

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal
Facultad de Biología



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

Characterization of two PP2Cs-D interactors
during germination and seedling development
of *Arabidopsis thaliana*

PhD Thesis, International Doctorate Mention

Patricia Fresnillo Herrero

July, 2016

D. CARLOS NICOLÁS RODRÍGUEZ, PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN AGROBIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICO:

Que la presente Memoria titulada **Characterization of two PP2Cs-D interactors during germination and seedling development of *Arabidopsis thaliana*** ha sido realizada por la licenciada **D^a Patricia Fresnillo Herrero** en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Drs. D^a M^a Dolores Rodríguez Martín y. D. Óscar Lorenzo Sánchez, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención “Doctorado Internacional”.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a de 15 Junio de 2016.

Fdo: Dr. D. Carlos Nicolás Rodríguez

D^a M^a DOLORES RODRÍGUEZ MARTÍN, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLOGÍA VEGETAL Y **D. OSCAR LORENZO SÁNCHEZ**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLOGÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICAMOS:

Que la presente Memoria titulada **Characterization of two PP2Cs-D interactors during germination and seedling development of *Arabidopsis thaliana*** ha sido realizada por la licenciada **D^a Patricia Fresnillo Herrero** en el Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE) de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca, bajo la dirección de los Drs. **D^a M^a Dolores Rodríguez Martín** y **D. Óscar Lorenzo Sánchez**, y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con Mención “Doctorado Internacional”.

Para que así conste, firmo el presente certificado en Salamanca a 15 de Junio de 2016.

Fdo: Dr. D. Oscar Lorenzo Sánchez Fdo: M^a Dolores Rodríguez Martín

Fdo: Patricia Fresnillo Herrero



Chapter 1 Introducción

El desarrollo de plantas, a diferencia de los animales, es indeterminado: los vegetales crecen de forma continua durante todo su ciclo vital. Cuando el embrión animal se desarrolla, produce todos los órganos que estarán presentes en el adulto, que desde el nacimiento basa el crecimiento en la maduración y aumento de tamaño de estos órganos. En plantas, sin embargo, se producen nuevos tejidos y órganos de manera continua gracias a los meristemos, células madre embrionarias que permanecen en ese estado durante todo el ciclo vegetal y que se localizan en los extremos de los órganos o en medio de tejidos (Bäurle and Laux, 2003).

El crecimiento en plantas comienza en el cigoto, formado tras la fertilización del óvulo por las células espermáticas. En ese momento, el embrión comienza una serie de divisiones pautadas en un proceso llamado **embriogénesis**. En uno de los extremos se desarrollan las células que darán lugar a la futura raíz mientras que en el otro se desarrollará el brote. Además, se desarrollarán los cotiledones, órganos que harán la función de hojas en los momentos posteriores a la germinación.

Una vez se ha completado el desarrollo del embrión y la semilla ha madurado, ésta germinará cuando tanto sus condiciones internas como externas sean las adecuadas. Inicialmente, todos los tejidos desarrollados tienen origen embrionario, pero una vez que la planta se haya establecido desarrollará nuevos tejidos a partir de los meristemos radicular y caulinar en un proceso llamado **organogénesis**: raíces a partir del meristemo radicular situado en la punta de la raíz y nuevos tallos y hojas a partir del meristemo apical. En el proceso de desarrollo de las ramas, parte del meristemo apical se mantiene indiferenciado en forma de yemas, generalmente en las axilas de las hojas, y permite el desarrollo de nuevos tejidos no sólo en vertical mediante el meristemo apical, sino también hacia los lados gracias a la ramificación (Brand *et al.*, 2001). Todo este desarrollo de nuevos tejidos se denomina crecimiento primario mientras que el crecimiento de tejidos ya formados, como raíz y tallo, es crecimiento secundario. Estos tejidos se ensanchan en consonancia con

el crecimiento de la planta gracias a la diferenciación de células meristemáticas del cámbium (Barlow, 2005).

El crecimiento vegetal depende, además de de la división, de la elongación celular, que logra el crecimiento direccional al hacer que unas células o uno de sus extremos se elonguen de manera más rápida, haciendo que un órgano concreto se curve hacia el lado donde el crecimiento es menor (Taiz *et al.*, 2015). Este desarrollo direccional es fundamental en la respuesta de la planta a varios estímulos como la luz (fototropismo), la gravedad (gravitropismo), el agua (hidrotropismo) y el contacto (tigmotropismo), así como en el desarrollo de algunos tejidos que dependen de la elongación como única forma de crecimiento: el hipocotilo y el crecimiento del tubo polínico (Vandenbussche *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2013).

El crecimiento vegetal es mediado por múltiples hormonas y por su interacción, entre las que se encuentran auxinas, etileno, giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA) y brasinoesteroides (BRs).

En esta Introducción se tratarán de forma más extendida los procesos de embriogénesis, germinación, desarrollo postgerminativo y el efecto de las hormonas y algunas modificaciones postraduccionales en estos procesos.

1.1 Regulación del proceso de desarrollo de semillas

Las semillas son estructuras complejas formadas por tres componentes, cada una con su propio genotipo. El embrión, a partir del cual se desarrollará la planta adulta, es diploide y posee un genoma materno y otro paterno. El endospermo, la estructura que nutre al embrión una vez que la semilla ha germinado y hasta que es capaz de desarrollarse autótrofamente, es triploide y posee dos genomas maternos y uno paterno. Rodeando al embrión y al endospermo está la testa, que es exclusivamente de origen materno. Cada una de estas estructuras tiene su propio programa de desarrollo.

La embriogénesis en plantas superiores se divide en dos fases. Durante la **morfogénesis temprana (apartado 1.1.1)** se desarrolla el modelo corporal de la futura planta. La polaridad se determina en los ejes apical-basal y radial para determinar el eje brote-raíz y se crean dominios que determinan a su vez estructuras morfológicas necesarias

para el desarrollo de órganos embrionarios y sistemas de tejidos en la futura planta (Laux and Jurgens, 1997; Jürgens, 2001; Ohto *et al.*, 2007). Posteriormente, durante la **fase de maduración (apartado 1.1.3)**, el embrión acumula macromoléculas de reserva como proteínas, lípidos y almidón, adquiere la capacidad de resistir la desecación y se inicia un progresivo cese en la actividad metabólica mientras se deseca, que acaba en la quiescencia metabólica (Ohto *et al.*, 2007). Sus capas protectoras, endospermo y testa en el caso de *Arabidopsis*, también tienen que desarrollarse y madurar en este proceso (apartados 1.1.2 y 1.1.4 respectivamente).

1.1.1 Morfogénesis Temprana

La embriogénesis en la planta con flores modelo *Arabidopsis thaliana* es un proceso marcado por una secuencia estricta de divisiones celulares. Las características anatómicas y los patrones dinámicos revelados por la expresión de genes marcadores indican que los destinos de cada nueva célula son definidos en cada ronda de mitosis. Aunque algunos de los factores que regulan este patrón de acontecimientos han sido ya identificados, el desarrollo del proceso en su conjunto es aún bastante desconocido (revisado en Jenik *et al.*, 2007). Inmediatamente después de la fertilización, el cigoto sufre elongaciones que le llevan a triplicar su tamaño original y una división que genera una gran célula basal y una pequeña célula apical. La célula apical y sus hijas adoptan un patrón de crecimiento asimétrico: ésta se divide dos veces en sentido longitudinal y una en sentido transversal formando el proembrión de ocho células. La célula basal y sus hijas sufren divisiones posteriores en sentido transversal y su expansión se produce en sentido longitudinal, produciendo una fila de células. La hija de la célula basal situada en posición más elevada, llamada hipófisis, será la que se convertirá en el meristemo radicular primario de la futura plántula, mientras que el resto de células hijas forman el suspensor.

Los elementos clave del patrón corporal se establecen entre los estadios de ocho y dieciséis células; mediante divisiones tangenciales en el proembrión se genera el primer tejido, la protodermis, el meristemo primario que dará lugar a la epidermis. Los meristemas radicular y apical se generan en los polos opuestos del proembrión (**Figure 1.1**).

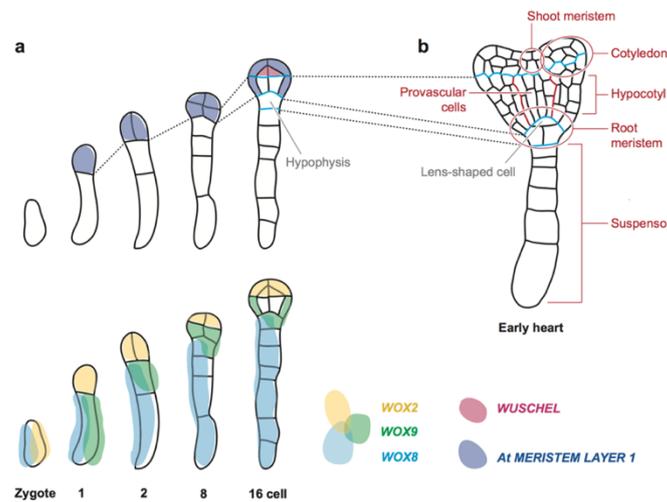


Figure 1.1. Desarrollo embrionario temprano en *Arabidopsis thaliana*.

Los genes de *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* (*AtML1*), *WUSCHEL* (*WUS*) y miembros de la familia *WUSCHEL-related homeodomain* (*WOX*) muestran una expresión dinámica en dominios específicos que revelan la emergencia de nuevos destinos celulares en cada ronda de división del embrión. b) En el estadio de corazón, ya es reconocible el primordio de todos los órganos y tejidos. El meristemo radicular de una célula con forma de lente, la progenitora del centro quiescente. Tomado de Jenik *et al.* (2007).

Las células de la hilera apical y basal del embrión adoptan programas genéticos diferenciados desde etapas tempranas y culminan con la generación de los brotes o de la raíz, respectivamente. Estos patrones de división están controlados por *WOX2* y *CUP-SHAPED COTYLEDON 3* (*CUC3*) en las células de la hilera superior en el estado globular mientras que *PLETHORA1* (*PLT1*) (Haecker *et al.*, 2004) se expresa en las de la hilera inferior en este estado (Aida *et al.*, 2004). El desarrollo de los brotes es ejercido por *TOPLESS* (*TPL*) y *TOPLESS RELATED* (*TPR1-4*), que interactúan con *WUS* (Kieffer *et al.*, 2006) y muestran correpresión transcripcional.

La región apical del embrión comprende el meristemo apical del brote (SAM de sus siglas en inglés, *shoot apical meristem*), que se desarrolla a partir de las células de la hilera superior del proembrión (Scheres *et al.*, 1994).

El desarrollo de los cotiledones está controlado por una distribución asimétrica de auxinas. Antes de que se desarrollen los cotiledones, *PIN1* se localiza en las membranas laterales de las células epidérmicas de la hilera superior de células del embrión, sugiriendo que el flujo de auxinas se dirige hacia los laterales del embrión, que son los primordios de la hojas (Friml *et al.*, 2003).

Como se ha comentado con anterioridad, las células de la hilera inferior del proembrión determinan los futuros hipocotilo y raíz (Scheres *et al.*, 1994). El hipocotilo es un órgano en el que los tres principales tipos celulares (epidermis, tejido fundamental, en este caso parénquima, y tejido vascular) se organizan en capas concéntricas (Dolan *et al.*, 1993). El origen de estos tejidos se remonta al embrión en estado semiglobular, cuando la hilera inferior consta de tres capas celulares: el protoderma da lugar a la epidermis, la capa más interna, formada por tan sólo cuatro células, formará la estela, y las células intermedias dan lugar al tejido fundamental. (Jenik *et al.*, 2007).

El meristemo apical de la raíz en el embrión (RAM, *root apical meristem*) constituye el nicho de células madre que serán las responsables de formar todos los órganos que se encuentren bajo el suelo en la futura planta, incluyendo raíces laterales y su meristemo apical (Sabatini *et al.*, 2003). La organización celular del RAM de *Arabidopsis* es muy regular, con las células iniciales de varios tejidos celulares organizadas alrededor del centro quiescente (QC, *quiescent center*) (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994). La formación de la raíz se inicia en el estadio globular del embrión por la división asimétrica de la hipófisis, que genera una célula basal hija de gran tamaño y una apical pequeña, llamada célula lenticular (Figure 1.1). Por su parte, el centro quiescente de las raíces laterales no se genera a partir de una única célula fundadora, de forma contraria a lo que ocurre en el resto de meristemas (De Smet *et al.*, 2007).

1.1.2 Desarrollo del Endospermo

El endospermo es un tejido cuya función es nutricia y que se encuentra en las semillas pero que no en todas las especies actúa de la misma manera. El endospermo de *Arabidopsis* no es energéticamente tan rico como el de otras especies, como los cereales o las oleaginosas, pero su función también es la de nutrir, aunque sólo al embrión durante el desarrollo y no a la semilla germinada ni a la plántula. En semillas no endospermicas como el guisante (*Pisum sativum*) y en semillas endospermicas con endospermo poco persistente como *Arabidopsis* el endospermo es absorbido por el embrión en desarrollo durante la maduración de la semilla mientras que en los cereales, sin embargo, el endospermo ocupa la mayor parte de la semilla madura y nutre a la semilla germinada hasta que la maquinaria fotosintética se ha desarrollado completamente (Olsen, 2004).

El endospermo, al igual que el embrión, es el resultado de una fertilización, aunque en este caso de los dos núcleos polares de origen materno en el centro del saco embrionario por parte de uno de los dos núcleos del gametofito masculino. Posteriormente, el endospermo puede desarrollarse de diferentes maneras. En el caso de *Arabidopsis*, el desarrollo es de tipo nuclear: el núcleo se divide repetidamente sin que las divisiones vayan acompañadas de formación celular (celularización) y resulta en la formación del endospermo en sincitio (**Figure 1.2 A**). La celularización ocurre después, tras el desarrollo de sistemas microtubulares radiales (RMS) y la alveolización (**Figure 1.2**). Este tipo de desarrollo es común no sólo a las brassicáceas, a las que pertenece *Arabidopsis*, sino a otras especies como soja o algodón (Olsen, 2004).

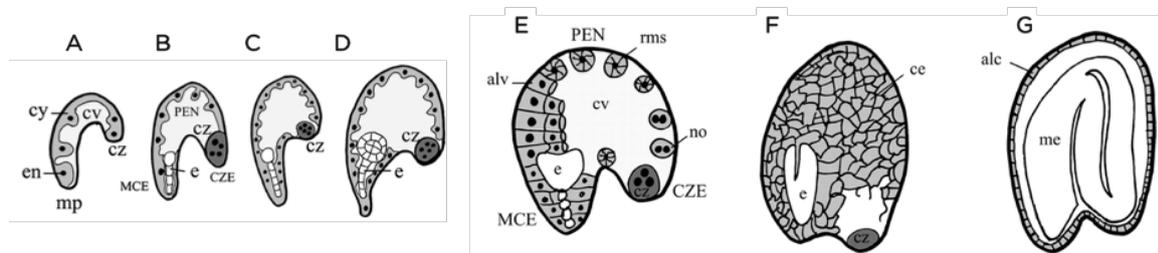


Figure 1.2 Etapas del desarrollo del endospermo de *Arabidopsis thaliana*.

(A) Los núcleos del sincitio migran desde la región micropilar (mp) al final de la chalaza (cz), recubriendo finalmente todo el sincitio (B y C). Durante el desarrollo, el sincitio da lugar a tres estructuras: el endospermo micropilar (MCE), que rodea al embrión; el endospermo central o periférico (PEN) y la región de la chalaza (CZE), que contiene el quiste de la chalaza (cz). (D) Al final de la fase globular del desarrollo embrionario el embrión es rodeado completamente de citoplasma. (E) El endospermo de *Arabidopsis* en el estadio globular muestra un MCE celularizado, un gradiente de estados en el proceso de alveolización en PEN, nódulos del endospermo (no) así como formación de quistes en la chalaza (cz) en CZE. (F) Endospermo celular completamente formado (ce). (G) El endospermo se consume durante la maduración de la semilla, dejando únicamente la capa periférica de aleurona (alc) en el embrión maduro (me). Modificado de Olsen (2004).

El sincitio de *Arabidopsis* tiene tres regiones que darán lugar a diferentes estructuras durante el desarrollo de la semilla: el endospermo micropilar (MCE), formado por una única capa celular que rodea al embrión, el endospermo periférico en la cámara central (PEN) y el endospermo de la chalaza (CZE) (**Figure 1.2**) (Brown *et al.*, 1999; Boisnard-Lorig *et al.*, 2001; Sørensen *et al.*, 2002). Conforme el saco embrionario se expande tras la fertilización, la única vacuola central que posee se alarga y el citoplasma del sincitio del endospermo es desplazado a la periferia. En el estadio globular, el citoplasma del sincitio del MCE rodea el embrión en desarrollo y el PEN se dispone como una única capa periférica con los núcleos separados de forma proporcional (**Figure 1.2 D**). La celularización del cenocito comienza con la formación de RMS en las superficies de los núcleos. (**Figure 1.2 E**) (Brown *et al.*, 1999). La región del citoplasma alrededor de cada núcleo se llama dominio

citoplasmático nuclear (NCD). Los microtúbulos de los núcleos adyacentes se encuentran y se deposita callosa, que forma pared y se desarrollan *interzonas*.

Este proceso comienza en el MCE y avanza, con efecto de ola, hacia el PEN primero y el CZE después (**Figure 1.2 E**). Este proceso en el PEN en *Arabidopsis* es prácticamente idéntico al de cereales: se forman RMS en las superficies de los núcleos y posteriormente fragmoplastos en el citoplasma de los NCD (**Figure 1.2 E**), que median la formación de pared celular de tipo alveolar. Las mitosis periclinales sincrónicas de los núcleos alveolares, acompañadas por la formación de fragmoplastos, dividen los alveolos del PEN en una célula periférica y un alveolo interno (**Figure 1.2 E**). La finalización de la celularización del endospermo en *Arabidopsis* también se da por repetidas rondas de alveolización del RMS, llevando a un endospermo celular excepto por el quiste del endospermo de la chalaza (**Figure 1.2 F**). La celularización en el MCE se completa alrededor del embrión, mientras que el PEN se mantiene como un sincitio (**Figure 1.2 E**) (Sørensen *et al.*, 2002). EL CZE también mantiene su estado sincitial hasta los últimos estadios de la maduración de la semilla (**Figure 1.2 F**).

El proceso de celularización en *Arabidopsis* genera un endospermo completamente celular excepto por una pequeña área en el CZE adyacente al quiste de la chalaza (**Figure 1.2 F**). En contraste al endospermo persistente de cereales, el endospermo celular de *Arabidopsis* se va consumiendo gradualmente conforme se desarrolla el embrión. La función del endospermo no persistente es mantener al embrión mientras se desarrolla y crece, papel que es asumido por los cotiledones durante la germinación. En semillas maduras pero que aún se encuentran en la silicua, un enorme embrión ocupa todo el óvulo y el endospermo sólo se encuentra representado por una única capa celular en la periferia llamada aleurona (**Figure 1.2 G**) (Olsen, 2004). La aleurona de *Arabidopsis* conserva algunas sustancias de reserva y paredes celulares muy finas (Keith *et al.*, 1994) y es fundamental durante el proceso de germinación.

1.1.3 Fase de Maduración

La fase de maduración comienza cuando el embrión y el endospermo han finalizado su morfogénesis y el patrón ha sido completamente establecido (Wobus and Weber, 1999). Esta fase se caracteriza por un cese en el crecimiento seguido de la síntesis y acumulación de reservas, cuya degradación proveerá los nutrientes necesarios durante la germinación

antes de que la plántula sea autosuficiente (Baud *et al.*, 2002). El ABA, que primero se sintetiza en los tejidos maternos y posteriormente, aunque en menor cantidad, en el embrión y el endospermo, controla las etapas inicial y media del proceso de maduración, en la cuales se produce la transcripción de la mayor parte de proteínas de reserva de la semilla (Nambara and Marion-Poll, 2003). Los niveles de ABA descienden en la fase tardía de la maduración, que se caracteriza por la síntesis de las proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), relacionadas con la adquisición de tolerancia a la desecación. Durante esta fase, la acumulación de metabolitos de reserva en *Arabidopsis* se realiza mayoritariamente en forma de carbohidratos en el endospermo y de lípidos en el embrión y puede culminar con la adquisición de un estado de quiescencia llamado dormición, en el cual la semilla no puede germinar aun cuando las condiciones sean favorables (Holdsworth *et al.*, 1999). La maduración no es un proceso que deba llevarse a cabo de manera preceptiva para que la semilla pudiera germinar; embriones separados de la semilla, eliminando el efecto de la planta madre y el ABA, pueden germinar y desarrollarse de manera normal (Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005). De hecho, en algunas semillas, como las de manglar, el proceso de embriogénesis es inmediatamente anterior al desarrollo de la plántula; similar a lo que sucede en el caso de las semillas mutantes denominadas vivíparas. Además del ABA, las hormonas auxinas, citoquininas y giberelinas (GAs) participan en el desarrollo de la semilla. En concreto, la síntesis de GAs es necesaria durante la fase de maduración, como se demostró en embriones de maíz (White and Rivin, 2000). Ahora se sabe que la maduración de semillas depende tanto de ABA como de GAs y, concretamente, del balance entre ambas (Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005).

Este proceso está controlado por muchos genes, varios de ellos factores de transcripción. Defectos en la señalización de ABA durante este proceso, concretamente mutantes insensibles, tienen afectada la maduración y alterada la transcripción de *VP1* y *ABI3*, que son factores de transcripción con dominio de unión a B3 (McCarty *et al.*, 1991; Giraudat *et al.*, 1992), y *ABI4* y *ABI5* factores de transcripción de tipo bZIP y AP2 respectivamente (Finkelstein *et al.*, 1998; Finkelstein and Lynch, 2000). Estos genes se expresan también en tejidos vegetativos pero de forma minoritaria, ya que su función principal la desarrollan durante la fase de maduración de la embriogénesis y son, de hecho, necesarios para que ésta se complete (McCarty *et al.*, 1991; Giraudat *et al.*, 1992; Finkelstein *et al.*, 1998; Rohde *et al.*, 1999; Finkelstein and Lynch, 2000). Los mutantes de pérdida de función de los factores de transcripción ABI son insensibles a ABA y además tienen niveles reducidos de algunos ARNs específicos de semilla, como *LEA* (*LATE*

EMBRYOGENESIS ABUNDANT) y *Em* (*EARLY METHIONINELABELED*). Por su parte, *ABI3* es el factor de transcripción que afecta a más procesos durante la maduración: mutaciones en *ABI3* impiden a los embriones acumular sustancias de reserva y adquirir tolerancia a la desecación (Nambara *et al.*, 1992; Finkelstein, 1994; Nambara *et al.*, 1995). Además, los embriones *abi3* son vivíparos en condiciones de alta humedad y las semillas maduras permanecen verdes tras la desecación, lo que sugiere que estas semillas son defectuosas en el programa de maduración, su desarrollo germinativo y postgerminativo es prematuro, y que *ABI3* es un regulador crítico del proceso de maduración.

Además de *ABI3*, hay otros tres reguladores principales del proceso de maduración: *FUS3*, *LEC1* y *LEC2*. *FUS3* y *LEC2* son factores de transcripción que contienen un dominio de unión a B3, como *ABI3* (Luerssen *et al.*, 1998; Stone *et al.*, 2001), mientras que *LEC1* codifica una subunidad HAP3 del factor de transcripción de unión a la caja CCAAT (CBF o NF-Y) (Lotan *et al.*, 1998). Los mutantes *lec1*, *lec2* y *fus3* tampoco se desarrollan correctamente durante la maduración y también tienen defectos en el almacenamiento de sustancias de reserva y carecen de dormición (Raz *et al.*, 2001), pero también presentan fenotipos específicos, como acumulación de antocianinas (*fus3*, *lec1* y en menor cantidad *lec2*), intolerancia a la desecación (*abi3* y *fus3* y *lec1*) o defectos en la identidad de los cotiledones (*lec1*, *fus3* y *lec2*) (Holdsworth *et al.*, 2008).

La actividad de *FUS3* está restringida a la adquisición de dormición en el embrión, determinación de identidad celular en los cotiledones y síntesis de sustancias de reserva. Hay diferencias fenotípicas entre los mutantes de los distintos alelos de *FUS3* y se ha determinado que la línea mutante *fus3-T* tiene fenotipos relacionados con los procesos antes comentados, mientras que *fus3-3*, presenta efectos pleiotrópicos que están causados por el producto génico truncado producido por su mutación (Tiedemann *et al.*, 2008).

LEC1 es necesario para el desarrollo normal durante las fases inicial y final de la embriogénesis y su acción es suficiente para inducir el desarrollo embrionario en células vegetativas (Yadegari *et al.*, 2000). La pérdida de *lec1* induce germinación temprana (8-10 días tras la polinización) en embriones extirpados, al igual que en *lec2* y *fus3* e incluso antes que en mutantes *abi3* (Raz *et al.*, 2001).

LEC2 controla el programa transcripcional de la fase de maduración: su inducción en plántula genera una acumulación anormal de ARNs que se normalmente se encuentran

en la fase de maduración, como los relacionados con el almacenamiento de sustancias de reserva en semilla y la formación de cuerpos lipídicos. Los genes inducidos por LEC2 poseen motivos RY, que se unen a elementos *cis* B3 (Braybrook *et al.*, 2006). Uno de ellos es *DELAY OF GERMINATION (DOG1)*, un gen muy importante en la variación natural en dormición entre ecotipos de *Arabidopsis* y el primero caracterizado molecularmente (Bentsink *et al.*, 2006).

Respecto a la regulación, se ha postulado que ABI3, FUS3, LEC1 y LEC2 interaccionan en forma de red y controlan la maduración de semillas. Por su parte, LEC1 regula la expresión de ABI3 y FUS3 (Kagaya *et al.*, 2005); FUS3 y LEC2 actúan de manera parcialmente redundante en el control de la expresión génica de proteínas específicas de semilla; y LEC2 regula la expresión de FUS3 en los cotiledones (Kroj *et al.*, 2003). La redundancia funcional se demostró analizando la expresión de ABI3 y FUS3 en mutantes de maduración simples, dobles y triples, ya que se hallaron conexiones entre estos genes.

Una de las funciones de LEC2 es la regulación positiva tanto de FUS3 como de ABI3. La mutación *lec2* es responsable de un marcado descenso en la expresión de FUS3 y ABI3 y los fenotipos del mutante pueden ser rescatados por la expresión constitutiva de estos genes. Además ABI3 y FUS3 se regulan a sí mismos y entre ellos positivamente, creando bucles de regulación positiva necesarios para mantener su expresión constante durante todo el proceso de maduración de la semilla. Finalmente LEC1 también regula positivamente a ABI3 y FUS3 en los cotiledones (To *et al.*, 2006).

Como se ha comentado anteriormente, las GAs son necesarias para la maduración de semillas y LEC2 y FUS3 regulan su síntesis: FUS3 reprime la expresión de *AtGA3ox2*, que es una enzima clave que cataliza la conversión de la forma inactiva a activa de GAs, fundamentalmente en células epidérmicas del eje embrionario.

Uno de los programas genéticos que se activa en esta fase es el de proteínas de almacenamiento: comienza la expresión de los genes *SSP* (*seed storage proteins*), responsables de la síntesis de las globulinas 2S y 12S y de los genes de las proteínas LEA (*late embryogenesis abundant*), responsables de la adquisición de tolerancia a la desecación (Holdsworth *et al.*, 2008). Los elementos *cis* necesarios para la expresión específica de los genes *SSP* en *Arabidopsis* incluyen los *ABA-responsive elements* (ABRE) y los elementos RY/Sph. Los elementos ABRE son uno de los factores más importantes de la señalización

de ABA y se caracterizan por una contener un motivo mínimo ACGT que es reconocido por los factores de transcripción bZIP. Dos de estos factores, *AtBZIP10* y *AtBZIP25*, participan en la regulación de los genes *SSP*. Pese a la importancia de las cajas *cis*, ninguno de los reguladores transcripcionales más importantes durante la maduración de semillas (*ABI3*, *FUS3*, *LEC1* y *2*) interacciona con ellas, sino con los elementos RY, como se ha comentado previamente. *ABI5*, otro factor de transcripción fundamental en la fase de maduración y uno de los principales factores de respuesta a ABA en este proceso, se une a las cajas ABRE e induce la transcripción de estos genes (Nakabayashi *et al.*, 2005).

1.1.4 Desarrollo de la Testa

El embrión y los tejidos nutricios de la semilla están recubiertos por la testa. En la semilla madura de *Arabidopsis*, como ya se ha descrito previamente, el endospermo está restringido a una sola capa celular, la capa de aleurona, estrechamente relacionada con la testa (Debeaujon *et al.*, 2000). La testa está compuesta por tegumentos o cubiertas y la chalaza. En los integumentos se forma un poro llamado micropilo, formado por la entrada del tubo polínico. En la chalaza se encuentra la terminación de los haces vasculares maternos que conectan con la semilla, el funículo. El punto exacto donde el funículo desconecta de la semilla es el hilio. La diferenciación de los tejidos de la testa se realiza mediante cambios celulares y casi siempre incluye muerte celular programada.

Arabidopsis posee dos tegumentos (interno y externo), cada uno con varias capas que poseen células y funciones especializadas, que se originan a partir de la diferenciación inducida por la fertilización de tejidos del óvulo. El tegumento interno (ii) posee tres capas (ii1, ii1' e ii2) y el externo posee dos (oi1 y oi2) (Beeckman *et al.*, 2000) (**Figure 1.3**). En los primeros días tras la fertilización se produce el desarrollo de estos tejidos tanto por división como por elongación (Haughn and Chaudhury, 2005). En el estadio de corazón

del desarrollo embrionario ya se puede distinguir la organización celular de los tejidos de la testa, aunque para su maduración completa aún es necesaria cierta diferenciación.

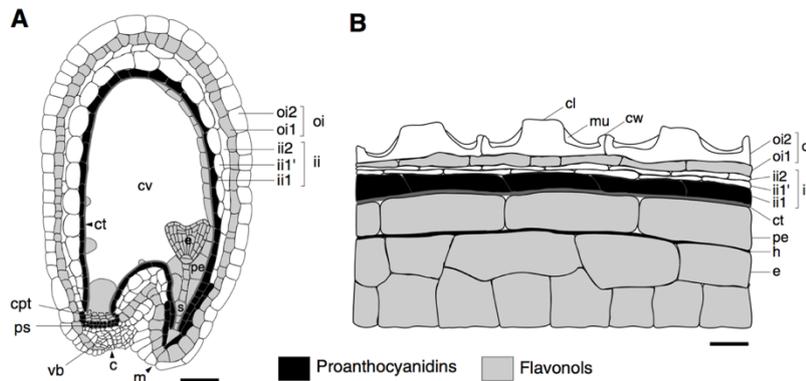


Figure 1.3 Estructura de la testa en la semilla de *Arabidopsis thaliana*.

(A). Anatomía de la semilla en desarrollo en el estadio de corazón en sección longitudinal. Las células que acumulan proantocianidinas o flavonoles aparecen destacadas en negro y gris respectivamente. Las capas de tegumentos aparecen indicadas. (B). Sección de la testa de semilla madura. Abreviaciones: c, chalaza; cl, columnela; cpt, tejido de proliferación de la chalaza (nucela); ct, cutícula; cv, vacuola central; cw, pared celular; e, embrión; h, capa hialina; ii, tegumento interno; m, micropilo; mu, mucílago; oi, tegumento externo; pe, endospermo periférico (capa de aleurona); ps, pigment strand; s, suspensor; vb, haz vascular. Tomado de (Debeaujon *et al.*, 2007).

Durante el desarrollo de la semilla, cada una de las capas que forman la testa sufre especialización: la capa más interna (ii1), llamada endotelio, se especializa en la biosíntesis de proantocianidinas y taninos (Devic *et al.*, 1999; Debeaujon *et al.*, 2003). Las proantocianidinas son compuestos flavonoides, también conocidos como taninos condensados, que se acumulan en las vacuolas de las células del endotelio como compuestos incoloros al comienzo del desarrollo de la semilla en la región micropilar y se depositan en la chalaza (Marles *et al.*, 2003; Dixon *et al.*, 2005). Su oxidación durante la desecación da lugar a la formación de pigmentos marrones que confieren a las semillas maduras su color característico. Con la excepción de algunas células de la capa externa del tegumento interno (ii2) en el micropilo (que al igual que las células del ii1 son capaces de acumular proantocianidinas), el resto de las células del tegumento interno no sufren diferenciación más allá del estado parenquimático inicial y son *destruidas* durante la maduración (Debeaujon *et al.*, 2003). Las dos capas externas (oi1 y oi2) producen y degradan gránulos de almidón y posteriormente se diferencian de forma independiente: en la capa más externa del integumento externo (oi2) se diferencian en células superficiales, llamadas columnela, que contienen mucílago y paredes celulares engrosadas. El mucílago se acumula en el apoplasto de estas células y su componente fundamental es la pectina, un polisacárido altamente hidrofílico, con consistencia de gel al hidratarse (Haughn and Chaudhury, 2005). Las GAs presentes en las células de oi2 inducen la acción de la α -

amilasa, encargada de la hidrólisis del almidón previa a la formación de mucílago. La capa más interna de las tres que forman el integumento interno (ii1) tiene las paredes celulares de naturaleza lipídica (Debeaujon *et al.*, 2007). El crecimiento y desarrollo de la testa coincide en el tiempo con el desarrollo del embrión y del endospermo, sin embargo, al contrario que éstos, la testa no se produce por fertilización, así que debe existir alguna señal durante o posterior a la fertilización que induzca la diferenciación de la testa y la coordine con la del embrión y el endospermo (Haughn and Chaudhury, 2005). Concretamente, HAIKU se ha descrito como la señal procedente del endospermo que estimula la elongación pero no la división de los tegumentos, así como la proliferación y crecimiento del embrión. Por otro lado, TTG2 (*TRANSPARENT TESTA GLABRA2*), de origen materno, controla la elongación celular de los tejidos de los tegumentos. TTG2 y HAIKU son los principales reguladores del crecimiento del endospermo y el tamaño final de la semilla, lo que señala que la integración de señales maternas y embrionarias controla el tamaño final de la semilla (García *et al.*, 2005).

Como se ha comentado previamente, las células de la testa sufren muerte celular programada durante el desarrollo y maduración de la semilla. Las primeras capas que inician este proceso son las células parenquimáticas de ii1 e ii2, relacionado con la actividad de la enzima VPE (*vacuolar processing enzyme*), una cisteína-proteínasa con actividad *caspase-like*. No se sabe si esta enzima es responsable de los procesos de muerte celular programada en otros tejidos, aunque es un mecanismo conservado al menos en las brasicáceas (Wan *et al.*, 2002).

La naturaleza y estado de las cubiertas determinan la entrada y salida de líquidos y gases de la semilla y condicionan el estado de dormición o germinación del embrión, principales aspectos a tratar en el punto siguiente.

Una vez que la semilla se ha desarrollado completamente y de forma correcta puede tomar dos caminos: germinar o no hacerlo y permanecer en un estado *durmiente*. El estado de dormición permite a las semillas mantenerse viables en periodos que serían desfavorables el desarrollo y reproducción de la futura planta y está finamente regulado por el balance de ABA y GAs.

1.2 Dormición

Para que se produzca la germinación, las condiciones que rodean a la semilla tienen que ser óptimas. En primer lugar, debe haber agua disponible, oxígeno que permita la respiración y ausencia de sustancias químicas tóxicas para la semilla. Además, la temperatura debe ser adecuada y, en muchos casos, es necesaria luz en calidad y cantidad concretas. Pero aunque estas circunstancias favorables se den, en muchas ocasiones la semilla es incapaz de germinar. La razón es la dormición que ésta posee, que debe ser eliminada para que se dé dicha germinación y, para ello, la semilla debe experimentar cambios metabólicos y estructurales que le permitan percibir correctamente las señales activadoras de la germinación y llevarla a cabo.

1.2.1 Definición, determinación y función biológica de la dormición

La dormición se puede definir como un arresto temporal de las capacidades de germinación de la semilla aunque las condiciones sean favorables. Impide que las semillas germinen junto a la planta madre inmediatamente después de completar su maduración, permitiendo su dispersión a lo largo del tiempo y también del espacio. Muchos factores controlan la dormición: físicos, mecánicos, químicos entre otros y puede estar impuesta por las cubiertas o por el embrión. La ruptura de la dormición se puede producir por factores externos como la temperatura, luz, presencia de nitratos y también componentes del humo, en algunas especies (Bewley *et al.*, 2013a).

Sin embargo, la determinación de la dormición de una semilla es más difícil que su definición, ya que la única manera de definir la dormición es la ausencia de germinación, y la germinación de una semilla es un fenómeno de todo o nada, mientras que una semilla puede tener valores de dormición desde máximos (máxima dormición) a nulos (semilla no durmiente) (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

De hecho, la dormición es mucho más que la ausencia de germinación, es más una característica de cada semilla que determina las condiciones que ésta necesita para germinar (Vleeshouwers *et al.*, 1995; Fenner and Thompson, 2005). Si tomamos esta definición, cualquier factor externo que es necesario para la germinación altera al mismo tiempo la dormición y, por extensión, cuando la semilla ya no necesita de ningún factor ambiental para germinar, es no durmiente (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

La dormición es una característica presente en muchas especies, *Arabidopsis thaliana* incluida, y aumenta en las especies cuando más lejanas al ecuador se encuentren, así que es más útil cuando existe estacionalidad, de forma que la germinación sin tener en cuenta los cambios cíclicos de temperatura y lluvia, es una característica muy poco deseable que disminuye las posibilidades de supervivencia de la plántula.

Las funciones biológicas de la dormición se pueden resumir a grandes rasgos en dos. La primera es que aumenta la dispersión de la semilla desde la planta madre al prevenir su germinación inmediatamente posterior a la conclusión de la maduración, dando tiempo a que los mecanismos de dispersión propios de cada especie (anemocoria, hidrocoria o zoocoria) tengan lugar. La segunda permite la distribución de la semilla también en el tiempo. Un factor muy importante para la eliminación de la dormición es la estratificación: si una semilla pasa un periodo de tiempo determinado (puede ser de entre días a meses dependiendo de la especie) en condiciones frías (1-5 °C) pasa de durmiente a lista para germinar. En la naturaleza, esto significa que, para germinar, la semilla debe pasar el invierno en el suelo y, pasado este tiempo, que la desfasa en su desarrollo de la planta madre, germinar en primavera, cuando las condiciones son más favorables para que su desarrollo se lleve a cabo.

1.2.2 Tipos de Dormición

Se pueden distinguir diferentes tipos de dormición según el aspecto que tengamos en cuenta: puede ser **dormición impuesta por el embrión** o por la **testa**, según el órgano que la determine y **dormición primaria** o **secundaria** según el momento en el que se produzca.

1.2.2.1 Dormición Impuesta por el Embrión

Es necesario que el embrión posea capacidad de crecimiento para que se produzca la germinación, ya que ésta se produce mediante la protrusión de la radícula a través de las capas protectoras de la semilla. Sin embargo, en muchas ocasiones, el embrión impone la dormición por su incapacidad de germinar, lo que puede deberse a tres motivos. El primero es que el embrión no esté diferenciado o no haya madurado. En el primero de los casos, ni siquiera se ha desarrollado el patrón corporal y, por supuesto, carece también de sustancias de reserva con las que mantenerse; y en el segundo, los embriones no han madurado completamente y deben hacerlo dentro de las cubiertas seminales después de separarse de

la planta madre y ser dispersadas. No se consideran dormición en el término estricto de la palabra, pero estas situaciones son comunes en orquídeas y en el género *Annona* respectivamente. El segundo motivo es la presencia de compuestos inhibidores de la germinación en el embrión. El más importante y estudiado es el ABA, cuya presencia mantiene a las semillas durmientes y es habitual y elevada en semillas de *Arabidopsis* frescas y durmientes y desciende tras veinticuatro horas de imbibición. El último de los motivos es la dormición fisiológica, término utilizado para referirse a la dormición reversible generada en el propio embrión y causada por mecanismos de regulación intrínsecos. Es el tipo de dormición más extendido en el reino vegetal, es la dormición *sensu stricto*, de tipo estacional y que necesita periodos de frío para ser superada. Su regulación es bien conocida: se mantiene por la inhibición activa de la germinación por parte del ABA y su desaparición depende tanto de la disminución en los niveles de esta hormona como del aumento de las GAs, cuyo efecto es inductor de la germinación. En último término, el destino de la semilla viene determinado por el balance de ABA-GAs.

1.2.2.2 Dormición Impuesta por la Testa

La dormición puede también venir impuesta por las capas protectoras de la semilla, que pueden impedir la toma de agua, el intercambio gaseoso, la salida de compuestos inhibidores del embrión o suponer una barrera mecánica. Mientras que la dormición fisiológica es reversible (de hecho, como se ha comentado, cumple unas importantes funciones), la dormición impuesta por las cubiertas es un estado irreversible desde el punto de vista biológico y se plantea si se la puede denominar dormición *sensu stricto* (al igual que pasaba con la dormición no fisiológica impuesta por el embrión), ya que no se trata de una semilla en condiciones ideales que no germina, sino de un embrión, rodeado de dichas condiciones ideales, a las que las cubiertas que le rodean no le permiten acceder. Sin embargo, de forma tradicional se han incluido en esta clasificación (Bewley *et al.*, 2013a).

La otra clasificación distingue entre dormición primaria y secundaria según el momento en la que aparece en la semilla.

1.2.2.3 Dormición Primaria

La dormición primaria es aquella que poseen las semillas maduras, permeables y recién recogidas de la planta madre. Se induce durante la maduración de la semilla en la planta madre y requiere la implicación del ABA (Hilhorst, 1998; Kucera *et al.*, 2005). La

eliminación de esta dormición puede producirse por el *after-ripening* (almacenamiento seco) en el propio suelo tras la dispersión o por diferentes factores que afecten a la semilla hidratada, como la temperatura (frío o calor), la luz, hormonas (fundamentalmente GAs), componentes del humo y diferentes compuestos como el óxido nítrico (Krock *et al.*, 2002; Bailly, 2004; Flematti *et al.*, 2004; Kucera *et al.*, 2005; Bethke *et al.*, 2006)

1.2.2.4 Dormición Secundaria

La dormición secundaria puede inducirse en semillas con dormición fisiológica no profunda después de su dispersión. Normalmente está asociada con ciclos de dormición en el *seed bank* (reserva de semillas en el suelo) (Baskin and Baskin, 1998; Hilhorst, 1998; Baskin and Baskin, 2004; Fenner and Thompson, 2005). La inducción de esta dormición tendrá lugar si las condiciones para eliminar la dormición primaria e iniciar la germinación no han terminado de llevarse a cabo, por ejemplo la luz o la temperatura (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). La dormición secundaria puede perderse e inducirse repetidamente hasta que las condiciones ambientales sean las adecuadas para que la germinación tenga lugar. Éste es un proceso dinámico, en el que la semilla puede encontrarse en estadios intermedios de dormición, ya sea porque está perdiendo la dormición o porque ésta es inducida de nuevo. La inducción de la dormición secundaria no requiere que la semilla haya perdido por completo la dormición, sino que podrá volver a inducirse aun cuando la semilla se encuentre en el proceso de salida de la misma si las condiciones ambientales varían (Bewley *et al.*, 2013a).

1.2.3 Mecanismos de Ruptura de la Dormición

La temperatura es el factor más determinante en la pérdida de la dormición fisiológica o *sensu stricto* tras la dispersión de la semilla y su almacenamiento en el *seed bank* (Probert, 2000), sin embargo, en *Nicotiana attenuata*, señales de origen interno (ABA y otros cuatro compuestos terpenoides) son capaces de inducir la dormición secundaria (Krock *et al.*, 2002). En *Arabidopsis thaliana*, el contenido de nitrato en la semilla, recibido de la planta madre, influye en sus niveles de dormición (Alboresi *et al.*, 2005) y la adición externa de nitrato puede alterar sus requerimientos de luz para germinar (Batak *et al.*, 2002). Por lo tanto, según la definición de dormición utilizada anteriormente, el nitrato afecta a las condiciones necesarias para que la semilla germine, así que su efecto directo es alterando la dormición más que promoviendo la germinación (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

La salida de la dormición está regulada por factores a largo o a corto plazo, como el *after-ripening* o la estratificación, relacionadas con efectos estacionales, mientras que la luz y los compuestos químicos se asocian más con efectos más instantáneos y relativos al espacio. Pese a que cada uno de los factores se suelen analizar por separado, es evidente que muchos afectan de manera simultánea a la semilla, de hecho, es necesaria la confluencia de varios de estos factores, en ocasiones de manera secuencial, para liberar a las semillas de su estado durmiente.

Las semillas de muchas especies, incluida *Arabidopsis thaliana*, necesitan pasar un largo periodo de almacenamiento en seco o *after-ripening* y de otro de estratificación en frío, para eliminar la dormición. En condiciones naturales, el *after-ripening* lo sufren plantas anuales de invierno (aquellas que germinan en otoño o invierno, viven durante el invierno y florecen en invierno o primavera, como *Arabidopsis*), cuya dormición se pierde por las altas temperaturas del verano lo que les permite germinar en el otoño, mientras que en las anuales de verano (plantas que crecen, florecen y mueren durante los meses de verano), la pérdida de dormición se produce por la estratificación por frío húmedo durante los meses fríos de invierno. Sin embargo, esta clasificación no es absoluta ni excluyente, ya que la elevada dormición del ecotipo de *Arabidopsis thaliana* procedente de las islas de Cabo Verde (Cvi) (y también otras ecotipo de esta planta, cuya dormición es más ligera), también puede ser eliminada por un corto periodo de estratificación en frío.

El proceso de *after-ripening* altera la semilla aumentando los márgenes de temperatura en la que la semilla es capaz de germinar; disminuyendo la cantidad y sensibilidad a ABA y aumentando la sensibilidad a GAs o los requerimientos de ABA. Durante este proceso también disminuyen los requerimientos de luz en semillas que no germinan en oscuridad, aumenta la sensibilidad de la semilla a luz, se elimina la necesidad de nitrato para la germinación y todo ello conlleva el aumento de la velocidad de germinación (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

El grado de dormición y su resistencia al *after-ripening* pueden variar tanto por causas externas como las condiciones ambientales o los procesos de almacenamiento y germinación a los que sea sometida la semilla, e internas como las condiciones de maduración de la semilla. El *after-ripening* se produce únicamente en semillas secas y durmientes y que se dé o no depende de la humedad, el contenido en aceites, la testa y otras envueltas de las semillas y la temperatura (Finch-Savage and Leubner-Metzger,

2006). Para que una semilla se considere seca debe tener menos de un 20 % de agua: en este estado la semilla contiene agua, pero de forma conjugada de forma tanto fuerte como débil, pero no de forma débil, aquella que está disponible para actividades enzimáticas y otras reacciones químicas. La eficacia del *after-ripening* depende de las condiciones ambientales como humedad, temperatura y oxígeno. En semillas con alto contenido en agua, la efectividad del *after-ripening* disminuye: en semillas con contenido intermedio de agua (>20-40 %), en las cuales la semilla puede llegar a perder viabilidad y si el contenido es mayor del 40 %, se puede inducir la dormición secundaria. Por otro lado, en condiciones de muy bajo contenido en agua (<4 %) el *after-ripening* se retrasa o no sucede.

La temperatura también afecta a la acción del *after-ripening*: temperaturas altas aumentan la tasa de *after-ripening* y disminuyen el tiempo necesario para que la semilla pierda la dormición. Bajos niveles de oxígeno retrasan la pérdida de dormición y lo contrario ocurre con niveles elevados, aunque estos resultados han sido obtenidos en condiciones experimentales donde los rangos pueden ir de 0 a 100 % de oxígeno ambientales, condiciones muy improbables en la naturaleza, con lo que el efecto real del oxígeno en condiciones naturales puede ser limitado (Bewley *et al.*, 2013a).

El mecanismo de acción del *after-ripening* en semillas secas no es muy conocido. Es obvio que las semillas secas son incapaces de germinar porque es necesario un entorno acuoso que permita que la activación de las enzimas y el inicio de las reacciones bioquímicas y moleculares para que inicie la germinación. Es complicado, en condiciones experimentales, determinar realmente cómo de seca está una semilla y sus condiciones de dormición y aún más la comparación entre diferentes semillas, lotes de semillas y condiciones experimentales, así que este tipo de experimentos deben ser llevados a cabo con un control exhaustivo y las comparaciones entre diferentes semillas y laboratorios deben ser realizadas con cautela.

Lo que sí se sabe sobre el efecto del *after-ripening* es que disminuye los niveles de ABA en las semillas: en el ecotipo Cvi, un *after-ripening* de 6 meses disminuye los niveles de ABA en un 10 % y se elimina completamente la dormición, así que parece que durante este proceso no sólo se produce pérdida de ABA sino alteraciones de la sensibilidad a la hormona en la semilla (Finch-Savage *et al.*, 2007). En semillas imbibidas de *Sisymbrium officinale* se ha observado un elevado aumento de su sensibilidad a GAs, lo que aumenta su potencial de germinación (Iglesias-Fernández and Matilla, 2009).

Respecto a las reacciones no enzimáticas, las especies reactivas de oxígeno (Bailly, 2004), las alteraciones de membrana (Hallett and Bewley, 2002) y la degradación de proteínas vía proteosoma (Borghetti *et al.*, 2002) se han descrito como efectores de *after-ripening*.

La acción hormonal es crucial en la transición dormición/germinación, así como sus procesos de síntesis, catabolismo e interacción que serán tratados ampliamente en otro apartado (1.5.6.1).

1.2.4 Regulación molecular de la dormición

Desde el punto de vista molecular, la germinación tiene lugar, en parte, gracias a ARNms residuales almacenados durante la maduración, que participan en la síntesis de proteínas durante la germinación. Cuando se da el proceso de *after-ripening* en semillas de tabaco, cebada y *Arabidopsis* se producen cambios en los transcritos totales: algunos de ellos aumentan durante el *after-ripening* respecto a semilla fresca pero, en general, se produce un descenso en la cantidad de ARNms entre semilla fresca durmiente y semilla no durmiente. En *Nicotiana tabacum* la promoción de la ruptura de la testa por un *after-ripening* de 60 días se asocia a la inducción de la expresión génica de la β -1-3-glucanasa en la capa más externa de la semilla (Leubner-Metzger, 2005) y en *Nicotiana glauca* se ha descrito la acumulación de al menos ocho ARNms específicos tras el *after-ripening* (Bove *et al.*, 2005). Así que, pese a que tradicionalmente se ha asociado la degradación de ARNms y proteínas que regulan positivamente la dormición o negativamente la germinación como principal mecanismo de acción del *after-ripening*, hay que tener en cuenta la posibilidad de que también exista expresión génica durante este proceso (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

En *Arabidopsis* hay aproximadamente 30 genes relacionados con la dormición cuyos ARNms descienden, destacando principalmente *DOG1*.

DOG1 fue identificado como un *locus* específico de dormición mediante un análisis de QTLs (*quantitative trait locus*) en *Arabidopsis* (Alonso-Blanco *et al.*, 2003; Bentsink *et al.*, 2006; Bentsink *et al.*, 2010). Se ha descrito su expresión durante la maduración de semillas y pérdida de dormición en los mutantes *dog1*, así como su importancia en la dormición y su papel en la percepción de estímulos ambientales y en la adaptación a éstos (Kronholm *et al.*, 2012; Footitt *et al.*, 2013; Footitt *et al.*, 2014). Sin embargo, no ha sido

caracterizado ni molecular ni bioquímicamente: la proteína DOG1 de *Arabidopsis* es desconocida y la más cercana descrita es el factor de transcripción de trigo *Histone gene Binding Protein-1b* (HBP-1b), una cremallera de leucina que se une al promotor de los genes de histona 3 induciendo su expresión (Bentsink *et al.*, 2006). Se ha propuesto que esa sea también su función en *Arabidopsis*, pero varios de los dominios conservados en HBP-1b no se encuentran en DOG1, así que no es posible asignarle el mismo mecanismo de acción (Nonogaki, 2014).

Los transcritos de *DOG1* se acumulan durante la maduración de la semilla (su máximo se encuentra 14-16 días después de la polinización (DAP) (Bentsink *et al.*, 2006), se reducen en semilla fresca y desaparecen con la imbibición. La proteína sigue una dinámica parecida aunque no desciende hasta que la maduración ha finalizado, así que en semilla fresca hay gran cantidad DOG1, de hecho tras 13 semanas de *after-ripening* aún hay niveles bastante elevados en la semilla, pese a que la dormición ya ha desaparecido. Por lo tanto, no existe relación entre los niveles de DOG1 y el grado de dormición de la semilla, pese a la importancia de este gen en el proceso de dormición. La propuesta actual es que el estado de DOG1 es más importante que su cantidad en la regulación de la dormición: su forma activa mantendría la dormición y sería inactivada durante el *after-ripening* permitiendo la germinación, lo que se correspondería con el cambio en el punto isoeléctrico que experimenta DOG1 antes y después del *after-ripening*. La sobreexpresión inducible por calor de *DOG1* en *dog1* no provoca dormición y el 100 % de las semillas imbibidas son capaces de germinar, lo que abunda en la idea de que no es la presencia sino la forma en la que se encuentra DOG1 la que condiciona su actividad (Nakabayashi *et al.*, 2012). Esta modificación postraduccional puede ser mediante fosforilación, fundamental en el desarrollo vegetal y crucial en la actividad de otro importante regulador de la dormición, ABI5, cuya inducción en semillas imbibidas no es suficiente para inhibir la germinación, necesita de la activación por SnRK2 mediante fosforilación para conseguirlo (Piskurewicz *et al.*, 2008).

Se han identificado múltiples interactores de DOG1 mediante *screening* de doble híbrido en levadura (Y2H); entre ellos destaca PDF1, una proteína fosfatasa de tipo 2A cuya expresión está enriquecida en el aparato vascular del embrión (Miatton, 2012), coincidente con la localización de *DOG1* (Nakabayashi *et al.*, 2012). La expresión de PDF1 también alcanza máximos 16 DAP y se reduce en semillas maduras, y el mutante *pdf1* tiene un fenotipo de elevada dormición, antagónico a *dog1*. Todo esto sugiere que PDF1 es un

regulador negativo de la dormición y de *DOG1*, y que la fosforilación de *DOG1* es necesaria para que ésta sea activa y pueda inducir y mantener la dormición (Miatton, 2012).

De forma independiente a las modificaciones postraduccionales que sufra *DOG1*, se ha planteado la posibilidad de que la falta de dormición de *dog1* se deba a la función ejercida por la proteína durante la maduración de la semilla y que la cantidad de *DOG1* presente en la semilla madura sea residual (Nakabayashi *et al.*, 2012).

La regulación positiva de la dormición se lleva a cabo, además de por *DOG1*, por otros factores y mediante el control de la eficacia en la transcripción de genes relacionados con la dormición/germinación.

La eficacia de la transcripción viene determinada por la capacidad de reclutamiento de la ARN polimerasa II (ARN Pol II) en el ADN y su tasa de elongación de la transcripción. Uno de los mutantes aislados en un *screening* de dormición de semillas, *rdo* (*reduced dormancy*) (Léon-Kloosterziel *et al.*, 1996; Peeters *et al.*, 2002) está afectado en el gen *RDO2*, cuya caracterización descubrió que codificaba un factor de elongación de la transcripción de tipo S-II (TFIIS) (Liu *et al.*, 2011), cuya función es ayudar a la ARN polimerasa a continuar la elongación del ARN y aumentar su síntesis (Kim *et al.*, 2010). La mutación en *TFIIS* reduce la dormición (Grasser *et al.*, 2009), apuntando a su papel en la transcripción durante este proceso (Nonogaki, 2014).

El fenotipo de otros mutantes también apoyan esta hipótesis: TFIIS y ARN Pol II forman un complejo, análogo al de levadura, llamado *Pol II-Associated Factor 1 Complex* (PAF1C) (Penheiter *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). Los miembros de este complejo en *Arabidopsis* son ELF7, ELF8, VIP5 y VIP4. Todos los mutantes de estos genes presentan dormición reducida, lo que indica la importancia de este complejo en la elongación de la transcripción durante la dormición (Nonogaki, 2014).

La modificación de histonas es también importante en la tasa de transcripción, ya que influye en el acceso de la ARN polimerasa a la cromatina. PAF1C interacciona con Bre1, implicada en la monoubiquitinización de la histona 2B (H2B) en levadura (Kim *et al.*, 2009). *rdo4*, otro mutante de dormición de *Arabidopsis*, aislado en el mismo *screening* mencionado anteriormente, está afectado en el gen *H2B MONOUBIQUITINIZATION1* (*HUB1*), ortólogo de *Bre1* en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2007b). Bre1 interacciona con Set 1,

que metila la histona 3 en las lisinas 4 y 79 (H3K4, H3K79) (Sun and Allis, 2002) promoviendo la expresión génica. La mutación en el ortólogo de *Set1* en *Arabidopsis*, *ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED 7 (ATX47)* provoca también pérdida de la dormición (Liu *et al.*, 2011) y abunda una vez más en la hipótesis de que la regulación de la elongación de la transcripción es fundamental en el control de la dormición e incluye la remodelación de cromatina como uno de los mecanismos de regulación (Nonogaki, 2014).

La monoubiquitinización de H2B y las metilaciones H3K4 y H3K79, dependientes de la primera, activan la expresión génica. *hub1* presenta dormición reducida (Nakanishi *et al.*, 2009), así que, presumiblemente, los genes regulados por *HUB1* sean inductores de dormición. Como se esperaba, *ABI-INSENSITIVE4 (ABI4)*, *DOG1* y *NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE9 (NCED9)*, previamente descritos como reguladores positivos de la dormición, se han identificado como dianas de *HUB1/RDO4* (Liu *et al.*, 2007b).

Como se ha comentado previamente, la dormición/germinación es un proceso dual: para que la semilla permanezca durmiente es necesario activar los mecanismos inductores de la dormición y reprimir los activadores de la germinación, y lo contrario ocurre para inducir la germinación. Así que, a la vez que se induce la transcripción de genes que regulan positivamente la dormición (como *DOG1*, *NCED9* o *ABI4*, mencionados previamente), es necesaria la represión continua de los genes relacionados con la inducción de la germinación para mantener la dormición. En levaduras y mamíferos, la histona deacetilasa (HDAC) se sabe que interacciona con *SWI-INDEPENDENT3 (SIN3)*, que elimina grupos acetilo de lisina en las colas de histona y hace que el estado de la cromatina se vuelva transcripcionalmente inactivo (Grzenda *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, *SIN3-LIKE1 (SNL1)* interacciona con *HDA19*, el ortólogo de HDAC en *Arabidopsis*. El doble mutante *snl1 snl2* (*SNL* tiene dos copias en *Arabidopsis* parcialmente redundantes) presenta dormición reducida, al igual que *hda19*, apuntando al papel de reguladores positivos de la dormición de *SNL1* y *2* y *HDA19* (Wang *et al.*, 2013). La acetilación de H3K9/18 y H3K14 es superior en *snl1 snl2* que en el *wild-type*, de forma que el complejo *SIN3-HDAC* tiene como función la deacetilación de histonas, inhibiendo la transcripción de esa zona de cromatina y reprimiendo los genes diana de este complejo, probablemente genes inductores de la germinación, y provocando como efecto final el mantenimiento o inducción de la dormición (Nonogaki, 2014).

Mediante análisis transcriptómico por RNA seq del mutante *snl1 snl2* se han determinado los genes diana de SNL-HDA19. Entre ellos se encuentran muchos de los genes relacionados con el etileno: *1-AMINOCICLOPROPANO-1-CARBOXILATO OXIDASA1 (ACO1)*, *ACO4*, and *ACO5*, responsables de su síntesis, y genes de respuesta a etileno como *ETHYLENE RESPONSE FACTOR9 (ERF9)*, *ERF105*, and *ERF112*, que se encuentran inducidos e hiperacetilados en el mutante (Wang *et al.*, 2013). La represión de la síntesis y señalización del etileno por SNL-HDA19, descrita como inductora de la germinación de *Arabidopsis* (Chiwocha *et al.*, 2005), es uno de los mecanismos de este complejo de inducción la dormición. Se ha planteado también que SNL-HDA19 aumenta los niveles de ABA por inducción de *CYP707A1* y *CYP707A2*, genes responsables de la disminución de los niveles de ABA, que se encuentran inducidos en *snl1 snl2*, mientras que *NCED4* (gen que codifica la enzima limitante de la síntesis de ABA), se encuentra reprimido. Así que, en condiciones de inducción de la dormición, SNL-HDA19 aumenta los niveles de ABA suprimiendo los genes *CYP707A* y activando *NCED4* y también se ha descrito que el ABA es capaz de inducir la expresión de *SNL1* y *SNL2*, por tanto habría además una autorregulación positiva por parte del ABA para mantener la deacetilación de histonas y así la dormición (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, existe controversia en este punto, ya que, si bien la síntesis de ABA es regulada positivamente por SNL-HDA19, parece que la sensibilidad a la hormona es regulada de forma negativa por HDA19, sin que el significado de este efecto opuesto entre cantidad y sensibilidad a ABA se conozca por el momento, aunque es posible apuntar a una retroalimentación negativa para controlar los efectos de ABA (Chen *et al.*, 2010; Nonogaki, 2014).

La regulación negativa de la dormición se realiza mediante los mismos procesos: deacetilación de histonas y también por metilación de ADN e histonas.

La *HISTONA DEACETILASA 2B (HD2B)*, otro gen *HDAC*, también está relacionado con la dormición, aunque en este caso afecta de forma negativa y no positiva como en el ejemplo anterior. El QTL de *HD2B* se halló mediante el análisis de variación natural de SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) de 113 ecotipos de *Arabidopsis* con diferentes grados de dormición. Los niveles de expresión de *HD2B* son menores en las 24 accesiones con alta dormición respecto a las 28 con menor dormición. La transformación del ecotipo Cvi con el gen y promotor de *HD2B* del ecotipo Col reduce la dormición de este ecotipo con gran dormición, aunque no en semilla fresca sino después de *after-ripening* o estratificación fría (Yano *et al.*, 2013). En este proceso, la dormición se pierde mediante el aumento de

los niveles de GAs por la inducción de *GA3ox1* (apartado 1.5.2). En las semillas de Cvi transformadas, los niveles de *GA3ox1* y *GA3ox2* y de GAs son superiores a los de Cvi y los de *GA2ox2*, el gen responsable de la desactivación de GAs, inferiores, y estas inducciones o represiones es probable que se lleven a cabo mediante deacetilación de la cromatina que corresponde a estos genes (Nakabayashi *et al.*, 2012). Estos resultados reflejan que tres de las hormonas implicadas en la dormición son reguladas por deacetilación de histonas y que la regulación epigenética por remodelación de cromatina es un mecanismo que afecta a los niveles de hormonas en semillas de *Arabidopsis* (Nonogaki, 2014).

Se ha podido comprobar que un mismo proceso, como la acetilación de histonas, puede afectar a la dormición de manera positiva o negativa según el gen HDAC que participe, ya que HDA19 y HD2B regulan cada uno genes concretos. Esto también es cierto para la metilación de histonas: mientras que la metilación de H3K4 y H3K79 activa la expresión génica causando dormición, como en el caso de Set1 mencionado arriba, la dimetilación de H3K9 es una modificación represiva de la cromatina de los genes asociados a la dormición. El análisis del silenciamiento de *SUPERMAN* (*SUP*) de *Arabidopsis* identificó la metiltransferasa KRYPTONITE (*KYP*), que dimetila H3K9- La histona metilada es capaz de reclutar la ADN metiltransferasa CHROMOMETHYLASE3 (*CMT3*) mediante la interacción con HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (*HP1*), que provoca la metilación de la citosina de nucleótidos en el ADN silenciando el gen (Jackson *et al.*, 2002). Las semillas de *kyp-2* presentan alto grado de dormición, revelando la función de *KYP* en la supresión de la dormición. El mutante, además, tiene inducidos *DOG1* y *ABI3* respecto al genotipo silvestre, sobre los que *KYP* puede ejercer el silenciamiento mediante metilación de su ADN, afectando negativamente sobre la dormición (Zheng *et al.*, 2012).

El complejo de silenciamiento *KYP-CMT3* media la metilación de ADN dirigida por ARN (RdDM) que es provocada por pequeños ARNs de interferencia (ARNsis) producidos por DICER-LIKE3 (*DCL3*) y transportados por ARGONAUTE4 (*AGO4*) (Zilberman *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2005). Las proteínas *AGO* forman parte del complejo de silenciamiento inducido por RNA (*RISC*) y su función es la inducción del silenciamiento génico. Mientras que *AGO1* y *AGO10* inducen el silenciamiento génico de manera postraduccional (*PTFG*) mediante micro ARNs (*MIR*) y ARNs, *AGO4/AGO6/AGO9* ejercen el TGS por RdDM (Mallory and Vaucheret, 2010). Se sabe poco sobre el silenciamiento génico en dormición por RdDM, aunque se ha planteado que *AGO4* lo ejerza en dormición en cereales (Singh *et al.*, 2013).

1.2.4.1 Regulación de la Dormición Impuesta por el Endospermo y la Testa

Una vez que el embrión ha pasado de estado durmiente a germinativo y la represión de la germinación se ha eliminado, es posible que la semilla no sea capaz de germinar por la resistencia mecánica que ejercen los tejidos que la rodean, endospermo y testa. El grado de esta resistencia mecánica es el que determina la capacidad germinativa de un embrión con metabolismo activo cuya semilla ha sido imbibida, ya que la protrusión de los embriones no durmientes de sus cubiertas les permite germinar. Este efecto ejercido por las cubiertas se denomina dormición impuesta por la testa. Sin embargo, la capacidad de germinación de la semilla no depende sólo del aumento de potencial de crecimiento del embrión, sino que la alteración física de las cubiertas juega un papel muy importante. La testa de semillas maduras ya no es un tejido vivo (apartado 1.1.4) y sus cambios mecánicos dependen de los cambios fisiológicos que sufra el endospermo, tejido aún vivo. Los cambios en las propiedades del endospermo afectan de manera muy significativa a la emergencia de la radícula, por lo que el debilitamiento del endospermo es el factor de estudio más interesante en el estudio de las cubiertas (Bewley *et al.*, 2013a).

La región micropilar del endospermo rodea la punta de la radícula y es la que ejerce presión contra la germinación, siendo el tejido del endospermo que debe ser debilitado durante la germinación para que ésta se produzca. La resistencia mecánica es ejercida por la región micropilar por las paredes gruesas y rígidas que posee, así que es la modificación de la composición de la pared celular el componente principal del debilitamiento del tejido. De hecho, los genes que codifican enzimas modificadoras de pared celular, como xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XTHs) y expansinas (EXPs) se expresan de forma exclusiva en el endospermo micropilar de *Arabidopsis* durante la germinación (Dekkers *et al.*, 2013), siendo éste un mecanismo conservado en un amplio rango de especies (Bewley *et al.*, 2013a) (apartado 1.3.5).

1.3 Germinación

La germinación de semillas se trata de un proceso cuyo final está marcado por la emergencia del embrión a través de sus cubiertas protectoras, endospermo y testa en el caso de *Arabidopsis*. La absorción de agua por parte de la semilla, la imbibición, activa los procesos metabólicos que serán los responsables de la expansión del embrión y la penetración de la radícula a través del endospermo y la testa. La respiración para

proporcionar la energía necesaria en estos procesos se activa de manera inmediatamente posterior a la imbibición. La semilla seca dispone de ARNms sintetizados durante el proceso de maduración, muchos de ellos pertenecientes a genes relacionados con la dormición, que son degradados durante la imbibición, mientras que la transcripción de los genes relacionados con la germinación comienza también poco después de la imbibición. La expansión de los tejidos embrionarios debe luchar con la resistencia ejercida por las capas protectoras y el resultado entre el aumento del potencial de crecimiento del embrión y la disminución de la fuerza ejercida por el endospermo y la testa, determinará el éxito de la semilla en el proceso de germinación. La división celular no aparece hasta que la germinación ha sido completada (Bewley *et al.*, 2013b; Nonogaki, 2014).

Esta expansión que provoca la germinación, pese a ser denominada emergencia radicular, no se produce en la radícula, sino en una zona muy determinada y adyacente a ésta, que se identifica como la parte baja del hipocotilo y la zona de transición hipocotilo-radícula (Sliwinska *et al.*, 2009).

1.3.1 Definición y Medida de la Germinación

La germinación es el proceso que comienza por la toma de agua por la semilla, imbibición, y termina con la emergencia del eje embrionario, normalmente la radícula, a través de las estructuras que le rodean. Es un término habitualmente utilizado en Fisiología Vegetal pero no siempre con esta nomenclatura, y en ocasiones no se distingue del establecimiento o desarrollo de plántula, si no que se utiliza el término germinación para plantas que han finalizado este proceso, sin tener en cuenta el estado en el que se ha realizado la medida (Bewley *et al.*, 2013b).

Con intención de clarificar, en esta memoria se utilizará el término germinación para referirse únicamente a la observación de emergencia radicular de la semilla, lo que también se conoce como germinación *sensu stricto*, y el término establecimiento de plántula (*seedling establishment* o *cotyledon greening*) para la observación de plántulas con varios días de desarrollo y cotiledones plenamente desarrollados (*fully expanded*).

Tanto la germinación *sensu stricto* como el establecimiento de plántula son estados fácilmente visibles y medibles, pero en el caso de la germinación es una medición de un proceso finalizado, ya que los procesos previos a la emergencia radicular, como el agua que toma la semilla durante la imbibición, la respiración o las modificaciones de pared celular,

son complejos de monitorizar y cuantificar en una semilla. Por otro lado, la germinación en términos científicos es un proceso interesante a nivel población, lote o variedad de semillas más que como evento único. En consecuencia, el objetivo en la medida de la germinación es cuantificar la viabilidad potencial de una población de semillas en un momento concreto o a lo largo del tiempo. Las medidas

1.3.2 Fases de la Germinación

Con la imbibición de la semilla se inician una serie de complejos procesos, entre los que cabe destacar la puesta en marcha del metabolismo y el restablecimiento de las actividades celulares basales (**Figure 1.4**), que darán como resultado la ya mencionada emergencia radicular y con ella el final de la germinación y el comienzo del desarrollo post-germinativo. Durante la imbibición se pueden distinguir 3 fases (Schopfer and Plachy, 1984; Manz *et al.*, 2005), gracias a las cuales la semilla ganará entre un 60 y un 95 % de agua.

La fase I se caracteriza por la rápida toma de agua por parte de la semilla debido a la diferencia de potencial hídrico con el medio. Es un proceso principalmente físico y no tiene relación con el estado de la semilla ni su viabilidad, el agua entra en la semilla por sus cubiertas permeables, si las tiene, o a través de regiones específicas (Hamly, 1932; Turner *et al.*, 2009; Gama-Arachchige *et al.*, 2010). La hidratación de los tejidos permite la activación del metabolismo y la reanudación de los procesos celulares, que le permitirán entrar en la fase II y culminar la germinación, pero también acarrea perjuicios para la semilla. Dependiendo de la permeabilidad de las cubiertas se puede producir la pérdida de solutos como azúcares, proteínas o iones al medio. Además, si la imbibición se produce de forma brusca, habitual en semillas de gran tamaño o en aquellas con la testa dañada, la tensión física que produce una toma tan rápida de agua, en la que se pasa de células completamente secas a células hidratadas e hinchadas, puede provocar la rotura de paredes celulares, daño en los cotiledones y extrusión celular (Bewley *et al.*, 2013b).

En la fase II o fase de estabilización, el potencial hídrico está cerca de igualarse con el del medio, por tanto, la toma de agua se ralentiza hasta casi detenerse. Las células están totalmente hidratadas y el ligero aumento de contenido hídrico se debe a la producción de solutos osmóticamente más activos que sus precursores. Durante esta fase tienen lugar importantes procesos metabólicos, tanto en semillas durmientes como no durmientes. En

semillas con dormición, estos procesos se limitan a la recuperación de la integridad celular y de mitocondrias, inicio de la respiración y reparación de ADN, pero sin movilización de reservas ni síntesis de ARNm de genes de dormición. En semillas no durmientes, ocurren todos los procesos mencionados con el objetivo de conseguir la emergencia radicular. Muchos de estos procesos culminan durante la fase II, como la reestructuración del citoesqueleto o la reparación del ADN dañado durante el estado de semilla seca. Durante este estado, el citoesqueleto se despolimeriza y se organiza en cuerpos granulares dentro de las células, que tras 8h de imbibición reorganizan las subunidades de tubulina en la característica organización alrededor de la membrana plasmática (de Castro *et al.*, 2000).

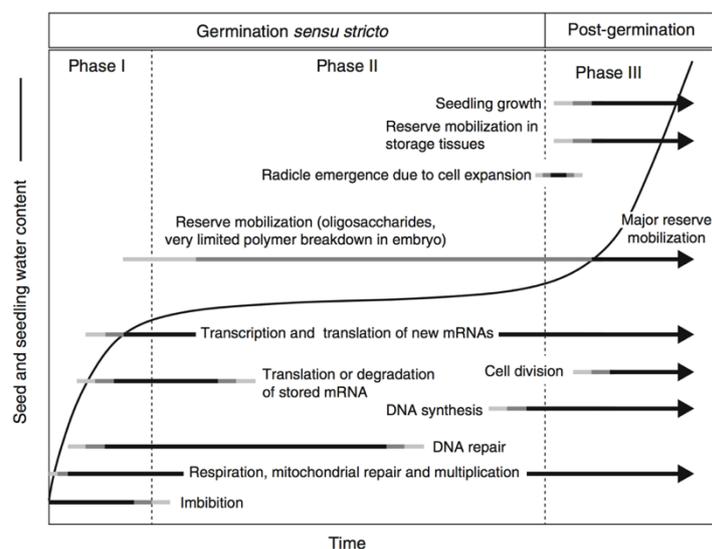


Figure 1.4 Time course de las fases I y II de la germinación de semillas y III de desarrollo temprano de plántula.

La fase I es un proceso físico que culmina cuando todos los tejidos de la semilla están completamente imbibidos. Durante la fase II, el contenido de agua de la semilla es constante y sus actividades metabólicas aumentan sobre todo por la transcripción de genes de germinación. La emergencia radicular a través de las estructuras protectoras del embrión marca el final de esta fase. Durante la fase III aumenta la toma de agua por parte de la plántula en desarrollo que está utilizando las reservas de la semilla para establecerse. La curva indica la toma de agua respecto al tiempo. Tomado de (Nonogaki *et al.*, 2010).

La fase III sólo es alcanzada por semillas viables no durmientes que son capaces de completar la germinación y entrar en esta fase; se caracteriza por una nueva toma de agua, que no se trata de una imbibición *per se*, sino una consecuencia del metabolismo activo que sufre la semilla y debido al crecimiento del embrión, se generan sustancias osmóticamente activas que producen un gradiente de agua y la relajación de las paredes celulares (Bewley *et al.*, 2013b).

1.3.3 Respiración Durante la Germinación

Como ya se ha mencionado anteriormente, la imbibición va acompañada del inicio de la respiración. Se han descrito tres vías respiratorias en semillas imbibidas, la glicolisis, la vía de las pentosas fosfato y la del ácido cítrico (ciclo de Krebs o ácido tricarbóxico). En semillas secas, aquellas con humedad menor del 15 %, la respiración es extremadamente baja, sin embargo, a los pocos minutos de la imbibición se produce un fuerte aumento del consumo de O₂ debido a la activación e hidratación de las enzimas mitocondriales. La respiración aumenta paulatinamente hasta que la hidratación de la semilla es total, momento en el cual se estabiliza o incluso disminuye el consumo de oxígeno; se producirá un nuevo aumento con la proliferación de las mitocondrias y la mayor disponibilidad de oxígeno cuando las cubiertas seminales sean perforadas. No es hasta que la emergencia radicular ha tenido lugar, que se produce la mayor parte de la movilización de las sustancias de reserva, sin embargo, la respiración requiere de sustratos para llevarse a cabo, y estos proceden de la hidrólisis de diversas moléculas, como los triacilglicéridos o los RFOs (Raffinose-Family Oligosaccharide) (Downie and Bewley, 2000; Bewley *et al.*, 2013b).

1.3.4 Síntesis de ARN y Proteínas Durante la Germinación

El paso de un metabolismo latente a uno activo requiere de la síntesis de ARN y nuevas proteínas que lleven a cabo los numerosos cambios bioquímicos y estructurales que serán necesarios. Las semillas maduras de *Arabidopsis* contienen más de 10.000 ARNms distintos, que reciben el nombre de ARNms residuales o de almacenamiento y se asocian en complejos de mensajeros ribonucleoproteicos (mRNPs). La mayor parte de estos transcritos pertenecen a las reservas de almacenamiento, proteínas de choque térmico, LEAs y enzimas encargadas de la biosíntesis de compuestos de reserva, siendo un reflejo de la transcripción imperante en las últimas etapas de la maduración de la semilla. La mayor parte de estos transcritos serán degradados en las primeras etapas de la imbibición, sin embargo, algunos serán traducidos a proteínas, aunque la necesidad de este suceso aún permanezca sin esclarecerse. Es posible que la degradación de mensajeros relacionados con la represión de la germinación sea necesaria para que ésta se produzca.

Pero en las primeras etapas de la germinación, no sólo encontramos transcritos existentes en semillas secas, sino que tiene lugar la transcripción *de novo*, principalmente de genes relacionados con el metabolismo basal y la recuperación de la actividad celular básica, como la respiración. Genes que tienen una alta tasa de transcripción durante la

imbibición son los relacionados con la movilización de las sustancias de reserva, que tendrán un papel fundamental en las primeras etapas post-germinativas. Sin embargo, no está claro que esta síntesis *de novo* sea necesaria para la germinación, pues aún en ausencia de transcripción, ya sea por inhibidores químicos o por daño masivo en el ADN (inhibe la replicación celular, no la transcripción), ésta tiene lugar, tal vez debido a la traducción de ARNm residuales (Rajjou *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2009; Bassel *et al.*, 2011).

Aunque la transcripción no es esencial para la germinación, sí lo es la traducción. La inhibición de la síntesis de proteínas bloquea la expansión del embrión y con ello la germinación, lo que nos indica que en la semilla seca ya se encuentra toda la maquinaria necesaria para que se produzca la síntesis de proteínas *de novo*. Las nuevas proteínas suelen estar relacionadas con la movilización de reservas (aunque este proceso es escaso) y con la expansión celular, como la tubulina o las expansinas, éstas últimas relacionadas con la relajación de las paredes celulares para permitir su expansión. Otras enzimas relacionadas con modificaciones de la pared celular son las xiloglucanasas, celulasas, poligalacturonasas y pectinmetiltransferasas, cuya expresión en el endospermo micropilar facilitará la protrusión de la radícula al debilitar las cubiertas que se oponen a la expansión celular del eje embrionario (Chen *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2003; Nonogaki and Bradford, 2007) (ver 1.3.5).

La replicación del ADN durante la germinación se produce en dos etapas. La primera de ellas tiene lugar durante las primeras etapas de la germinación y tiene por objeto reparar el material genético dañado durante la desecación de la semilla y la imbibición. La segunda tiene lugar con posterioridad, casi al final de la germinación, siendo la antesala de la división celular que seguirá a la germinación (Sliwinska, 2009).

1.3.5 Emergencia Radicular: Potencial de Crecimiento Embrionario *Versus* Resistencia Mecánica de los Tejidos

Para que la emergencia radicular se produzca, el equilibrio entre el potencial de crecimiento del embrión y la resistencia de las cubiertas debe ser alterado. Este cambio debe darse mediante el aumento del primero y la disminución de la segunda, o probablemente ambas. La imbibición por sí misma genera expansión celular y contribuye a la creación de un potencial inicial de crecimiento del embrión. Sin embargo, éste es un proceso pasivo y su fuerza no es suficiente para romper la resistencia de las cubiertas. Es necesario que se produzca una fuerza mayor, que sólo se da en semillas sin dormición, ya

que en semillas durmientes, el ABA reprime la expansión y la finalización de la germinación (**Figure 1.5**).

Varios mecanismos se han relacionado con la generación del potencial del crecimiento embrionario. Tras la fase II, ocurre una nueva toma de agua, más lenta, provocada por el descenso del potencial hídrico del embrión, que se produce por los solutos generados por la movilización de reservas. Estos solutos disminuyen el potencial osmótico de la célula y generan un gradiente de toma de agua que aumenta el volumen celular. Inicialmente, las paredes celulares ejercen resistencia a esta expansión celular, lo que aumenta el potencial de presión, contrarresta el potencial hídrico de la célula e interrumpe la toma de agua. Si continúa la acumulación de solutos, irá aumentando la toma de agua hasta que la fuerza ejercida por las células en estos tejidos sea lo suficientemente grande como para permitir a la radícula penetrarlos. Esta penetración, de manera lógica, tiende a ocurrir en el punto de menor resistencia de las coberturas. En muchos casos, la morfología de estos tejidos está ligeramente modificada para permitir la protrusión de la radícula llegado el momento.

La zona de transición hipocotilo/radícula del eje embrionario, adyacente a la punta de la raíz, es donde se produce la elongación durante la emergencia radicular. En semillas de *Arabidopsis*, la elongación de las células del eje embrionario sucede primero en una zona inmediatamente debajo de la punta de la radícula, el hipocotilo y la zona de transición (**Figure 1.5**). La punta de la radícula es literalmente empujada por la expansión de las células que se encuentran detrás de ella. Estas células están preparadas para entrar en la fase G2 de la mitosis pero no sufren división, sólo elongación. Existe amplia bibliografía que apoya que la finalización de la germinación se produce sin mitosis en muchas especies, proceso que sufren en etapas posteriores al crecimiento de la radícula.

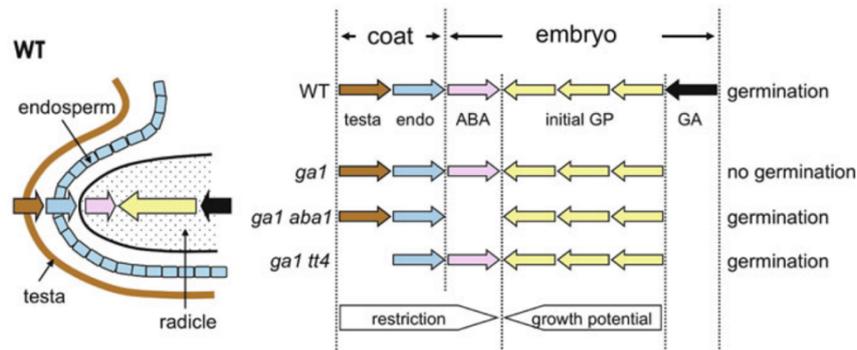
En las células del córtex y la endodermis de la zona de transición que sufren expansión, se produce la síntesis de la enzima limitante de la biosíntesis de GAs, así que esta hormona promueve el aumento del potencial de crecimiento del eje embrionario. Las GAs también inducen la síntesis de enzimas modificadoras de pared celular como xiloglucano endotransglicolasa/hidrolasas (XTHs) y expansinas (EXPs) en estos tejidos, que permiten la relajación de las paredes celulares. Las expansinas rompen enlaces de hidrógeno entre diferentes componentes de la pared celular, reduciendo la rigidez de la estructura. Esto permite la expansión celular gracias a la capacidad de reorganización de

las microfibrillas de celulosa. Las XTHs pueden romper y crear enlaces entre las hemicelulosas de xiloglucano que rodean las microfibrillas de celulosa y su función puede ser la de reorganizar la pared celular en la expansión. Sin embargo, es aún desconocido si las EXPs y XTHs son necesarias para la finalización de la germinación, ya que la mayor resistencia es ejercida por los tejidos del endospermo, y el debilitamiento de las paredes del endospermo micropilar es muy importante para que se produzca la emergencia radicular (Figure 1.5). En este tejido también se expresan otras enzimas modificadoras de la pared celular como celulasas, poligalacturonasas y pectin metilesterasas, así que el proceso de debilitamiento parece un proceso de cooperación entre un conjunto de enzimas.

Una alternativa o complemento a la acción enzimática en este proceso es la acción de compuestos químicos. Se ha descrito el aumento en la producción de radical hidroxilo en el apoplasto de células de la radícula y en el endospermo micropilar, que causa la ruptura de los polisacáridos de pared celular. En brassicáceas se ha descrito que el ABA inhibe la producción de este radical hidroxilo, pero al descender con la inducción de la germinación, los niveles del radical hidroxilo aumentan (Mueller *et al.*, 2009).

Las hipótesis 1 y 2 de la **Figure 1.5** plantean de forma separada el aumento del potencial de crecimiento del embrión y el descenso de la resistencia mecánica del endospermo micropilar, pero estos sucesos no son mutuamente excluyentes sino que, de hecho, suceden de forma simultánea. En la figura se explican los fenotipos de diferentes mutantes de *Arabidopsis* deficientes en GAs (*ga1*), deficientes en GAs y ABA (*ga1 aba1*) y deficientes en GAs y con la mutación *transparent testa* (*ga1 tt4*) (apartado 1.1.4).

Hypothesis 1 - embryo growth potential increase



Hypothesis 2 - reduction in the mechanical resistance of the endosperm

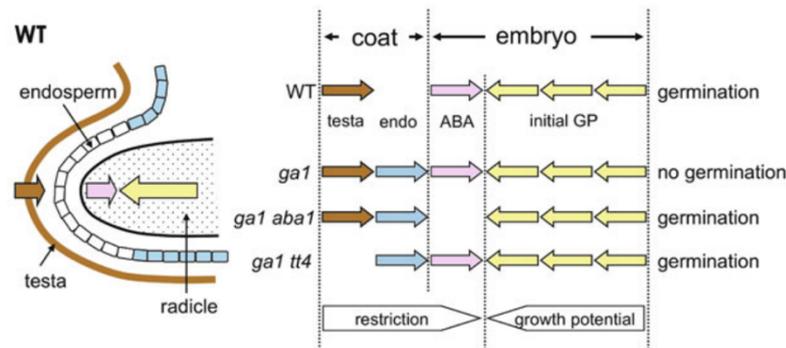


Figure 1.5 Dos hipótesis que explican la relación entre la radícula del embrión y el endospermo micropilar adyacente y la testa durante la germinación de semillas.

Explicado en el texto. Endo: endospermo micropilar, GP: potencial de crecimiento. Las flechas explican las fuerzas ejercidas por cada elemento. Tomado de (Nonogaki, 2006).

Como se ha comentado previamente, estas hipótesis no sólo no son mutuamente excluyentes sino que el aumento del potencial de crecimiento del embrión y la disminución de la resistencia mecánica pueden suceder de manera simultánea (Nonogaki, 2006; Bewley *et al.*, 2013b).

1.4 Desarrollo postgerminativo : hipocotilo

En las dicotiledóneas epigeas, como *Arabidopsis*, tras la germinación, el hipocotilo (concretamente la región superior de la zona de transición hipocotilo/radícula), sufre expansión para permitir la emergencia de los cotiledones por encima de la superficie (Bewley *et al.*, 2013b).

El hipocotilo de *Arabidopsis* sólo tiene 20 células epidérmicas desde la base hasta el ápice. La mayoría de ellas se forman durante el desarrollo del embrión, se producen muy pocas divisiones y el crecimiento ocurre básicamente por elongación (Gendreau *et al.*, 1997).

La arquitectura del hipocotilo es muy sencilla: transversalmente, desde el haz vascular hacia fuera tiene una capa de endodermis, dos de tejido cortical y una barrera de células epidérmicas (Gendreau *et al.*, 1997). La epidermis tiene dos tipos de filas de células longitudinales, unas sobresalientes (*protruding*) y otras no sobresalientes; los estomas se desarrollan en las no sobresalientes (Berger *et al.*, 1998). El patrón de las células epidérmicas del hipocotilo se determina de forma temprana desde los primeros estadios del desarrollo embrionario (apartado 1.1.1) y se mantiene en los procesos posteriores (Vandenbussche *et al.*, 2005).

Pese a su organización tridimensional, el crecimiento es unidireccional (en la dirección de la elongación), así que el crecimiento del hipocotilo puede ser analizado como un fenómeno unidimensional. La elongación del hipocotilo es el resultado de la integración de múltiples señales internas y externas: luz, gravedad, temperatura y las hormonas auxinas, citoquininas, etileno, GAs y BRs. Dependiendo de la dirección de la señal, la gravedad o del ángulo de la luz incidente en la planta, puede haber diferencias en el crecimiento. Esto permite a los cotiledones crecer mientras se orientan hacia la luz para poder realizar la fotosíntesis y en sentido contrario a la gravedad. Para ello, los hipocotilos se doblan y crecen hacia la fuente de luz, como respuesta fototrópica regulada por las proteínas receptoras de la luz y la distribución de auxinas. El gravitropismo negativo del hipocotilo también está regulado por auxinas. La percepción y señalización de la gravedad se realiza por la endodermis y también es controlado por auxinas, que inducen el crecimiento de las células de las capas más externas, epidermis y córtex (Vandenbussche *et al.*, 2005). De hecho, el crecimiento por elongación se da básicamente a nivel de epidermis (Kutschera and Niklas, 2007; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2007).

Además, la diferenciación funcional se ve reflejada en una expresión génica característica de cada tejido. Por ejemplo, se ha descrito la expresión diferencial de las señales más fuertes en la vasculatura de hipocotilos, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, de MSG2/IAA19, que actúa en un bucle de retroalimentación negativa regulando las respuestas de crecimiento diferencial del hipocotilo y la formación de raíces laterales (Tatematsu *et al.*, 2004). La elongación no se da de forma equivalente en todas las células del hipocotilo, de hecho, los mecanismos de elongación del hipocotilo en condiciones de oscuridad son diferentes a aquellos que se dan en luz, ya que en ausencia de luz muestra crecimiento celular de tipo acropétalo. Esto implica que en condiciones de oscuridad, se elongan primero las células basales y la zona de elongación se va desplazando

hacia el ápice con el tiempo. Por otro lado, la luz inhibe fuertemente el crecimiento del hipocotilo (Gendreau *et al.*, 1997).

La integración de estas señales, se realiza mediante regulación hormonal, básicamente por auxinas (apartado 1.5.6.2).

1.5 Hormonas reguladoras del desarrollo de semillas, dormición/germinación y desarrollo temprano

Todos los procesos de desarrollo están finamente controlados por los reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal: las hormonas. Por definición, las hormonas vegetales son moléculas señalizadoras activas a bajas concentraciones (10^{-5} - 10^{-7} M) en sus células diana, que pueden coincidir o no con el tejido en el que son sintetizadas. En plantas, las hormonas juegan un importante papel: convertir señales ambientales en señales internas (Taiz *et al.*, 2015).

Hay seis tipos fundamentales de hormonas vegetales: ABA, GAs, auxinas, citoquininas, etileno y BRs.

1.5.1 Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es una molécula de tipo isoprenoide formada a partir de precursores de tipo carotenoide en los plastos. Su nombre se debe a que se describió como la molécula responsable de la abscisión aunque ahora se sabe que no es la responsable de ese proceso sino de la señalización de estreses ambientales y de la maduración de semillas. En este proceso, sus funciones abarcan la inducción de la síntesis de proteínas de reserva en la semilla, la adquisición de tolerancia a la desecación y la inducción y mantenimiento de la dormición de semillas (Bewley *et al.*, 2013c).

1.5.1.1 Síntesis de ABA

Es un sesquiterpenoide (15C) que procede de la condensación de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y genera el compuesto isopentenil pirofosfato (IPP). El IPP se introduce en la ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato o ruta independiente de mevalonato (MEP), generándose inicialmente licopeno y β -caroteno (15C) y posteriormente zeaxantina (C40). La zeaxantina se escinde en violaxantina por la zeaxantina epoxidasa. Posteriormente se forman la 9'-cis-neoxantina y 9-cis-violaxantina

que son convertidas en xantonina (15C), reacción catalizada por la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), siendo ésta la más crítica y limitante de la ruta. La xantonina es trasladada al citoplasma, donde se convierte en ABA-aldehído mediante la acción de una alcohol deshidrogenasa. Finalmente el ABA-aldehído es transformado en ABA activo mediante la enzima ABA aldehído oxidasa (AAO). La inactivación del ABA es llevada a cabo por CYP707A2, una 8'-hidroxilasa, o por conjugación con glucosa formando el éster de glucosa y ABA (ABA-GE) (Nambara and Marion-Poll, 2005).

1.5.1.2 Regulación de ABA

El paso limitante en la producción de ABA es la enzima NCED, descubierta en maíz (Schwartz *et al.*, 1997), es un gen ampliamente representado en el reino vegetal. Es más, se conocen numerosos genes que forman parte de la familia NCED, lo que abre un amplio abanico de posibilidades de expresión espacio-temporal. En *Arabidopsis*, se identificaron dos miembros de esta familia, NCED6 y NCED9, esenciales para la síntesis de ABA en el embrión y el endospermo durante la inducción de la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006). En semillas, NCED6 se expresa de forma específica en el endospermo mientras que NCED9 se expresa tanto en endospermo como en testa y en las células periféricas del embrión en desarrollo. Además, la inducción de NCED6 en semillas no durmientes imbibidas provoca la supresión de la germinación. Así que la ruta de los carotenoides y de síntesis de ABA debe estar activa incluso en semillas no durmientes y sus sustratos se sintetizan incluso en semillas capaces de germinar. Este remanente de sustratos de síntesis de ABA puede tener la importante función biológica de permitir una respuesta rápida a cambios ambientales que dificulten la supervivencia de la semilla germinada y bloqueen temporalmente la germinación o induzca la dormición secundaria en condiciones especialmente adversas. Además, la continua síntesis de ABA mediada por NCED es necesaria para el mantenimiento de la dormición como demuestra que la supresión de su síntesis por inhibidores específicos, como la fluridona o el norfluorazón, induce la germinación en semillas durmientes (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2006).

Como se ha comentado previamente, la síntesis no es el único mecanismo de regulación del ABA, sino también su catabolismo. En *Arabidopsis*, la enzima responsable de esta disminución en los niveles de ABA durante el final de la maduración y la imbibición de la semilla es una 8'-hidroxilasa codificada por un miembro del citocromo P450, la CYP707A2 (Kushiro *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006).

1.5.1.3 Ruta de señalización de ABA

El tercer aspecto fundamental para la modulación de la acción hormonal es la percepción de la hormona, que varía según el momento de desarrollo y el tipo celular. Durante el desarrollo de la semilla y en semillas maduras imbibidas la respuesta a cambios en la concentración de ABA es muy rápida, ya que poseen todos los elementos necesarios para su percepción y respuesta (Bewley *et al.*, 2013a). La ruta de señalización del ABA se inicia con la percepción de la hormona por sus receptores, las proteínas PYR-PYL/RCAR (Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009), a las cuales se une iniciando una cascada de modificaciones postraduccionales de varias proteínas. En ausencia de ABA, las proteínas fosfatasa tipo 2C del grupo A (PP2Cs) reprimen de manera constitutiva a las *Sucrose non-fermenting-Related Protein Kinase 2* (quinasas de tipo SnRK2), reguladores positivos de la respuesta a ABA. Esta represión se produce por defosforilación continua del sitio activo de las quinasas SnRK2. La conformación de las proteínas PYR-PYL/RCAR cambia tras su unión a la hormona permitiendo su unión a las PP2Cs, liberando a las SnRK2s de su inhibición. Las SnRK2s son entonces capaces de fosforilar los factores de unión a ABRE (ABRE BINDING FACTOR, ABF), que inducirán la respuesta a ABA (Kobayashi *et al.*, 2005; Umezawa *et al.*, 2010; Finkelstein, 2013).

1.5.1.4 El ABA en la dormición/germinación

Durante la maduración de las semillas, se producen 2 picos en los niveles de ABA, el primero tiene su origen en los tejidos maternos (Karssen *et al.*, 1983; Kanno *et al.*, 2010), mientras el segundo, responsable de la inducción de la dormición en la fase de desecación de la semilla tiene origen embrionario (Karssen *et al.*, 1983; Frey *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que en la regulación de los niveles de ABA en la semilla tienen un papel fundamental las proteínas NCED, en su síntesis *de novo*, y la proteína CYP707A, en su degradación, que regularán la dormición y germinación en respuesta a las condiciones ambientales (Nambara & Marion-Poll, 2005; Seo *et al.*, 2009; Nambara *et al.*, 2010). De los 5 genes *NCED* de *Arabidopsis*, dos de ellos tienen elevados niveles de expresión en la semilla, *NCED6* que se expresa en el endospermo y *NCED9* que se expresa en testa y endospermo, contribuyendo ambos a la inducción de la dormición (Lefebvre *et al.*, 2006; Frey *et al.*, 2012). La degradación de ABA por CYP707A durante la maduración de la semilla también regula los niveles de ABA en semilla seca y el grado de dormición, como ha demostrado el análisis del mutante *cyp707a* (Okamoto *et al.*, 2006).

Tras la imbibición, el mantenimiento de la dormición también está regulado por la síntesis y el catabolismo del ABA. Durante la imbibición se ha observado una disminución en los niveles de ABA tanto en semillas durmientes como en no durmientes de varias especies. A pesar de ello, las semillas con dormición mantienen niveles de ABA más elevados y tienen menor cantidad de transcritos de *CYP707A*, siendo estos resultados observados tanto en *Arabidopsis* como en cebada (Millar *et al.*, 2006).

La dormición secundaria debida a los ciclos estacionales también está relacionada con el metabolismo del ABA y su señalización. La dormición profunda inducida en invierno se ha relacionado con niveles elevados de ABA y la expresión de *NCED6* y *DOG1* (*DELAY OF GERMINATION 1*), y *MFT* (*MOTHER OF FLOWERING LOCUS T*). *MFT* codifica una proteína de unión a fosfatidiletanolamina, la cual está regulada por *ABI3* y *ABI5*, y a su vez regula negativamente a *ABI5* reprimiendo la señal del ABA (Xi *et al.*, 2010). De forma opuesta, la dormición suave establecida en verano está relacionada con niveles reducidos de ABA y regulación positiva de *CYP707A2* y *ABI2*, reguladores negativos de la señalización de ABA (Footitt *et al.*, 2011).

Pese a que en *Arabidopsis* el endospermo está formado por una sola capa de células, en semillas maduras desempeña un papel fundamental en el control de la dormición y la germinación regulados por ABA. En primer lugar, así como la retirada de la cubierta completa de la semilla (endospermo y testa) libera las restricciones mecánicas y permite el desarrollo de embriones diseccionados a partir de semillas durmientes, el mantenimiento del endospermo tras la retirada de la testa mantiene la dormición (Bethke *et al.*, 2007). En segundo lugar, utilizando un lecho de cubiertas de semillas (coat bedding) se demostró que la difusión del ABA endospermico de semillas durmientes impide el crecimiento de embriones no durmientes, incluso de mutantes *aba2*, deficientes en la síntesis de ABA (Lee *et al.*, 2010). En embriones aislados, el ABA procedente de estas cubiertas fue capaz de inducir la acumulación de *ABI5*, cuyos niveles están relacionados con el mantenimiento de la dormición. La especificidad tisular de la sensibilidad a ABA probablemente también esté regulada por la expresión espacio/temporal de las proteínas *PYR/PYL/RCAR* y otros elementos de la ruta de señalización principal como las PP2Cs o las SnRKs (Koornneef *et al.*, 1984; Fujii and Zhu, 2009; Nakashima *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2010; Gonzalez-Guzmán *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013).

Además de la síntesis de ABA y los elementos de su ruta de señalización principal, existen otras proteínas que participan en la regulación de la dormición de la semilla mediada por ABA. El factor de transcripción ABI4, de tipo APETALA/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF), es un regulador positivo de la dormición al inducir la biogénesis del ABA y reducir la de las GAs en semilla (Penfield *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2013). Otros genes implicados en la maduración de las semillas son *ABI3*, *FUSCA3* (*FUS3*) y *LEAFYCOTYLEDON 2* (*LEC2*), que codifican factores de transcripción tipo B3, que controlan el almacenamiento de reservas y las proteínas LEA en la maduración de la semilla. Mutantes de estos genes presentan intolerancia a la desecación y germinación precoz debida probablemente a defectos durante la maduración (Gutiérrez *et al.*, 2007; Finkelstein *et al.*, 2008; Santos-Mendoza *et al.*, 2008; Graeber *et al.*, 2012). Además, la mutación *fus3* altera los niveles de ABA en semillas en desarrollo (Gazzarrini *et al.*, 2004).

El mantenimiento de la dormición está relacionado con la síntesis de ABA durante la imbibición, principalmente en el endospermo (Lee *et al.*, 2010), mientras en la salida de la dormición se produce un aumento en el catabolismo del ABA en el embrión y el endospermo inducido por GAs (apartado 1.5.6.1).

Los niveles de ABA también participan en la regulación de la germinación por disponibilidad de nutrientes. La adición de nitrato, tanto exógena en la germinación como por vía materna durante el desarrollo de la semilla, conlleva el incremento de la expresión de *CYP707A2* y con ello la disminución del ABA y de la dormición (Matakiadis *et al.*, 2009). Por otro lado, un amplio rango de concentraciones de azúcar (5-300 mM) retrasan la germinación de forma más prolongada que otros estreses osmóticos comparables y su efecto inhibitorio del crecimiento en plántula es sinérgico con el del ABA (Laby *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2003; Dekkers *et al.*, 2004). El mecanismo de inhibición por azúcares incluye la participación del ABA por aumento de su síntesis y disminución de su catabolismo (Xing *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011) y la inducción y estabilización de reguladores de su ruta como los factores de transcripción ABI (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009; Finkelstein *et al.*, 2011).

La relación del ABA con los nutrientes durante la germinación también incluye la inhibición de la movilización de los lípidos de reserva, aunque no la bloquea del todo, lo que conlleva la acumulación de sacarosa derivada del triacilglicerol (Pritchard *et al.*, 2002). Bajo condiciones de estrés el catabolismo de los lípidos está limitado al endospermo debido

a la represión del ABA por medio de ABI4, que sólo se expresa en el embrión, induciendo la quiescencia del embrión (Penfield *et al.*, 2006). De la misma forma, la inducción de ABI5 por bajos niveles de sacarosa y ABA está estrechamente relacionada con el mantenimiento de la tolerancia a la desecación de plántulas con desarrollo detenido (*arrested seedling*) (López-Molina *et al.*, 2001). EL ABA, ABI5 y posiblemente otros factores de transcripción puedan prevenir la pérdida de la tolerancia a la desecación retrasando la salida de la fase dos de la germinación (el periodo tras la imbibición cuando el metabolismo se incrementa pero el crecimiento se detiene) en condiciones de baja humedad. A diferencia de ABI4, ABI5 se expresa en la región del endospermo micropilar, donde puede inhibir la expresión de enzimas requeridas para el ablandamiento de las cubiertas y limitar la emergencia radicular.

1.5.2 Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas inductoras del crecimiento, implicadas en muchos aspectos del desarrollo vegetal además de la germinación, como crecimiento vegetativo, floración y producción de polen. Los mutantes deficientes en GAs tienen fenotipo enano y son incapaces de germinar (Bewley *et al.*, 2013c).

Los efectos principales de las GAs en el desarrollo de semillas son la inducción de división y elongación, la inducción de pérdida de dormición y consecuentemente de la germinación, la inducción de producción de α -amilasa y la movilización de reservas de almidón.

1.5.2.1 Síntesis de GAs

Son un amplio grupo de hormonas cuya característica común es el esqueleto de ent-giberelano. Se nombran como GA₁...GAN por orden de descubrimiento. El ácido giberélico (GA₃) fue la primera en ser caracterizada, aunque existen más de ciento cincuenta descritas en plantas, hongos y bacterias. Las GAs activas en semilla son GA₁ y GA₄, ya que son las nativas de este órgano, aunque el uso extrínseco de GA₃ produce efectos análogos. Hay unas 130 moléculas de GAs en plantas, la mayoría de ellas inactivas, intermediarias de la ruta de síntesis. Sólo un pequeño número de ellas son activas. El precursor de la síntesis de GAs es el geranil-geranil-difosfato (GGDP), que es convertido a ent-kaureno (20C) por la ent-copalil difosfato sintasa (CPS) y la ent-kaureno sintasa (KS). El mutante *ga1* de *Arabidopsis* presenta déficit en la enzima CPS, es incapaz de sintetizar GAs y sus semillas

necesitan el aporte exógeno de GAs para poder germinar. El ácido ent-kaurenoico se convierte en muchas formas inactivas de GAs antes de que GA_{12} se convierta en GA_9 por la GA_{20} oxidasa ($GA_{20}ox$). El último paso de esta ruta, la catálisis de GA_9 a GA_4 en *Arabidopsis* por la enzima GA_3 oxidasa ($GA3ox$), es el limitante (Thomas *et al.*, 2005). La $GA3ox$ es codificada por dos genes en *Arabidopsis*: *GA3ox1* y *GA3ox2*. Los mutantes simples de estos genes son capaces de germinar mientras que el doble no, reflejando la función redundante de ambos en este paso crucial para la síntesis de GAs. La expresión de GA_3ox se produce en el eje embrionario, aportando el potencial necesario de crecimiento del embrión. En *Arabidopsis*, los genes *AtGA₃ox1* y *AtGA₃ox2* se expresan de forma específica en la zona expansión celular en la zona de transición hipocotilo-radícula, indicando la función de las GAs en la expansión celular durante la germinación (Rieu *et al.*, 2008).

1.5.2.2 Regulación de GAs

La ruta de síntesis de las GAs consta de numerosos pasos, teniendo como punto de partida el geranil-geranil difosfato (GGDP), que comparte con la ruta de síntesis del ABA, y como último paso de la ruta, y limitante, el catalizado por la $GA3ox$, que transforma GAs inactivas en activas, como GA_9 y GA_4 en *Arabidopsis* o GA_{20} y GA_1 en lechuga (Hedden and Kamiya, 1997; Nakaminami *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, hay 2 genes que codifican para $GA3ox$ principalmente en semilla, *AtGA3ox1* y *AtGA3ox2*, ambos inducidos por la estratificación en frío, y que proporcionan al embrión potencial de crecimiento mediante expansión celular en la zona de transición hipocotilo-radícula (Ogawa *et al.*, 2003).

Cuando la cantidad de GAs activas es excesiva o ya no son necesarias se convierten en una forma inactiva. Este paso se realiza en gran medida gracias a la GA_2 oxidasa ($GA2ox$), que reduce la cantidad de GAs activas en semilla y tiene un papel muy importante en la regulación de la germinación por luz (Rieu *et al.*, 2008). Otra enzima que puede catalizar este proceso es la GA metiltransferasa, aunque ésta última actúa principalmente en durante el desarrollo de la semilla (Varbanova *et al.*, 2007).

1.5.2.3 Ruta de señalización de GAs

La ruta de transducción de las GAs se encuentra bloqueada por las proteínas DELLA, que en ausencia de la hormona inhiben la transcripción de los genes de respuesta a GAs. En concreto, RGA-LIKE2 (RGL2) es la responsable de la inhibición de la germinación. Pero en presencia de GAs activas éstas se unirán a su receptor, GA-INSENSITIVE DWARF (GID1),

que interactará entonces con RGL2 permitiendo que sea reconocida por SLEEPY1 (SLY1), una E3 ubiquitín-ligasa que forma parte del complejo SCF (Skp, Cullin y F-box), que añadirá residuos de ubiquitina a RGL2. La degradación de RGL2 por el proteosoma es un paso clave en la eliminación de la dormición y la inducción de la germinación (Tyler *et al.*, 2004).

1.5.3 Auxinas

En 1880, Charles Darwin descubrió un inductor del crecimiento capaz de transmitir sus efectos de una planta a otra mediante un experimento con coleoptilos (Darwin and Darwin, 1880) que 50 años más tarde fue caracterizado como ácido indolacético (IAA), y el grupo de hormonas como auxinas (Kögl and Kostermans, 1934; Went and Thimann, 1937). A nivel molecular, las auxinas son compuestos que poseen un anillo aromático y un ácido carboxílico. Auxina es un término genérico que se asigna a estas moléculas que se pueden encontrar en plantas, animales y microorganismos (Teale *et al.*, 2006). El miembro más importante es el IAA, que genera la mayoría de los efectos auxínicos en plantas y es la auxina natural más potente. Hay otras tres auxinas endógenas (4-cloroindol-3-ácido acético, ácido fenilacético y ácido indol-3-butírico) y compuestos sintéticos con actividad auxínica que se utilizan como herbicidas: ácido naftalenacético y ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) (Simon and Petrášek, 2011).

Las auxinas son reguladores de múltiples procesos de desarrollo (Woodward and Bartel, 2005; Teale *et al.*, 2006) en plantas como la estimulación de la elongación celular, la promoción del crecimiento de la raíz principal y raíces laterales, la mediación en tropismos como la curvatura en respuesta a gravedad y a luz, la regulación de la formación del patrón de desarrollo durante la embriogénesis, la regulación de la diferenciación y dominancia apical y el control de senescencia, abscisión y floración.

Sus efectos en plantas pueden extenderse a animales, ya que se ha descrito que la fotoactivación de auxinas puede tener efecto citotóxico en terapias contra el cáncer (Folkes and Wardman, 2001).

1.5.3.1 Síntesis y transporte de auxinas

La síntesis de IAA y su regulación por factores externos y señales del desarrollo es una cuestión poco conocida. Para su síntesis *de novo* son necesarias múltiples señales y es muy compleja, habiéndose propuesto diversas rutas de síntesis.

Entre todas ellas destacan dos tipos: las rutas dependientes y las independientes de triptófano (Woodward and Bartel, 2005; Chandler, 2009; Normanly, 2010). En la biosíntesis de IAA independiente de triptófano el precursor es el indol-3-glicerol fosfato, pero no se conoce en profundidad (Zhang *et al.*, 2008). Se han postulado una gran cantidad de rutas dependientes de triptófano (Woodward and Bartel, 2005; Pollmann *et al.*, 2006; Chandler, 2009; Mano *et al.*, 2010): la ruta del indol-3-acetamida (IAM), del indol-3-ácido pirúvico (IPA), de la triptamina (TAM) y del indol-3-acetaldoxima (IAOX).

Además, pese a que algunos de los genes de síntesis de IAA sí se conocen, las bases genéticas de su síntesis y regulación se desconocen, aunque se sabe que todas las rutas descritas existen en todas las especies en las que se han investigado (Mano *et al.*, 2010). Tanto la síntesis *de novo* como su catabolismo (por hidrólisis y conjugación) determinan la homeostasis de IAA y los niveles en las células. La capacidad de síntesis de IAA se encuentra en los tejidos meristemáticos y en la parte aérea de tejidos jóvenes y también en raíces.

Todos estos factores son muy importantes para la distribución de IAA, pero en el caso de las auxinas hay un elemento más: el transporte. Las auxinas son las únicas hormonas vegetales que son específica y activamente transportadas (Teale *et al.*, 2006). De hecho, el patrón de respuesta a auxina está determinado más por la capacidad de las células de transportar auxinas que por las tasas de síntesis y conjugación.

La redistribución de auxinas implica a muchas proteínas (Teale *et al.*, 2006), de las que las más importantes son las proteínas PIN: una familia de proteínas de membrana localizadas de forma polarizada que dirigen el flujo de estas hormonas (Okada *et al.*, 1991; Gälweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2003; Ottensschläger *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Paponov *et al.*, 2005; Paponov *et al.*, 2008).

Las proteínas PIN están relacionadas con las proteínas transportadoras bacterianas y se distribuyen de forma polar en la dirección del transporte de auxinas (Teale *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006). Los mutantes *pin1* de *Arabidopsis* presentan un fenotipo tras la

transición floral en el que aparece un solo tallo, sin flores ni ramas (Okada *et al.*, 1991), debido a la carencia de transporte de auxinas.

Existen ocho proteínas PIN en *Arabidopsis* cuya expresión se distribuye a lo largo del desarrollo y en toda la planta (Paponov *et al.*, 2005). Cinco de ellas se han caracterizado y muestran localización polar subcelular. Sin embargo, la localización de PIN1 (cuyo mutante *pin1* presenta el fenotipo más drástico) es desconocida. En el caso de PIN2 y PIN7, su expresión en sistemas heterólogos mantiene el transporte de IAA, así que se ha planteado la posibilidad de que las proteínas PIN sean suficientes para realizar el transporte de auxinas (Petrásek *et al.*, 2006).

La localización de las proteínas PIN es dinámica pudiendo cambiar rápidamente, y esos cambios son los que determinan la concentración de auxinas y los procesos de desarrollo asociados, como desarrollo embrionario (Friml *et al.*, 2003) o gravitropismo (Müller *et al.*, 1998). El mecanismo que subyace esta localización polar de las proteínas PIN es la existencia de vesículas endocíticas, que permiten cambios rápidos de localización y reciclaje de estas proteínas dentro de la membrana plasmática. La inducción de esas vesículas proviene de la auxina (Petrásek *et al.*, 2006).

Se han propuesto diferentes papeles para las proteínas PIN, aunque es evidente que existe un gran solapamiento entre ellas. Los mutantes *knock out* de una de ellas pueden ser complementados por otra y muestran adaptabilidad en las células en las que son expresadas aunque no sean nativas de éstas (Noh *et al.*, 2003).

Las proteínas PIN son reguladas por el tráfico de vesículas (Geldner *et al.*, 2003) y por fosforilación: una serín/treonín fosfatasa de tipo 2A, RC21, defosforila, inactivando estas proteínas (Rashotte *et al.*, 2001), mientras que la serín/treonín fosfatasa PINOID (PID), la fosforila activándolas (Kleine-Vehn *et al.*, 2009).

1.5.3.2 Rutas de señalización de auxinas

ABP1 es un receptor de auxinas, que también puede jugar un papel en la activación de H⁺-ATPasas, en la llamada respuesta rápida a auxinas. ABP1 está localizado en el retículo endoplasmático principalmente, pero una parte puede ser secretado a la parte externa de la membrana plasmática donde interacciona con auxinas y genera el aumento de presión de los protoplastos y el bombeo de H⁺. Sin embargo, ABP1 no es el único

receptor, ya que muchos de los genes de respuesta a auxinas no están inducidos por ABP1 (Venis, 1995; Steffens *et al.*, 2001). Recientemente, se ha relacionado a una de las familias de genes de respuesta rápida a auxinas, SAUR, con la acción de la H⁺-ATPasa, AHA2 (Spartz *et al.*, 2014). De la caracterización de dos genes SAUR y su relación con la expansión y el crecimiento trata el capítulo 3 de esta memoria (**Chapter 3**).

Los genes inducidos por auxinas se pueden clasificar en dos tipos: tempranos y tardíos. Los genes tempranos tienen como funciones principales la regulación de los tardíos (necesarios para respuestas a largo plazo), señalización célula a célula o adaptaciones a estrés.

Las familias de genes reguladores de crecimiento son: la familia AUX/IAA, la familia SAUR y la familia GH3. Los genes responsables de la respuesta a estrés son genes que codifican glutatión S-transferasas y genes que codifican la 1-ácido carboxílico-1-aminociclopropano (ACC, precursor del etileno) sintasa (Taiz *et al.*, 2015)

Las proteínas Aux/IAA median la inducción transcripcional de las primeras respuestas a auxinas (Gray *et al.*, 2001). Su función es represora y la ruta de señalización engloba a las proteínas TIR (*transport inhibitor response1*), ARF (*auxin response factor*) y la ruta de degradación por ubiquitinación vía proteosoma. Las proteínas ARF tienen dominios de unión al ADN que se unen a las regiones promotoras de genes en los que activan o reprimen la expresión génica. Las proteínas Aux/IAA interactúan con las proteínas ARF cuando éstas están unidas a sus promotores, impidiendo la acción de estas últimas. Por su parte, las proteínas TIR1 son los receptores de auxina y poseen tres dominios diferentes, lo que les facilita interactuar con tres ligandos: por un lado con un complejo ubiquitin ligasa SCF/TIR1 (dominio F-box) (Dharmasiri *et al.*, 2005), por otro la auxina y finalmente las proteínas AUX /IAA. Tras la unión a auxina, la proteína TIR1 incrementa su afinidad por las proteínas represoras Aux/IAA e induce su ubiquitinización y degradación vía proteosoma. De esta manera, el efecto represor de Aux/IAA es anulado y las proteínas ARF están libres para ejercer su efecto de activación o represión génica (Delker *et al.*, 2008).

Este mecanismo represor ejerce los múltiples efectos de auxinas en la planta por la diversificación de todas las familias génicas implicadas. Pese a que todas las familias ejercen los mismos efectos en todos los tipos celulares, la diversidad funcional se consigue por la expresión de proteínas de cada familia con diferente afinidad, o la mayor o menor expresión

y/o activación de cada una de ellas en cada tejido y momento del desarrollo (Teale *et al.*, 2006).

Los genes *GH3* se inducen de manera muy rápida por auxinas y su ausencia genera enanismo. Su función está relacionada con la respuesta a la luz mediada por auxinas e influyen en la conjugación de auxinas, importante para que el IAA sea activo (Paponov *et al.*, 2008; Taiz *et al.*, 2015).

Dos miembros de la familia SAUR se caracterizan en el **Chapter 3** de esta memoria.

Respecto al proceso dormición/germinación, las auxinas mantienen la dormición gracias a la interacción con la ruta del ABA. Se ha descrito que en ausencia de señalización de auxinas (ya sea por sobreexpresión o silenciamiento de genes de la ruta o en mutantes deficientes en la percepción o en la síntesis de la hormona) provoca una pérdida de dormición muy acusada, mientras el aumento en la síntesis de auxina o en su transducción produce el efecto contrario (Liu and Stone, 2013). Esto se debe a la regulación de *ABI3*, un factor de transcripción de la ruta del ABA implicado en el mantenimiento de la dormición por parte de AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (ARF10) y ARF16. Con niveles bajos de hormona, ARF10 y ARF16 son inactivados por los represores Aux/IAA AXR2 y AXR3, y la expresión de *ABI3* se ve interrumpida promoviendo la salida de la dormición. Sin embargo, en presencia de la hormona, ésta se une a su receptor formando el complejo TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)/ADDITIONAL F BOX PROTEIN (AFB)-AUX/INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)-AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) (Chapman and Estelle, 2009; Vanneste and Friml, 2009) y degrada a IAA7/AXR2 y IAA17/AXR3 dejando libres a ARF10 y ARF16, que se unirán al promotor de *ABI3* promoviendo su expresión y manteniendo la dormición.

1.5.4 Etileno

Es la única hormona de naturaleza gaseosa y su estructura es la más simple de las descritas: C₂H₄, con doble enlace entre los átomos de carbono que hace que su estructura no rote (Bewley *et al.*, 2013c).

En la maduración de semillas su función está relacionada con la ruptura de la dormición de semillas (Bewley *et al.*, 2013c). Es una hormona promotora de la germinación y regula negativamente la dormición, muy posiblemente por medio de su interacción con

el ABA (Corbineau and Côme, 1995; Beaudoin *et al.*, 2000; Matilla and Matilla-Vázquez, 2008; Linkies and Leubner-Metzger, 2012).

1.5.4.1 Síntesis de etileno

Se forma a partir de S-adenosilmetionina (SAM) gracias a la acción de la ACC sintasa (ACS), que convierte la SAM en ácido 1-aminociclopropano carboxilato (ACC), y la ACC oxidasa (ACO) que transforma este último en etileno. Mutantes de *Arabidopsis* afectados en estos pasos, como *aco*, tienen reducida su capacidad germinativa (Lin *et al.*, 2009), mientras que las semillas tratadas con etileno ven ésta inducida. Además, se ha observado que la transcripción de genes que codifican para proteínas ACC y ACO se ve incrementada durante la germinación de forma paralela a la expresión de GA3ox (Bewley *et al.*, 2013c).

1.5.4.2 Ruta de señalización del etileno

En ausencia de etileno, CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1), una proteína-kinasa, mantiene fosforilado e inactivo a ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2). En presencia de etileno, CTR1 es inactivado, lo que le impide mantener la fosforilación de EIN2, cuya defosforilación induce su escisión y el extremo carboxilo es traslocado al núcleo donde induce a EIN3 y con ello la respuesta transcripcional a etileno (Shakeel *et al.*, 2013).

Los mutantes *etr1* y *ein2* muestran mayor dormición que el ecotipo silvestre, relacionada con mayor sensibilidad al ABA en germinación y mayor síntesis de ABA (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000; Chiwocha *et al.*, 2005).

1.5.5 Brasinoesteroides

Son los únicos reguladores vegetales de naturaleza esteroidea, concretamente polihidroxiesteroidea, están presentes durante todo el desarrollo vegetal en bajas concentraciones y tienen efectos pleiotrópicos: inducen el crecimiento, tanto por elongación como por división, el gravitropismo y la resistencia a estrés (Bewley *et al.*, 2013c).

También afectan a la dormición/germinación de las semillas además de estar implicados en otros procesos (Clouse, 2001). Mutantes afectados en la síntesis y señalización de BRs muestran mayor sensibilidad a la inhibición de la germinación por ABA,

sin embargo son capaces de germinar sin problemas, lo que indica que estas mutaciones afectan al potencial germinativo pero que los BRs no son estrictamente necesarios para la germinación (Clouse and Sasse, 1998; Steber and McCourt, 2001). Además, los BRs pueden inducir la germinación del mutante *sleepy* (Steber and McCourt, 2001), lo que también les relacionaría con las GAs, sin embargo, en tabaco se ha descrito que la inducción de la germinación por ambas hormonas se debe a mecanismos diferentes (Leubner-Metzger, 2001), así que la función promotora de la germinación de los BRs se debe aparentemente a su capacidad de reducir la sensibilidad de las semillas al efecto inhibitorio del ABA, al igual que en el caso del etileno (Bewley *et al.*, 2013a). Además, ambas hormonas (etileno y BRs) inducen la expresión de genes relacionados con la elongación, lo que podría promover la germinación gracias al crecimiento del eje embrionario en ambos casos, sin embargo, lo hacen afectando a distintas familias de expansinas (Goda *et al.*, 2002).

1.5.6 Interacciones hormonales en procesos del desarrollo

1.5.6.1 Control de la germinación: *cross-talk* entre ABA y GAs

Los efectos inductores y represores de ABA y GAs en la germinación se han descrito en capítulos previos de esta memoria, así como que el destino final de las semillas no lo deciden ninguna de estas hormonas, sino el equilibrio entre ambas y su interacción (apartado 1.3.5). Además, existe un control recíproco entre ambas hormonas (**Figure 1.6**).

La expresión de *GA3ox* y *GA20ox* (genes limitantes de la síntesis de GAs, como se explica en el apartado 1.5.2.2) se encuentra elevada en las semillas de los mutantes deficientes en ABA *aba2-2*, indicando que la síntesis de GAs es suprimida por ABA en condiciones normales. Además, la expresión de *GA2ox*, que provoca la desactivación de GA, está reducida en estos mutantes (**Figure 1.6**), lo que sugiere que la desactivación de GAs se promueve por ABA en condiciones normales (Seo *et al.*, 2006). Las GAs inducen el catabolismo del ABA por *CYP707A2* (Okamoto *et al.*, 2006). Estos resultados reflejan la doble regulación del metabolismo de GAs por el ABA, por un lado suprimiendo la síntesis y por otro promoviendo su desactivación con el resultado de inhibir la germinación.

Por su parte, *RGL2* (fundamental en la ruta de transducción de GAs y represor de la germinación, apartado 1.5.2.3) estimula la síntesis de ABA y la actividad de *ABI5*, uno de los ABFs de la ruta de señalización de ABA. *RGL2* es degradado o inactivado por la

percepción de GAs (**Figure 1.6**), de manera que las GAs provocan también un descenso en la síntesis y señalización de ABA, induciendo la germinación (Piskurewicz *et al.*, 2008).

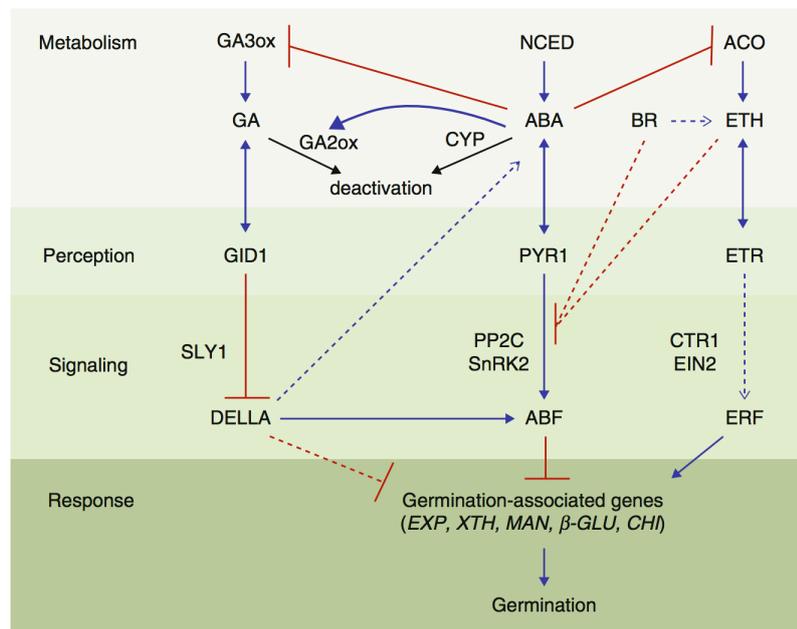


Figure 1.6 Interacciones y *cross-talk* entre las rutas de metabolismo, percepción y transducción de ABA, GAs, etileno y BRs.

Se presentan ejemplos de proteínas que son reguladas en la producción (GA3ox, NCED, ACO) o inactivación (GA2ox, CYP707A) hormonal. Los receptores de GAs (GID1), ABA (PYR1) y etileno (ETR) interaccionan con sus respectivas hormonas e inducen la des-represión de las rutas de transducción de su señal. Estas rutas conllevan la eliminación (en el caso de los DELLA) o la activación (en el caso de los ABFs o ERFs) de reguladores transcripcionales de genes relacionados con la germinación (*v.g.* EXP, expansinas; XET, xiloglucano endotransglicolasas; MAN, endo- β -mananasa; β -GLU, β -1,3-glucanasa; CHI, quitinasa). Las señales azules indican inducción y las rojas represión. Las líneas punteadas indican que se conocen la interacción pero no sus mecanismos concretos. Tomado de (Bewley *et al.*, 2013a).

La regulación del equilibrio ABA-GAs en semillas funcionan de forma que cuando una señal está activa es capaz de amplificarse de forma muy rápida (*v.g.* GAs inducen un aumento en el contenido y respuesta a GAs eliminando la producción y transducción de ABA y el ABA aumenta su síntesis y transducción mediante la represión de GAs). Esta rápida amplificación de las señales hormonales es importante para la regulación e integración por parte de la semilla de los estímulos externos e internos que recibe de forma continua y sobre los que tiene que decidir para bloquear o iniciar la germinación (Bewley *et al.*, 2013a). La alteración en el equilibrio de ABA-GAs es muy importante en la regulación del control de los estímulos de la germinación por luz.

Tanto la luz como el frío promueven la acumulación de GAs incrementando los niveles de GA3ox y la represión de PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE5 (PIL5) y SPATULA, ambos factores bHLH que inhiben la expresión de GA3ox. PIL5, que es

reprimido por luz, también promueve la expresión de enzimas de la síntesis de ABA, como NCED y SDR1, e inhibe la síntesis de CYP707A por medio de la activación de SOMNUS, un factor de transcripción de tipo dedo de Zinc, uniéndose a su promotor con la intervención de ABI3 (Park *et al.*, 2011) y manteniendo niveles elevados de ABA en oscuridad. La luz también induce al factor de transcripción ATHB20 en el endospermo micropilar y el ápice de la raíz, lo que parece disminuir la sensibilidad a ABA en estos tejidos (Barrero *et al.*, 2010). Estudios de campo realizados recientemente sugieren que los elementos reguladores de la dormición varían con las estaciones: temperaturas frías se corresponden con estados elevados de dormición debidos al incremento en la expresión de genes implicados en la síntesis de ABA, catabolismo de GAs, miembros de la familia de kinasas SnRK2 y DELAY OF GERMINATION1 (DOG1), mientras en condiciones de temperaturas elevadas la dormición es menos profunda debido a PIL5 y a las proteínas DELLA que pueden reprimirse rápidamente por exposición a la luz (Footitt *et al.*, 2011). Las variaciones en la sensibilidad al frío durante la imbibición pueden achacarse a las diferencias de expresión de FLOWERING LOCUS C (FLC) durante la maduración; grandes cantidades de FLC promueven el catabolismo del ABA y la síntesis de GA durante la imbibición en frío (Chiang *et al.*, 2009). Sin embargo, otro regulador de la floración, FY, activa la dormición aparentemente inhibiendo la síntesis de GA y promoviendo la expresión de ABI5 (Jiang *et al.*, 2012).

El etileno y los BRs también influyen en la germinación, alternando la señalización del ABA. Ambas hormonas son capaces de reducir la capacidad del ABA de inhibir la germinación, actuando por debajo de la síntesis, en la transducción de su señal. Por su parte, el ABA puede regular de forma negativa la transcripción de los genes ACO (apartado 1.5.4.1), reduciendo la síntesis de etileno. Los BRs también son capaces de estimular la síntesis de etileno, aunque ese efecto no se ha demostrado en semillas (**Figure 1.6**).

Una de las mayores evidencias de la interacción del ABA con los BR fue el descubrimiento de que líneas deficientes en BR e insensibles a BR eran hipersensibles al ABA (Li *et al.*, 2001; Steber and McCourt, 2001). Desde entonces se ha descubierto que el ABA y los BR regulan cientos de genes conjuntamente, con efecto similar o contrario (Nemhauser *et al.*, 2006). Al menos parte de la convergencia en la señalización se debe a que el ABA regula componentes de la señalización de los BR por debajo de su percepción (Zhang *et al.*, 2009).

Fue en la búsqueda de supresores y activadores del efecto del ABA en la germinación donde se vio su interacción con el etileno al aislarse nuevos alelos de genes de la señalización de etileno como *ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2)* y *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1)* (Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000). Estudios en *Lepidium sativum* muestran que el etileno, producido principalmente en la radícula, induce genes de ablandamiento de las cubiertas seminales en el endospermo micropilar, actuando antagónicamente al ABA en este proceso (Linkies *et al.*, 2009). Estos efectos antagónicos se acentúan por la represión de la ACC oxidasa por parte del ABA (Cheng *et al.*, 2009; Linkies *et al.*, 2009) o por la represión de la familia de proteínas NCED y la inducción de varios miembros de la familia CYP707A en plántulas (Cheng *et al.*, 2009), aunque este efecto no se ha corroborado en la germinación (Linkies *et al.*, 2009).

La interacción entre el ABA y las auxinas en la germinación se puso de manifiesto debido a que la aplicación exógena de auxinas incrementa el efecto inhibitor del ABA, y a que el factor de respuesta a auxina 10 (ARF10) aumenta la sensibilidad a ABA (Liu *et al.*, 2007a).

Estos datos ofrecen un panorama en el que las rutas de transducción de cada hormona interaccionan de manera activa para integrar todas las señales que la semilla recibe, como se explicaba antes, y estas rutas, lejos de ser independientes, constituyen más bien una red de interacciones que funcionan en ambos lados y que se sitúan en un lado o en otro según la fuerza que cada señal o factor regulador sea capaz de ejercer. Estas señales se integran gracias a *master integrators* (como los DELLAs, ABFs, ERFs) que son capaces de transformar patrones de transcripción de dormición a otros de germinación o viceversa y determinar el destino de la semilla (**Figure 1.6**) (Bewley *et al.*, 2013a)

1.5.6.2 Control del proceso postgerminativo

Tras la germinación, el desarrollo de la plántula depende en gran medida de la disponibilidad de luz. Aquellas plantas que crecen en oscuridad desarrollan raíces cortas, largos hipocotilos y gancho apical y, si tras esto reciben luz, estos procesos se revierten. Estos programas de desarrollo se denominan escotomorfogénesis y fotomorfogénesis, respectivamente, y están controlados por redes de señalización en las que la luz es percibida por los fitocromos y la señal se integra en las proteínas del complejo de ubiquitina

COP/DET/FUS (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC/DEETIOLATED/FUSCA) (Chamovitz *et al.*, 1996; Yanagawa *et al.*, 2004).

En condiciones de oscuridad, el complejo COP promueve la degradación de factores de transcripción como HY5, que en luz promueve la fotomorfogénesis (Osterlund *et al.* 2000). Por su parte, los factores PIF (*PHYTOCHROME INTERACTING PROTEINS*) se activan en oscuridad mientras que, en luz, los fitocromos inducen su degradación (Al-Sady *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2007).

Hay muchas hormonas implicadas en este proceso (Figure 1.7). Las GAs reducen la estabilidad de HY5 y los mutantes deficientes en la síntesis y respuesta a GAs presentan niveles elevados de HY5 y un fenotipo constitutivo de fotomorfogénesis (Alabadí and Blázquez, 2008). Las citoquininas, sin embargo, inducen la estabilización de HY5 y por lo tanto la fotomorfogénesis (Vandenbussche *et al.*, 2007). Se cree que el control de HY5 ejercido por GAs y citoquininas es mediado por COP1 aunque aún se desconoce el mecanismo concreto por el que sucede (Vanstraelen and Benková, 2012).

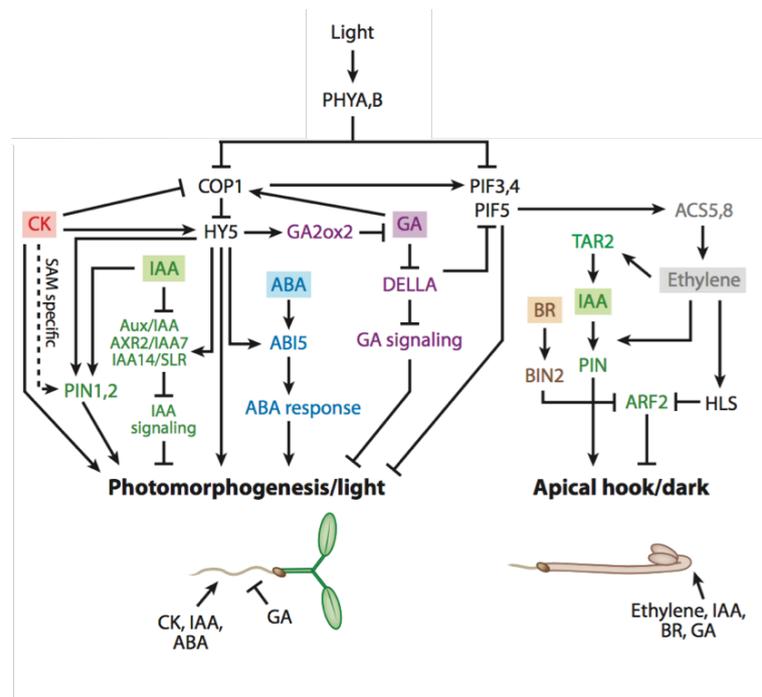


Figure 1.7 Redes hormonales en respuesta al crecimiento en condiciones de luz (izqda.) y oscuridad (dcha.) en plántulas de *Arabidopsis*.

Las flechas y señales de inhibición indican interacciones positivas y negativas respectivamente. Los componentes de la ruta de auxinas (IAA) se encuentran resaltados en verde; los de citoquininas (CKs) en rojo; los de ABA (ABA), en azul; los de GAs (GA) en morado; los de BRs (BR) en negro y los de etileno en gris. A la izquierda se muestra una plántula en condiciones de escotomorfogénesis y a la derecha de fotomorfogénesis, con el efecto de cada una de las hormonas sobre su diagrama. Adaptado de (Vanstraelen and Benková, 2012).

HY5 a su vez es capaz de regular muchas rutas hormonales (). Elimina la señalización por auxinas mediante la activación de la transcripción de *AUX/IAA* (Cluis *et al.*, 2004). Además, HY5 regula la transcripción de genes de señalización del etileno como los *ERFs*; de las GAs, como los *DELLA*, así como del metabolismo del ABA, los *NCEDs* y *CYP707*, del etileno, *ACS8*, de GAs, *GA2ox1*, y del ácido jasmónico (*LOX3*) (Lee *et al.*, 2007). *LONG1*, el ortólogo en guisante de HY5, regula *GA2ox2* (Weller *et al.*, 2009) y HY5 se une al promotor de *ABI5* regulando su expresión (Chen *et al.*, 2008).

Además, HY5 está implicado en el transporte polar de auxinas dependiente de luz: en oscuridad, *PIN1* y *PIN2* son transportados a las vacuolas para ser degradados, reduciendo el transporte (Laxmi *et al.*, 2008). La cantidad de *PIN2* se ve reducida en gran medida en mutantes *hy5* crecidos en luz y aumentada en mutantes *cop9* crecidos en oscuridad. Esto indica que este complejo controla el transporte de auxinas en los cambios luz/oscuridad. En el SAM desarrollado en oscuridad, se puede revertir el efecto de la falta de luz añadiendo citoquininas, lo que indica una interacción entre luz, citoquininas y auxinas en este proceso (Yoshida *et al.*, 2011).

El gancho apical, que se desarrolla en oscuridad, es una estructura cuya función es la protección del SAM durante su crecimiento en el suelo, y pierde su curvatura característica en cuanto la luz es percibida. El desarrollo del gancho apical se debe a un crecimiento celular diferencial entre los lados cóncavos y convexos de cada lado del gancho (Raz and Ecker, 1999). Este proceso está también controlado por muchas señales hormonales: por un lado, las auxinas se acumulan en la zona cóncava y son críticas para la formación del gancho, mientras que la bajada en los niveles de auxina provoca la pérdida de la curvatura (Vandenbussche *et al.*, 2010; Zádňíková *et al.*, 2010). El etileno alarga el tiempo de desarrollo del gancho apical, lo que provoca un exagerado crecimiento del mismo. Este efecto del etileno está mediado en parte por el control que ejerce de la síntesis de auxinas (Vandenbussche *et al.*, 2010) y su transporte polar (Zádňíková *et al.*, 2010). El etileno estimula la transcripción de genes de síntesis de auxinas y la expresión de los genes *PIN*. La expresión de estos genes en respuesta a etileno en el gancho apical es diferente que en la raíz, lo que indica que las condiciones específicas de cada proceso pueden producir funciones antagónicas de un factor determinado (Ružička *et al.*, 2007; Zádňíková *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2011). *HLS* (*HOOKLESS*) codifica una N-acetiltransferasa y es un importante integrador molecular de las rutas de las auxinas y el etileno. (Lehman *et al.*, 1996). El etileno estimula la transcripción de *HLS*, que inhibe la transcripción del gen

represor de la respuesta a auxinas *ARF2*, promoviendo en último término las respuestas a auxinas. El mutante *hls* carece completamente de gancho apical, así que *HLS* es importante como mensajero del efecto auxínico en el desarrollo de esta estructura (Li *et al.*, 2004). Los BRs actúan de forma sinérgica con las auxinas en la regulación del desarrollo del gancho apical. Al aplicar BRs se compensan parcialmente los defectos en elongación del hipocotilo del *hls* en condiciones de luz (De Grauwe *et al.*, 2005), probablemente por la inhibición directa de la actividad de *ARF2*. Los BRs promueven la fosforilación de *ARF2* a través de la *BIN2* kinasa, provocando la pérdida de unión de *ARF2* al ADN y, por consiguiente, sus actividades represoras. De este modo, un aumento en los niveles de BRs en *hls* puede iniciar una ruta paralela en la que *ARF2* es desactivado y, de esa manera, se compensa la falta de *HLS* (Vert *et al.*, 2008).

Las GAs promueven el desarrollo del gancho apical de forma que un descenso en los niveles o la respuesta a GAs inhibe el fenotipo de escotomorfogénesis (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011). Tanto el efecto estimulador de GAs sobre la degradación de *HY5* mencionado previamente como la interferencia con la actividad de los factores *PIF* contribuyen a este efecto. Las proteínas *DELLA* interactúan con *PIF3* y *PIF4* e inhiben su capacidad de unión al ADN. Así, las GAs liberan a *PIF3* y *PIF4* de esta inhibición y la escotomorfogénesis puede tener lugar (Feng *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008). El efecto promotor del gancho apical por parte de las GAs está relacionado con *HLS* y con el control de la síntesis de etileno. Las GAs inducen la transcripción de los genes de síntesis de etileno *ACS8* y *ACS5* y la expresión de *HLS* y *ACS* está regulada de forma negativa en los mutantes deficientes en la señalización de GAs. La unión entre *PIF5* y el promotor de *ACS8* hace plantear un modelo en el que las GAs inducen la degradación de las proteínas *DELLA*, lo que conlleva la liberación de *PIF5*, que puede activar la expresión de *ACS* y, por lo tanto, la síntesis de etileno (Gallego-Bartolomé *et al.*, 2011).

1.6 Fosforilación y PP2Cs en el desarrollo vegetal

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo universal en la regulación de procesos celulares y rutas de transducción (Moorhead *et al.*, 2009; Uhrig *et al.*, 2013). Pese a que en un principio los estudios acerca de la fosforilación se enfocaron en su papel en la modificación de la actividad enzimática, se ha descrito también su papel en la localización de proteínas, su metabolismo y la generación de sitios específicos para la interacción con otras proteínas (Cohen, 2000).

Hay más de 1000 genes que codifican proteín-quinasas en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2003), mientras que este número es mucho menor en otros organismos como levadura (130), mosca (251), ratón (561) o humanos (518) (Bögge *et al.*, 2003). En cuanto a la abundancia de fosfatasas, en *Arabidopsis* se han identificado 112 PP2Cs (Kerk *et al.*, 2002) frente a 7 en levadura, 10 en mosca, 8 en gusano y 15 en humanos. Esto sugiere que las PP2Cs tienen una diversidad funcional más amplia en plantas que en otros organismos eucariotas. El número de kinasas supera en gran medida al de fosfatasas, lo que llevó a pensar que las primeras eran mucho más específicas, aunque actualmente esto parece no estar tan claro (Schweighofer *et al.*, 2004).

Las proteín-fosfatasas se dividen en dos clases principales según los aminoácidos sobre los que actúan: proteín-tirosín-fosfatasas (PTPs) y proteín-serín/treonín-fosfatasas. Las PP2Cs pertenecen a estas últimas, son enzimas monoméricas que requieren Mn^{2+}/Mg^{2+} para su funcionamiento y no están reguladas por subunidades o proteínas inhibitoras. Son insensibles a ácido okadaico y a cantaridina.

Todas ellas presentan 11 subdominios característicos en el sitio catalítico (Bork *et al.*, 1996). Éste puede aparecer situado bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal, y contener extensiones implicadas en su regulación, especificidad de sustrato y localización subcelular (dominios MAPK, dominios bipartitos de localización nuclear, dominios FHA (*Fork-Head Associated domain*) de interacción con fosfoproteínas, regiones ricas en serina o en lisina o dominios de unión a ATP/GTP (Schweighofer *et al.*, 2004).

1.6.1 Clasificación y funciones de las PP2Cs

Mediante estudios filogenéticos las PP2Cs han sido agrupadas en 10 grupos (A-J), con 6 fosfatasas no incluidas en ninguno de ellos (Schweighofer *et al.*, 2004). El grupo A engloba la mayoría de PP2Cs implicadas en la ruta señalización del ABA, como ABI1, ABI2 (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001), HAB1, HAB2 (Sáez *et al.*, 2004) y AtPP2CA (Sheen, 1998). El grupo B se caracteriza por presentar homología con MP2C, una PP2C de alfalfa que regula la señalización de MAPKs (Meskiene *et al.*, 1998). En cuanto al grupo C, en él se incluyen las fosfatasas 2C de tipo POL (POLTERGEIST), implicadas en el desarrollo floral. El gen POL es una fosfatasa con acción reguladora sobre los receptores kinasa CLV1 (Yu *et al.*, 2003).

Pese a que las PP2Cs no tienen homología de secuencia con otras fosfatasa, las semejanzas en su estructura tridimensional indican un mecanismo catalítico semejante (Das *et al.*, 1996), debido posiblemente a procesos de convergencia evolutiva (Schweighofer *et al.*, 2004).

Como ya se ha mencionado, las PP2Cs son enzimas monoméricas, no reguladas mediante proteínas inhibitoras o subunidades propias. Sin embargo, se ha propuesto que estas enzimas pueden ser reguladas mediante interacción con sustratos específicos u otros componentes de las rutas de señalización en las que estén implicadas. Asimismo, la actividad de estas enzimas también puede regularse mediante el control de su expresión, compartimentalización, proteólisis o segundos mensajeros (Schweighofer *et al.*, 2004). El balance redox celular también podría desempeñar un papel en la regulación de las PP2Cs. De hecho, se ha descrito la inactivación reversible de ABI1 y ABI2 por peróxido de hidrógeno *in vitro*, debido al parecer a la oxidación de residuos de cisteína fundamentales (Meinhard *et al.*, 2002). También se ha descrito la regulación por medio del complejo Ca^{2+} /calmodulina de la fosfatasa PCaMPP de *Physcomitrella patens* (Takezawa, 2003). Otro posible mecanismo de regulación podría ser el llevado a cabo por mensajeros lipídicos, ya que se ha demostrado que MP2C y ABI2 son muy sensibles a la presencia de ácidos grasos insaturados (Baudouin *et al.*, 1999). Esto contribuye a la activación de MAPKs, dado que la producción de ácidos grasos libres aumenta en respuesta a heridas mecánicas, así como también lo hacen el Ca^{2+} y las propias MAPKs.

1.6.1.1 PP2Cs en respuesta a estrés abiótico

En plantas, las PP2C son componentes muy importantes de la transducción de señales en respuesta a estrés.

Las PP2C del grupo A forman parte del complejo receptor del ABA como elemento inhibitor de la respuesta, como se ha comentado en capítulos anteriores (Ruta principal de la señalización de ABA). Varios miembros de las PP2C-A regulan la señalización del ABA inducida por estrés abiótico. ABI1 y ABI2 son dos de las PP2Cs más estudiadas y conocidas: se han caracterizado como las principales fosfatasas en respuesta a estrés abiótico y durante el desarrollo (Singh and Pandey, 2012; Fuchs *et al.*, 2013). Los mutantes dominantes *abi1* y *abi2* tienen un residuo de glicina sustituido por aspartato muy cerca del sitio de unión a Mg^{2+} de la proteína, reduciendo dramáticamente la actividad de la proteína y provocando

fenotipos de insensibilidad a ABA, pérdida de dormición, cierre estomático irregular y poca tolerancia a la desecación (Leung *et al.*, 1997). La mayoría de las PP2C-A se inducen por ABA y estrés (Fujita *et al.*, 2011). Su papel fundamental es el de regular la actividad kinasa de las SnRK2s, que son a su vez reguladores positivos de la ruta del ABA (Umezawa *et al.*, 2009; Soon *et al.*, 2012). También se ha descubierto que las PP2C-A, ABI1 y PP2CA, regulan a SNRK1s en condiciones de estrés relacionado con sacarosa por la ruta del ABA (Rodrigues *et al.*, 2013). Esto indicaría que las PP2C-A regulan respuestas a estrés inducidas por ABA a través de dos vías diferentes.

Otras PP2Cs regulan rutas de señalización de MAPKs en plantas de forma similar a como ocurre en mamíferos (Danquah *et al.*, 2014), desactivándolas vía defosforilación y bloqueando así la ruta de señalización aguas abajo (Smékalová *et al.*, 2014). Por ejemplo, MP2C (*Medicago truncatula* Phosphatase 2C) controla la actividad de la MAPK inducida por estrés (SIMK), desfosforilando el residuo pThr del motivo de activación pTEpY.

1.6.1.2 PP2Cs en respuesta a estrés biótico

Las PP2Cs del grupo A también colaboran en la respuesta al ataque de patógenos. Uno de los mecanismos de respuesta es el cierre estomático en respuesta a patógenos, que también está regulado por ABA (Zeng *et al.*, 2011). Recientemente, se ha descubierto que RCAR3 y PP2CA participan en la respuesta mediada por ABA en *Pseudomonas syringae* pv. Tomato DC3000 (Pst DC3000) (Lim *et al.*, 2014). Al inocular Pst DC3000 la expresión de RCAR3 desciende, mientras que la de PP2CA y otras PP2Cs, como *HAB1* y *AHG1*, aumentan gradualmente desde las 12 a las 24 horas tras producirse la inoculación. PP2CA interacciona con RCAR3 y el nivel de sensibilidad al ABA de diversas líneas de mutantes de pérdida y ganancia de función se puede correlacionar con la apertura y el cierre estomático en respuesta a Pst DC3000.

AP2C1, una de las pocas PP2Cs del grupo B bien caracterizada, regula respuestas a patógenos y a herida desfosforilando e inactivando a MAPK4 y MAPK6, conocidos reguladores positivos de estas señales. La sobreexpresión de *AP2C1* provoca una baja actividad de MAPK, una baja respuesta a herida y bajos niveles de etileno (Schweighofer *et al.*, 2007). AP2C1 es, por tanto, un regulador negativo de la señalización de MAPKs y controla el nivel de defensa de la planta.

Otra fosfatasa, PIA1 (PP2C induced by AvrRpm1), que pertenece al poco caracterizado grupo F, también participa en la respuesta a Pst DC3000. *PIA1* se induce en respuesta a AvrRpm1, un efector bacteriano de tipo III (Widjaja *et al.*, 2009). La línea de pérdida de función de *PIA1* es resistente a infecciones de Pst DC3000 pero no a otras cepas de *Pseudomonas syringae*, además, los niveles de etileno y ácido salicílico, fundamentales en la respuesta a patógenos, se encuentran drásticamente reducidos en la línea mutante. Todo esto sugiere que PIA1 participa en la respuesta a estrés y regula también la síntesis de hormonas relacionadas con la respuesta a patógenos.

1.6.1.3 PP2Cs en funciones de desarrollo

Aunque las PP2Cs se asocian con procesos de estrés, hay varias que se han relacionado con procesos de desarrollo, siendo las más conocidas KAPP y POL (POLTERGEIST). Ambas participan en la ruta de señalización de CLAVATA1 (CLV1, una *Receptor Like Kinase*) que regula el desarrollo floral en *Arabidopsis* (Luan, 2003). KAPP, mediante su dominio FHA (*forkhead-associated domain*) interacciona con CLV1. Por su parte POL participa en el proceso modulando la actividad del factor de transcripción WUSCHEL (WUS), aunque se han descrito efectos de POL de manera independiente a WUS (Yu *et al.*, 2003). Además, POL no sólo está implicado en el desarrollo floral, sino también en el desarrollo del meristemo apical y radicular, así como en el desarrollo embrionario (Wang *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2008), participando en la división asimétrica de las células madre de los meristemos y controlando tanto a WUS como a CLE40 (CLV3/ESR (endosperm surrounding region)-related 40)/WOX5 (WUSCHEL-related homeobox 5) (Song *et al.*, 2008; Gagne and Clark, 2010), que participan en la división asimétrica de células madre y en el mantenimiento de su polaridad (Fuchs *et al.*, 2013).

Recientemente, se ha descubierto un nuevo mecanismo de acción de las PP2Cs-D, un grupo desconocido hasta hace poco, como intermediarios en el desarrollo vegetal. Spartz *et al.* (2014) describieron que PP2Cs-D interaccionan con la proteína SAUR19 (SMALL AUXIN UP RNA 19) inducida por auxinas. SAUR19 aumenta la actividad de la H⁺-ATPasa, localizada en la membrana plasmática, promoviendo su fosforilación en el dominio autoinhibitorio que posee en la zona C terminal. La activación de la H⁺-ATPasa promueve la expansión celular al activar el flujo de protones hacia el apoplasto y facilita la toma de solutos y agua. Las PP2Cs-D actúan de forma contraria a SAUR, ya que interaccionan desfosforilando e inactivando las H⁺-ATPasas. Consecuentemente, las líneas mutantes de

pérdida de función de PP2C-D y las plantas sobreexpresoras de SAUR19 muestran fenotipo de hipocotilos elongados, mientras que la sobreexpresión de PP2C-D provoca hipocotilos reducidos y plántulas enanas. Así pues, las PP2C-D son moduladoras de la expansión celular regulada por auxinas en el crecimiento vegetal.

Otra fosfatasa recientemente caracterizada es AtPP2CF1, perteneciente al desconocido grupo E. AtPP2CF1 activa la proliferación y expansión celular acelerando el desarrollo de la inflorescencia, de manera que las líneas con sobreexpresión de *AtPP2CF1* generan niveles superiores de biomasa (Sugimoto *et al.*, 2014).