 886-896.

Gunawardena, A.H..A.N., Pearce, D.M., Jackson, M.B., Hawes, C.R. y Evans, D.E. (2001) Rapid changes in cell wall pectic polysaccharides are closely associated with early stages of aerenchyma formation, a spatially localized form of programmed cell death in roots of maize (*Zea mays* L.) promoted by ethylene. *Plant, Cell & Environment* 24: 1369-1375.

Gutierrez, L., Van Wuytswinkel, O., Castelain, M. y Bellini, C. (2007) Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* 12: 294-300.

Hand, S.C., Menze, M.A., Toner, M., Boswell, L. y Moore, D. (2011) LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Annual Review of Physiology* 73: 115-134.

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

- Hauster, F., Waadt, R. y Schroeder, J.I. (2011) Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Current Biology* 21: R346-R355.
- Hauvermale, A.L., Ariizumi, T. y Steber, C.M. (2012) Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiology* 160: 83-92.
- Hauvermale, A.L., Tuttle, K.M., Takebayashi, Y., Seo, M. y Steber, C.M. (2015) Loss of *Arabidopsis thaliana* seed dormancy is associated with increased accumulation of the GID1 GA hormone receptors. *Plant and Cell Physiology* 56: 1773-1785.
- Hedden, P. y Thomas, S.G. (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochemical Journal* 444: 11-25.
- Hermann, K., Meinhard, J., Dobrev, P., Linkies, A., Pesek, B., Heß, B., Machackova, I., Fischer, U. y Leubner-Metzger, G. (2007) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): a comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany* 58: 3047-3060.
- Hilhorst, H.W.M., Smitt, A.I. y Karssen, C.M. (1986) Gibberellin-biosynthesis and-sensitivity mediated stimulation of seed germination of *Sisymbrium officinale* by red light and nitrate. *Physiologia Plantarum* 67: 285-290.
- Hilhorst, H.W. (1990) Dose-response analysis of factors involved in germination and secondary dormancy of seeds of *Sisymbrium officinale* II. Nitrate. *Plant Physiology* 94: 1096-1102.
- Hilhorst, H.W. y Toorop, P.E. (1997) Review on dormancy, germinability and germination in crop and weed seeds. *Advances in Agronomy* 61: 112-165.
- Hilhorst, H.W.M. (2007) Definitions and hypotheses of seed dormancy. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 50-71). Oxford: Blackwell Publishing.
- Hilhorst, H.W., Finch-Savage, W.E., Buitink, J., Bolingue, W. y Leubner-Metzger, G. (2010) Dormancy in plant seeds. En Lubzens, E., Cerda, J., y Clark, M. (Eds.) *Dormancy and resistance in harsh environments. Topics in current genetics, vol. 21* (pp. 43-67). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hincha, D.K. y Thalhammer, A. (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration tolerance. *Biochemical Society Transactions* 40: 1000-1003.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L. y Soppe, W.J.J. (2008a) Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33-54.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Holdsworth, M.J., Finch-Savage, W.E., Grappin, P. y Job, D. (2008b) Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends in Plant Science* 13: 7-13.

Holman, T.J., Jones, P.D., Russell, L., Medhurst, A., Tomás, S.Ú., Talloji, P., Márquez, J., Schmutz, H., Tung, S.A., Taylor, I., Footitt, S., Bachmair, A. Theodoulou, F.L. y Holdsworth, M.J. (2009) The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 4549-4554.

Howell, K.A., Narsai, R., Carroll, A., Ivanova, A., Lohse, M., Usadel, B., Millar, H. y Whelan, J. (2009) Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiology* 149: 961-980.

Howitt, C.A. y Pogson, B.J. (2006) Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell & Environment* 29: 435-445.

Huang, Z., Boubriak, I., Osborne, D.J., Dong, M. y Gutterman, Y. (2008) Possible role of pectin-containing mucilage and dew in repairing embryo DNA of seeds adapted to desert conditions. *Annals of Botany* 101: 277-283.

Huang, X., Schmitt, J., Dorn, L., Griffith, C., Effgen, S., Takao, S., Koornneef, M. y Donohue, K. (2010) The earliest stages of adaptation in an experimental plant population: strong selection on QTLs for seed dormancy. *Molecular Ecology* 19: 1335-1351.

Hubbard, K.E., Nishimura, N., Hitomi, K., Getzoff, E.D. y Schroeder, J.I. (2011) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development* 24: 1695-1708.

Iglesias-Fernández, R., Matilla, A.J., Pulgar, I. y de la Torre, F. (2007) Ripe fruits of *Sisymbrium officinale* L. contain heterogeneous endospermic seeds with different germination rates. *Seed Science and Biotechnology* 1: 18-24.

Iglesias Fernández, R. (2009) El *cross-talk* etileno-giberelinas y la rotura de la dormición de semillas de *Sisymbrium officinale* L. provocada por el after-ripening. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.

Iglesias-Fernández, R. y Matilla, A.J. (2009) After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 60: 1645-1661.

Iglesias-Fernández, R. y Matilla, A.J. (2010) Genes involved in ethylene and gibberellins metabolism are required for endosperm-limited germination of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *Planta* 231: 653-664.

Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M.C., Barrero-Sicilia, C., Carbonero, P. y Matilla, A.J. (2011b) Three endo- β -mannanase genes expressed in the micropilar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Planta* 233: 25-36.

Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M.C., Barrero-Sicilia, C., Carbonero, P. y Matilla, A. (2011c) Molecular analysis of endo- β -mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling and Behavior* 6: 80-82.

Iglesias-Fernández, R., Rodríguez-Gacio, M.C. y Matilla A.J. (2011a) Progress in research on dry afterripening. *Seed Science Research* 21: 69-80.

Iglesias-Fernández, R., Barrero-Sicilia, C., Carrillo-Barral, N., Oñate-Sánchez, L. y Carbonero, P. (2013) *Arabidopsis thaliana* bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene *AtMAN7*. *The Plant Journal* 74: 767-780.

Ingram, G.C. (2010) Family life at close quarters: communication and constraint in angiosperm seed development. *Protoplasma* 247: 195-214.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 27: 325-333.

Izumi, Y., Okazawa, A., Bamba, T., Kobayashi, A. y Fukusaki, E. (2009) Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography–electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 648: 215-225.

Jacobsen, J.V., Pearce, D.W., Poole, A.T., Pharis, R.P. y Mander, L.N. (2002) Abscisic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. *Physiologia Plantarum* 115: 428-441.

Jacobsen, J.V., Barrero, J.M., Hughes, T., Julkowska, M., Taylor, J.M., Xu, Q. y Gubler, F. (2013) Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *Planta* 238: 121-138.

Jadhav, A.S., Taylor, D.C., Giblin, M., Ferrie, A.M., Ambrose, S.J., Ross, A.R., Ken, M., Nelson, L., Zaharia, I., Sarma, N., Anderson, M., Fobert, P.R. y Abrams, S.R. (2008) Hormonal regulation of oil accumulation in *Brassica* seeds: metabolism and biological activity of ABA, 7'-, 8'-and 9'-hydroxy ABA in microspore derived embryos of *B. napus*. *Phytochemistry* 69: 2678-2688.

Jarvis, S.B., Taylor, M.A., Bianco, J., Corbineau, F. y Davies, H.V. (1997) Dormancy-breakage in seeds of Douglas fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco]. Support for the

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

hypothesis that LEA gene expression is essential for this process. *Journal of Plant Physiology* 151: 457-464.

Jia, H.F., Chai, Y.M., Li, C.L., Lu, D., Luo, J.J., Qin, L. y Shen, Y.Y. (2011) Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *Plant Physiology* 157: 188-199.

Jiang, S., Kumar, S., Eu, Y.J., Jami, S.K., Stasolla, C. y Hill, R.D. (2012) The *Arabidopsis* mutant, *fy-1*, has an ABA-insensitive germination phenotype. *Journal of Experimental Botany* 63: 2693-2703.

Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M. y Job, D. (2005) Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiology* 138: 790-802.

Joosen, R.V., Kodde, J., Willems, L.A., Ligterink, W., van der Plas, L.H. y Hilhorst, H.W. (2010) GERMINATOR: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal* 62: 148-159.

Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E. y Lee, Y. (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of sciences, U.S.A.* 107: 2355-2360.

Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., López-Molina, L., Martinoia, E. y Lee, Y. (2015) Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nature Communications* 6: 8113.

Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S.R., Kamiya, Y. y Seo, M. (2010) Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant and Cell Physiology* 51: 1988-2001.

Kawakatsu, T., Taramino, G., Itoh, J.I., Allen, J., Sato, Y., Hong, S.K., Yule, R., Nagasawa, N., Kojima, M., Kubasa, M., Sakakibara, H., Saki, H. y Nagato, Y. (2009) *PLASTOCHRON3/GOLIATH* encodes a glutamate carboxypeptidase required for proper development in rice. *The Plant Journal* 58: 1028-1040.

Kendall, S.L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I.A. y 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: 2568-2580.

Kermode, A.R. (2005) Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 319-344.

Kim, D.H., Yamaguchi, S., Lim, S., Oh, E., Park, J., Hanada, A., Kamiya, Y. y Choi, G. (2008) SOMNUS, a CCCH-Type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *The Plant Cell* 20: 1260-1277.

Kim, J., Smith, J.J., Tian, L. y DellaPenna, D. (2009) The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 50: 463-479.

Kitahata, N., Saito, S., Miyazawa, Y., Umezawa, T., Shimada, Y., Min, Y.K., Mizutani, M., Hirai, N., Shinozaki, K., Yoshida, S. y Asami, T. (2005) Chemical regulation of abscisic acid catabolism in plants by cytochrome P450 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13: 4491-4498.

Koizumi, M., Kikuchi, K., Isobe, S., Ishida, N., Naito, S. y Kano, H. (2008) Role of seed coat in imbibing soybean seeds observed by micro-magnetic resonance imaging. *Annals of Botany* 102: 343-352.

Kojima, M., Kamada-Nobusada, T., Komatsu, H., Takei, K., Kuroha, T., Mizutani, M., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Suzuki, K. y Sakakibara, H. (2009) Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry: an application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant and Cell Physiology* 50: 1201-1214.

Koornneef, M., Bentsink, L. y Hilhorst, H. (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 33-36.

Kronholm, I., Picó, F.X., Alonso-Blanco, C., Goudet, J., y Meaux, J.D. (2012) Genetic basis of adaptation in *Arabidopsis thaliana*: local adaptation at the seed dormancy QTL *DOG1*. *Evolution* 66: 2287-2302.

Kucera, B., Cohn, M.A. y Leubner-Metzger, G. (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.

Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y. y Shinozaki, K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 107: 2361-2366.

Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., Hirai, N., Koshiba, T., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2004) The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *The EMBO Journal* 23: 1647-1656.

Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., Krämer, U., Barbier-Brygoo, H. y Thomine, S. (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO Journal* 24: 4041-4051.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Lara, P., Oñate-Sanchez, L., Abraham, Z., Ferrandiz, C., Diaz, I., Carbonero, P. y Vicente-Carbajosa, J. (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry* 278: 21003-21011.

Laserna, M.P., Sánchez, R. A., y Botto, J. F. (2008) Light-related loci controlling seed germination in Ler× Cvi and Bay-0× Sha recombinant inbred-line populations of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 102: 631-642.

Le, B.H., Cheng, C., Bui, A.Q., Wagmaister, J.A., Henry, K.F., Pelletier, J., Kwong, L., Belmonte, M., Kirkbridge, R., Horvath, S., Drews, G.N., Fischer, R.L., Okamoto, J.K., Harada, J.J. y Goldberg, R.B. (2010) Global analysis of gene activity during *Arabidopsis* seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 107: 8063-8070.

Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P. y 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: 646-658.

Lee, K.P., Piskurewicz, U., Turečová, V., Strand, M. y 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, U.S.A.* 107: 19108-19113.

Lee, K.J., Dekkers, B.J., Steinbrecher, T., Walsh, C.T., Bacic, A., Bentsink, L., Leubner-Metzger, G. y Knox, J.P. (2012) Distinct cell wall architectures in seed endosperms in representatives of the Brassicaceae and Solanaceae. *Plant Physiology* 160: 1551-1566.

Lee, W.L., Huang, J.Z., Chen, L.C., Tsai, C.C. y Chen, F.C. (2013) Developmental and LED light source modulation of carotenogenic gene expression in *Oncidium* Gower Ramsey flowers. *Plant Molecular Biology Reporter* 31: 1433-1445.

Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E. y 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* 45: 309-319.

Leon-Kloosterziel, K.M., Keijzer, C.J. y Koornneef, M. (1994) A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *The Plant Cell* 6: 385-392.

Leprince, O. y Buitink, J. (2010) Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Science* 179: 554-564.

- 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: 959-968.
- 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. (2005) β -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal* 41: 133-145.
- Leymarie, J., Bruneaux, E., Gibot-Leclerc, S. y Corbineau, F. (2007) Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *Journal of Experimental Botany* 58: 425-437.
- Leymarie, J., Robayo-Romero, M.E., Gendreau, E., Benech-Arnold, R.L. y Corbineau, F. (2008) Involvement of ABA in induction of secondary dormancy in barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant and Cell Physiology* 49: 1830-1838.
- Leymarie, J., Vitkauskaitė, G., Hoang, H.H., Gendreau, E., Chazoule, V., Meimoun, P., Corbineau, F., El-Maarouf-Bouteau, H. y Baily, C. (2012) Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant and Cell Physiology* 53: 96-106.
- Lim, E.K., Doucet, C.J., Hou, B., Jackson, R.G., Abrams, S.R. y Bowles, D.J. (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. *Tetrahedron: Asymmetry* 16: 143-147.
- Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., Kin, J., Kang, H., Kim, D.H., Kawakami, N. y 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* 25: 4863-4878.
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Cadman, C.S.C., Corbineau, F., Strnad, M., Lynn, J.R., Finch-Savage, W.E. y 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.
- Linkies, A., Graeber, K., Knight, C. y Leubner-Metzger, G. (2010) The evolution of seeds. *New Phytologist* 186: 817-831.
- Linkies, A. y Leubner-Metzger, G. (2012) Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 31: 253-270.
- Liu, A., Gao, F., Kanno, Y., Jordan, M.C., Kamiya, Y., Seo, M. y Ayele, B.T. (2013) Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS One* 8: e56570.

Liu, H.Y., Yu, X., Cui, D.Y., Sun, M.H., Sun, W.N., Tang, Z.C., Kwak, S.S. y Su, W.A. (2007) The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* 17: 638-649.

Liu, P.P., Koizuka, N., Homrichhausen, T.M., Hewitt, J.R., Martin, R.C. y Nonogaki, H. (2005) Large-scale screening of *Arabidopsis* enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *The Plant Journal* 41: 936-944.

Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H.Q., Luan, S., Li, J. y He, Z.H. (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, U.S.A.* 110: 15485-15490.

Liu, Y., Shi, L., Ye, N., Liu, R., Jia, W. y Zhang, J. (2009) Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 183: 1030-1042.

Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M. y Zhang, J. (2010) H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 2979-2990.

Liu, Y., Müller, K., El-Kassaby, Y.A. y Kermode, A.R. (2015) Changes in hormone flux and signaling in white spruce (*Picea glauca*) seeds during the transition from dormancy to germination in response to temperature cues. *BMC Plant Biology* 15: 1.

López-Molina, L., Mongrand, S. y 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, U.S.A.* 98: 4782-4787.

López-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T. y Chua, N.H. (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *The Plant Journal* 32: 317-328.

Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A.L., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. y Harada, J.J. (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.

Luerssen, K., Kirik, V., Herrmann, P. y Misera, S. (1998) *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 15: 755-764.

- Luzuriaga, A.L., Escudero, A. y Pérez-García, F. (2006) Environmental maternal effects on seed morphology and germination in *Sinapis arvensis* (Cruciferae). *Weed Research* 46: 163-174.
- Manz, B., Müller, K., Kucera, B., Volke, F. y Leubner-Metzger, G. (2005) Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated *in vivo* by nuclear magnetic resonance imaging. *Plant Physiology* 138: 1538-1551.
- Marchler-Bauer, A. y Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* 32: W327-W331.
- Martínez-Andújar, C., Ordiz, M.I., Huang, Z., Nonogaki, M., Beachy, R.N. y Nonogaki, H. (2011) Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 108: 17225-17229.
- Martínez-Andújar, C., Martín, R.C. y Nonogaki, H. (2012) Seed traits and genes important for translational biology-highlights from recent discoveries. *Plant and Cell Physiology* 53: 5-15.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J. P., Kamiya, Y., Nambara, E. y Truong, H. N. (2009) The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology* 149: 949-960.
- Matilla, A.J., Gallardo, M. y Puga-Hermida, M.I. (2005) Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Science Research* 15: 63-76.
- Matilla, A.J. (2008) Desarrollo y germinación de las semillas. En Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (Eds.) *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 537-558). Madrid: McGraw-Hill/Inteamericana.
- Matilla, A.J. y Matilla-Vázquez, M.A. (2008) Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science* 175: 87-97.
- Matilla-Vázquez, M.A. y Matilla, A.J. (2012) Role of H₂O₂ as signaling molecule in plants. En Ahmad, P. y Prasad, M.N.V. (Eds.) *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (pp. 361-380). New York: Springer.
- Matilla, A.J., Carrillo-Barral, N. y Rodríguez-Gacio, M.C. (2015) An update on the role of *NCED* and *CYP707A* ABA metabolism genes in seed dormancy induction and the response to after-ripening and nitrate. *Journal of Plant Growth and Regulation* 34: 274-293.
- McCarty, D.R. (1995) Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. *Annual Review of Plant Biology* 46: 71-93.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Meimoun, P., Mordret, E., Langlade, N.B., Belzergue, S., Arribat, S. y Bailly C. (2014) Is gene transcription involved in seed after-ripening? *PLoS ONE* 9: e86442.
- Messing, S.A., Gabelli, S.B., Echeverria, I., Vogel, J.T., Guan, J.C., Tan, B.C., Klee, H.J., McCarty, D.R. y Amzel, L.M. (2010) Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *The Plant Cell* 22: 2970-2980.
- Miatton, E. (2012) Characterization of PDF1 and its interaction with DELAY OF GERMINATION1 (DOG1) in the control of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. Universidad de Colonia, Colonia, Alemania.
- Millar, A.A., Jacobsen, J.V., Ross, J.J., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Scofield, G., Reid, J.B. y Gubler, F. (2006) Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *The Plant Journal* 45: 942-954.
- Miransari, M. y Smith, D.L. (2014) Plant hormones and seed germination. *Environmental Experimental Botany* 99: 110-12.
- Morris, C.F., Moffatt, J.M., Sears, R.G. y Paulsen, G.M. (1989) Seed dormancy and responses of caryopses, embryos, and calli to abscisic acid in wheat. *Plant Physiology* 90: 643-647.
- Morris, K., Linkies, A., Müller, K., Oracz, K., Wang, X., Lynn, J.R., Leubner-Metzger, G. y Finch-Savage, W.E. (2011) Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: a global tissue specific transcript analysis. *Plant Physiology* 155: 1851-1870.
- Müller, A., Düchting, P. y Weiler, E.W. (2002) A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 44-56.
- Müller, K., Tintelnot, S. y 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 and Cell Physiology* 47: 864-877.
- Müller, B. y Sheen, J. (2008) Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453: 1094-1097.
- Müller, K., Carstens, A.C., Linkies, A., Torres, M.A. y Leubner-Metzger, G. (2009) The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytologist* 184: 885-897.
- Murai, N. (2014) Plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. *American Journal of Plant Sciences* 5: 2178-2187.

- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T.P. y Hakoshima, T. (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456: 459-463.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2005) Genome-wide profiling of stored *mRNA* in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal* 41: 697-703.
- Nakabayashi, K., Bartsch, M., Xiang, Y., Miatton, E., Pellengahr, S., Yano, R., Seo, M. y Soppe, W.J. (2012) The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by DELAY OF GERMINATION 1 protein levels in freshly harvested seeds. *Plant Cell* 24: 2826-2838.
- Nakabayashi, K., Bartsch, M., Ding, J. y Soppe, W.J.J. (2015) Seed dormancy in *Arabidopsis* requires self-binding ability of DOG1 protein and the presence of multiple isoforms generated by alternative splicing. *PLOS Genetics* 11: 10.1371/journal.pgen.1005737.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., Maeda, T., Matsuoka, M. y Yamaguchi, I. (2006) Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889.
- Nakamura, S., Lynch, T.J. y Finkelstein, R.R. (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 26: 627-635.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56: 165-185.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M. y Kamiya, Y. (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Science Research* 20: 55-67.
- Née, G., Obeng-Hinne, E., Sarvari, P., Nakabayashi, K. y Soppe, W.J. (2015) Secondary dormancy in *Brassica napus* is correlated with enhanced *BnaDOG1* transcript levels. *Seed Science Research* 25: 221-229.
- Nguyen, T.P., Keizer, P., van Eeuwijk, F., Smeekens, S. y Bentsink, L. (2012) Natural variation for seed longevity and seed dormancy are negatively correlated in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 160: 2083-2092.
- Nitsch, L.M.C., Oplaat, C., Feron, R., Ma, Q., Wolters-Arts, M., Hedden, P., Mariani, C. y Vriezen, W.H. (2009) Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SlCYP707A1*. *Planta* 229: 1335-1346.
- Nonogaki, H. (2006) Seed germination - The biochemical and molecular mechanisms. *Breeding Science* 56: 93-105.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Nonogaki, H., Chen, F. y Bradford, K.J. (2007) Mechanisms and genes involved in germination in *sensu stricto*. En Bradford, K. y Nonogaki, H. (Eds), *Seed development, dormancy and germination* (pp. 264-304). Oxford: Blackwell Publishing.
- Nonogaki, H., Bassel, G.W. y Bewley, J.D. (2010) Germination—Still a mystery. *Plant Science* 179: 574-581.
- Nonogaki, H. (2014) Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science* 5: 233.
- North, H.M., Almeida, A.D., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B y Marion-Poll, A. (2007) The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *The Plant Journal* 50: 810-824.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S. (2003) Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Cell* 15: 1591-1604.
- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., Collet, B., Godin, B., Granier, F., Boutin, J.P., Job, D., Jullien, M. y Grappin, P. (2008) Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3022-3037.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.I. y Choi, G. (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 47, 124-139.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.S., Sun, T.P., Kamiya, Y. 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. *Plant Cell* 19: 1192-1208.
- Oh, E., Kang, H., Yamaguchi, S., Park, J., Lee, D., Kamiya, Y. y Choi, G. (2009) Genome-Wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 during seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 403-419.
- Ohmiya, A. (2013) Qualitative and quantitative control of carotenoid accumulation in flower petals. *Scientia Horticulturae* 163: 10-19.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., Kamiya, Y., Koshiba, T. y Nambara, E. (2006) *CYP707A1* and *CYP707A2*, which encode ABA 8'-hydroxylases, are indispensable for a proper control of seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 141: 97-107.

- Okamoto, M., Kushiro, T., Jikumaru, Y., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seki, M. y Nambara, E. (2011) ABA 9'-hydroxylation is catalyzed by CYP707A in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 72: 717-722.
- Olsen, A.D. (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S27.
- Oracz, K., El-Maarouf Bouteau, H., Farrant, J.M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, D., Corbineau, F. y Bailly, C. (2007) ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal* 50: 452-465.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. y Bailly, C. (2009) The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150: 494-505.
- Pan, X., Welti, R. y Wang, X. (2008) Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* 69: 1773-1781.
- Papi, M., Sabatini, S., Altamura, M.M., Hennig, L., Schäfer, E., Costantino, P. y Vittorioso, P. (2002) Inactivation of the phloem-specific Dof Zinc finger Gene *DAG1* affects response to light and integrity of the testa of *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 128: 411-417.
- Parcy, F., Valon, C., Kohara, A., Miséra, S. y Giraudat, J. (1997) The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *The Plant Cell* 9: 1265-1277.
- Park, J., Lee, N., Kim, W., Lim, S. y 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: 1404-1415.
- Penfield, S., Josse, E.M., Kannangara, R., Gilday, A.D., Halliday, K.J. y Graham, I.A. (2005) Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Current Biology* 15: 1998-2006.
- Penfield, S., Gilday, A.D., Halliday, K.J. y Graham, I.A. (2006a) DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Current Biology* 16: 2366-2370.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A.D., Graham, S. y Graham, I.A. (2006b) *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* 18: 1887-1899.
- Penfield, S. y King, J. (2009) Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276: 3561-3569.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Penfield, S. y King, J. (2010) Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 3561-3569.

Penfield, S. y Springthorpe, V. (2012) Understanding chilling responses in *Arabidopsis* seeds and their contribution to life history. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 291-297.

Petruzzelli, L., Müller, K., Hermann, K. y Leubner-Metzger, G. (2003) Distinct expression patterns of β -1, 3-glucanases and chitinases during the germination of *Solanaceous* seeds. *Seed Science Research* 13: 139-153.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007.

Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y. y Lopez-Molina, L. (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20: 2729-2745.

Piskurewicz, U., Turečková, V., Lacombe, E., y López-Molina, L. (2009) Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *The EMBO Journal* 28: 2259-2271.

Preston, J., Tatematsu, K., Kano, Y., Hobo, T., Kimura M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2009) Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant and Cell Physiology* 50: 1786-1800.

Priya, R. y Siva, R. (2015) Analysis of phylogenetic and functional diverge in plant nine-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Journal of Plant Research* 128: 519-534.

Puga-Hermida, M.I., Gallardo, M. y Matilla, A.J. (2003) The zygotic embryogenesis and ripening of *Brassica rapa* seeds provokes important alterations in the levels of free and conjugated abscisic acid and polyamines. *Physiologia Plantarum* 117: 279-288.

Queiroz, S.E.E., da Silva, E.A.A., Davide, A.C., José, A.C., Silva, A.T., Fraiz, A.C.R., Faria, J.M.R. y Hilhorst, H.W. (2012) Mechanism and control of *Genipa americana* seed germination. *Physiologia Plantarum* 144: 263-276.

Qin, X. y Zeevaart, J.A. (2002) Overexpression of a 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiology* 128: 544-551.

Raghavendra, A.S., Gonugunta, V.K., Christmann, A. y Grill, E. (2010) ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15: 395-401.

- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C. y Job, D. (2004) The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiology* 134: 1598-1613.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C. y Job, D. (2012) Seed germination and vigor. *Annual Review of Plant Biology* 63: 507-533.
- Raz, V., Bergervoet, J.H.W. y Koornneef, M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.
- Remans, T., Keunen, E., Bex, G.J., Smeets, K., Vangronsveld, J. y Cuypers, A. (2014) Reliable gene expression analysis by reverse transcription-quantitative PCR: reporting and minimizing the uncertainty in data accuracy. *The Plant Cell* 26: 3829-3837.
- Rodríguez-Gacio, M.C., Nicolás, C. y Matilla, A.J. (2004) The final step of the ethylene biosynthesis pathway in turnip tops (*Brassica rapa*): molecular characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase BrACO1 throughout zygotic embryogenesis and germination of heterogeneous seeds. *Physiologia Plantarum* 121: 132-140.
- Rodríguez-Gacio, M.C., Matilla-Vázquez, M.A. y Matilla, A.J. (2009) Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behaviour* 4: 1035-1049.
- Rodríguez-Gacio, M.C., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P. y Matilla, A.J. (2012) Softening-up mannan-rich cell walls. *Journal of Experimental Botany* 63: 3976-3988.
- Ross, A.R., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Feurtado, J.A., Kermode, A.R., Nelson, K., Zhou, R. y Abrams, S.R. (2004) Determination of endogenous and supplied deuterated abscisic acid in plant tissues by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical Biochemistry* 329: 324-333.
- Ruiz-Sola, M.Á. y Rodríguez-Concepción, M. (2012) Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 10: e0158.
- Saika, H., Okamoto, M., Miyoshi, K., Kushiro, T., Shinoda, S., Jikumaru, Y., Fujimoto, M., Arikawa, T., Takahashi, H., Ando, M., Arimura, S.I., Miyao, A., Hirochika, H., Kamiya, Y., Tsutsumi, N., Nambara, E. y Nakazono, M. (2007) Ethylene promotes submergence-induced expression of *OsABA8ox1*, a gene that encodes ABA 8'-hydroxylase in rice. *Plant and Cell Physiology* 48: 287-298.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K. y Mizutani, M. (2004) *Arabidopsis CYP707As* encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology* 134: 1439-1449.
- Sampedro, J., Sieiro, C., Revilla, G., González-Villa, T. y Zarra, I. (2001) Cloning and expression pattern of a gene encoding an α -xylosidase active against xyloglucan oligosaccharides from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 910-920.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Sánchez, M., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J. y Vázquez-Ramos, J.M. (2005) Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany* 56: 515-523.

Sandmann, G. (2009) Evolution of carotene desaturation: the complication of a simple pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 483: 169-174.

Schwartz, S.H., Qin, X. y Zeevaart, J.A. (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601.

Schwechheimer, C. y Willige, B.C. (2009) Shedding light on gibberellic acid signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 57-62.

Seiler, C., Harshavardhan, V.T., Rajesh, K., Reddy, P.S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U. y Sreenivasulu, N. (2011) ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 62: 2615-2632.

Seo, M., Peeters, A.J., Koiwai, H., Oritani, T., Marion-Poll, A., Zeevaart, J.A., Koornneef, M., Kamiya, Y. y Koshiba, T. (2000) The *Arabidopsis* aldehyde oxidase 3 (*AAO3*) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 97: 12908-12913.

Seo, M., Hanada, A., Kuwahara, A., Endo, A., Okamoto, M., Yamauchi, Y., North, H., Marion-Poll, A., Sun, T.P., Koshiba, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S. y Nambara, E. (2006) Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* 48: 354-366.

Seo, M., Nambara, E., Choi, G. y Yamaguchi, S. (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* 69: 463-472.

Seo, M. y Koshiba, T. (2011) Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *Journal of Plant Research* 124: 501-507.

Shu, K., Zhang, H., Wang, S., Chen, M., Wu, Y., Tang, S., Liu, C., Feng, Y., Cao, X. y Xie, Q. (2013) ABI4 Regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* 9: e1003577.

Shu, K., Liu, X., Xie, Q. y He, Z. (2015b) Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant* 10.1016/j.molp.2015.08.010.

Shu, K., Meng, Y.J., Shuai, H.W., Liu, W G., Du, J.B., Liu, J. y Yang, W.Y. (2015a) Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biology* 17: 1104-1112.

- Shumskaya, M. y Wurtzel, E.T. (2013) The carotenoid biosynthetic pathway: thinking in all dimensions. *Plant Science* 208: 58-63.
- Slater, S.M.H., Yuan, H.Y., Lulsdorf, M.M., Vandenberg, A., Zaharina, L.I., Han, X. y Abrams, S.R. (2013) Comprehensive hormone profiling of the developing seeds of four grain legumes. *Plant Cell Reports* 30: 1939-1952.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W. y Bewley, J.D. (2009) Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *Journal of Experimental Botany* 60: 3587-3594.
- Sonnewald, S. y Sonnewald, U. (2014) Regulation of potato tuber sprouting. *Planta* 239: 27-38.
- Sreenivasulu, N., Usadel, B., Winter, A., Radchuk, V., Scholz, U., Stein, N., Weschke, W., Strickert, M., Close, T.J., Stitt, M., Graner, A. y Wobus, U. (2008) Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant physiology* 146: 1738-1758.
- Sreenivasulu, N., Radchuk, V., Alawady, A., Borisjuk, L., Weier, D., Staroske, N., Fuchs, J., Miersch, O., Strickert, M., Usadel, B., Wobus, U., Grimm, B., Weber, H. y Weschke, W. (2010) De-regulation of abscisic acid contents causes abnormal endosperm development in the barley mutant *seg8*. *The Plant Journal* 64: 589-603.
- Sreepriya, P., Naganeeswaran, S., Hemalatha, N., Sreejisha, P. y Rajesh, M.K. (2014) A machine learning approach for prediction of gibberellic acid metabolic enzymes in monocotyledonous plants. *Transactions on Machine Learning and Artificial Intelligence* 2: 36-47.
- Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B. y Harada, J.J. (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 98: 11806-11811.
- Sugimoto, K., Takeuchi, Y., Ebana, K., Miyao, A., Hirochika, H., Hara, N., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Ban, Y., Hattori, T. y Yano, M. (2010) Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 107: 5792-5797.
- Sun T. (2008) Gibberellin metabolism, perception and signaling pathways in *Arabidopsis*. En *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 6: e0103.
- Sun, X., Shantharaj, D., Kang, X. y Ni, M. (2010) Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 611-620.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

Sundaresan, V. (2005) Control of seed size in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 102: 17887-17888.

Suttle, J.C., Lulai, E.C., Huckle, L.L. y Neubauer, J.D. (2013) Wounding of potato tubers induces increases in ABA biosynthesis and catabolism and alters expression of ABA metabolic genes. *Journal of Plant Physiology* 170: 560-566.

Suzuki, M., Latshaw, S., Sato, Y., Settles, A.M., Koch, K.E., Curtis, Hannah, L.C., Kojima, M., Sakakibara, H. y 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 Physiology* 146: 1193-1206.

Sweeney, M.T., Thomson, M.J., Pfeil, B.E. y McCouch, S. (2006) Caught red-handed: *Rc* encodes a basic helix-loop-helix protein conditioning red pericarp in rice. *The Plant Cell* 18: 283-294.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. y Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A. y McCarty, D.R. (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 94: 12235-12240.

Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K. y McCarty, D.R. (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal* 35: 44-56.

Teng, S., Rognoni, S., Bentsink, L. y Smeekens, S. (2008) The *Arabidopsis* *GSQ5/DOG1* Cvi allele is induced by the ABA-mediated sugar signalling pathway, and enhances sugar sensitivity by stimulating *ABI4* expression. *The Plant Journal* 55: 372-381.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

To, A., Valon, C., Savino, G., Guillemot, J., Devic, M., Giraudat, J. y Parcy, F. (2006) A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *The Plant Cell* 18: 1642-1651.

Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., Hanada, A., Aso, Y., Ishiyama, K., Tamura, N., Luchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, S., Kamiya, Y.,

- Nambara, E. y Kawakami, N. (2008) High temperature-induced ABA biosynthesis and its role in the inhibition of GA action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* 146: 1368-1385.
- Toh, S., Kamiya, Y., Kawakami, N., Nambara, E., McCourt, P. y Tsuchiya, Y. (2012) Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in *Arabidopsis* seed germination. *Plant and Cell Physiology* 53: 107-117.
- Toorop, P.E. (2015) Nitrate controls testa rupture and water content during release of physiological dormancy in seeds of *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. *Seed Science Research* 25: 138-146.
- Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. y Shinozaki, K. (2006) CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 46: 171-182.
- Vaistij, F.E., Gan, Y.B., Penfield, S., Gilday, A.D., Dave, A., He, Z.S., Josse, E.M., Choi, G., Halliday, K.J. y Graham, I.A. (2013) Differential control of seed primary dormancy in *Arabidopsis* ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 110: 10866-10871.
- Vallabhaneni, R. y Wurtzel, E.T. (2010) From epoxy-carotenoids to ABA: the role of ABA 8'-hydroxylases in drought-stressed maize roots. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504: 112-117.
- van der Willigen, C., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y. y Maurel, C. (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant and Cell Physiology* 47: 1241-1250.
- Ventura, L., Donà, M., Macovei, A., Carbonera, D., Buttafava, A., Mondoni, A., Rossi, G. y Balestrazzi, A. (2012) Understanding the molecular pathways associated with seed vigor. *Plant Physiology and Biochemistry* 60: 196-206.
- Verdier, J. y Thompson, R.D. (2008) Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. *Plant and Cell Physiology* 49: 1263-1271.
- Vicente-Carbajosa, J. y Carbonero, P. (2005) Seed maturation: developing and intrusive phase to accomplish a quiescent state. *International Journal of Developmental Biology* 49: 645-651.
- Vranová, E., Coman, D. y Grussem, W. (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology* 64: 665-700.
- Wada, S., Kennedy, J.A. y Reed, B.M. (2011) Seed-coat anatomy and proanthocyanidins contribute to the dormancy of *Rubus* seed. *Stientia Horticulturae* 130: 762-768.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Walker, K.C. (2004) Non-food uses. En Gunstone, F.D. (Ed.) *Rapeseed and Canola Oil: Production, Processing, Properties and Uses* (pp. 154-185). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y.Q. y Wu, Y. (2011) Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by down-regulating *ABI5* expression. *The Plant Journal* 68: 249-261.
- Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M. y West, C.E. (2010) A plant DNA ligase is important determinant of seed longevity. *The Plant Journal* 63: 848-860.
- Weitbrecht, K., Müller, K. y Leubner-Metzger, G. (2011) First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* 62: 3289-3309.
- Western, T.L., Young, D.S., Dean, G.H., Tan, W.L., Samuels, A.L. y 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 Physiology* 134: 296-306.
- Willis, C.G., Baskin, C.C., Baskin, J.M. Auld, J.R., Venable, D.L., Cavender-Bares, J., Donohue, K. y Rubio de Casas, R. (2014) The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytologist* 203: 300-309.
- Wind, J.J., Peviani, A., Snel, B., Hanson, J. y Smeekens, S.C. (2013) *ABI4*: versatile activator and repressor. *Trends in Plant Science* 18: 125-132.
- Wu, Y. y Hu, B. (2009) Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216: 7657-7663.
- Xi, W. y Yu, H. (2010) *MOTHER OF FT AND TFL1* regulates seed germination and fertility relevant to the brassinosteroid signaling pathway. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1315-1317.
- Xi, D.M. y Zheng, D.M. (2011) Transcriptional regulation of seed storage protein genes in *Arabidopsis* and cereals. *Seed Science Research* 21: 247-254.
- Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M. y Zhu, J.K. (2002) Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277: 8588-8596.
- Xiong, L. y Zhu, J.K. (2003) Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology* 133: 29-36.

- Xu, J. y Chua, N.H. (2009) *Arabidopsis* decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *The Plant Cell* 21: 3270-3279.
- Xu, Z.Y., Lee, K.H., Dong, T., Jeong, J.C., Jin, J.B., Kanno, Y., Kim, D.H., Kim, S.Y., Seo, M., Bressan, R.A., Yun, D.J. y Inhwan, H. (2012) A vacuolar β -glucosidase homolog that possesses glucose-conjugated abscisic acid hydrolyzing activity plays an important role in osmotic stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 2184-2199.
- Xu, Z.Y., Kim, D.H. y Hwang, I. (2013) ABA homeostasis and signaling involving multiple subcellular compartments and multiple receptors. *Plant Cell Reports* 32: 807-813.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C. y Nambara, E. (2014) The functions of the endosperm during seed germination. *Plant and Cell Physiology* 55: 1521-1533.
- Yamagishi, K., Tatematsu, K., Yano, R., Preston, J., Kitamura, S., Takahashi, H., McCourt, P., Kamiya, Y. 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 and Cell Physiology* 50: 330-340.
- Yamaguchi, S. y Kamiya, Y. (2001) Gibberellins and light-stimulated seed germination. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 369-376.
- Yamaguchi, S. y Nambara, E. (2006) Seed development and germination. En Hedden, P. y Thomas, S. (Eds.) *Plant Hormone Signaling* (pp. 331-338). Oxford: Blackwell Publishing.
- Yamaguchi, S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review on Plant Biology* 59: 225-251.
- Yamaguchi, Y., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2007) Regulation of ABA and GA levels during seed development and germination in *Arabidopsis*. En Bradford, K.J. y Nonogaki, H. (Eds.) *Seed development, dormancy and germination* (pp. 224-247). Oxford: Blackwell Publishing.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y. y Yamaguchi, S. (2004) Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *The Plant Cell* 16: 367-378.
- Yang, S.H. y Zeevaart, J.A. (2006) Expression of ABA 8'-hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean. *The Plant Journal* 47: 675-686.
- Yang, Y., Xu, M., Luo, Q., Wang, J. y Li, H. (2014) De novo transcriptome analysis of *Liriodendron chinense* petals and leaves by Illumina sequencing. *Gene* 534: 155-162.
- Yano, R., Kanno, Y., Jikumaru, Y., Nakabayashi, K., Kamiya, Y. y Nambara, E. (2009) CHOTTO1, a putative double APETALA2 repeat transcription factor, is involved in abscisic

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

acid-mediated repression of gibberellin biosynthesis during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 641-654.

Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Li, Y. y Zhang, J. (2011) ABA controls H₂O₂ accumulation through the induction of *OsCATB* in rice leaves under water stress. *Plant and Cell Physiology* 52: 689-698.

Yu, S.M., Lo, S F. y Ho, T.H.D. (2015) Source–sink communication: regulated by hormone, nutrient, and stress cross-signaling. *Trends in Plant Science* 20:844-857.

Zanten, M., Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P. y 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, U.S.A.* 108: 20219-20224.

Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant* 5: 334-338.

Zheng, Y., Huang, Y., Xian, W., Wang, J. y Liao, H. (2012) Identification and expression analysis of the *Glycine max CYP707A* gene family in response to drought and salt stresses. *Annals of Botany* 110: 743-756.

Zhou, Y.M., Lu, J.J., Tan, D.Y., Baskin, C.C. y Baskin, J.M. (2015) Seed germination ecology of the cold desert annual *Isatis vilascens* (*Brassicaceae*): two levels of physiological dormancy and role of the pericarp. *PLOS ONE* 10.1371/journal.pone.0140983.

Zhu, G., Ye, N. y Zhang, J. (2009) Glucose-induced delay of seed germination in rice is mediated by the suppression of ABA catabolism rather than an enhancement of ABA biosynthesis. *Plant and Cell Physiology* 50: 644-651.