



CAMPUS  
DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL



# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS



Estudio de los mecanismos de regulación de la  
germinación en Brasicáceas

TESIS DOCTORAL

Julián Calleja Cabrera

GRADUADO EN BIOTECNOLOGÍA

2023





CAMPUS  
DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y  
RECURSOS  
GENÉTICOS DE PLANTAS Y MICROORGANISMOS  
ASOCIADOS

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA  
VEGETAL

**Estudio de los mecanismos de regulación de la  
germinación en Brasicáceas**

TESIS DOCTORAL

**JULIÁN CALLEJA CABRERA**  
GRADUADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DIRECTOR:**  
**PROF. DR. LUIS OÑATE SÁNCHEZ**

**CO-DIRECTORA:**  
**DRA. MÓNICA PERNAS OCHOA**

2023



Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día de de 20 .

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

Realizado el acto de defensa y lectura de Tesis el día de de 20 en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP, UPM-INIA/CSIC).

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

EL SECRETARIO



## RECONOCIMIENTOS

Me gustaría agradecer y reconocer el trabajo de todas las personas que me han ayudado durante la realización de esta tesis.

En primer lugar, a mis directores de tesis el Dr. Luis Oñate Sánchez y la Dra. Mónica Pernas Ochoa, por la oportunidad que me han brindado para formar parte de sus laboratorios, por sus enseñanzas, sugerencias y ayudas a lo largo de este periodo.

A Gerardo Carrera, por compartir sus conocimientos y sugerencias conmigo, por su ayuda y atención constantes durante toda la tesis.

A Marta Boter, por su asistencia en mi aprendizaje en el trabajo con la especie *Brassica napus*, así como su labor en el tratamiento y estudio de los datos de transcriptómica y metabolómica, y por el análisis de los meristemas radiculares.

A Iris Fañanás, por ayudarme con la experimentación realizada con levaduras y, sobre todo, por su inestimable e inigualable ayuda con la estadística y los análisis de experimentos de alto rendimiento.

A Héctor Molinelli, por su ayuda con los clonajes y los ensayos de expresión transitoria y transactivación.

A Rocío Sánchez, por iniciarme en la labor investigadora en este laboratorio, y por todo el material e información que me cedió para poder realizar parte de este trabajo.

A los técnicos de laboratorio, Marina y David, por el apoyo y ayudas brindados durante la experimentación.

A la Dra. Sara González Bodí, por su insuperable ayuda en el tratamiento de datos y análisis del RNASeq.

Al Dr. Rod Snowdon y a la Dra. Nathalie Nesi, por el material y los datos de transcriptómica y metabolómica de colza cedidos.

A los Drs. David Alabadí, Jaime Martínez García, José Antonio Abelenda y Salomé Prats por el material cedido y referenciado en la sección de Materiales y Métodos, que ha sido de gran utilidad para la realización de esta tesis.

A todos los miembros de aquellos laboratorios del CBGP que me han brindado un poco de su tiempo para ayudarme, darme su opinión o por prestarme material.



## AGRADECIMIENTOS

Como considero que este período de formación no solo profesional, sino también personal, comenzó cuando tomé la decisión de centrar mis estudios en la Ciencia allá en 2010, quiero dedicar mis más sinceros agradecimientos a toda la gente que me he encontrado en cada una de las etapas que he vivido desde entonces.

A todos los profesores que durante mi Bachillerato en Cáceres se volcaron en enseñar y en disfrutar enseñando, por transmitir unos valores y mostrar una dedicación plena. En especial, agradecer a la Hermana Teresa, por ayudarme a dar el salto y elegir estudiar Biotecnología. A mis amigas de Cáceres, Eugenia, Paloma, Patricia y Rocío, por estar ahí en las duras y en las maduras, y por el esfuerzo realizado en mantener una amistad sincera desde la infancia. A mis amigos de Valencia de Alcántara, Alejandro, Juanma, Rodrigo, Pilar y todos los demás, que siempre han estado ahí y siempre podré contar con ellos.

Agradecer a los profesores del Grado de Biotecnología de la Universidad de Salamanca que disfrutaban con su trabajo y que sacrifican su tiempo para empaparnos con sus conocimientos. Aquí quiero hacer mención especial a mis tutoras del TFG, las Dras. Berta Dopico y Lucía Albornos, por la experiencia única que viví con ellas en su laboratorio, y porque siempre estuvieron ahí para ayudarme y enseñarme, porque con ellas inicié mis pasos en el laboratorio. A mi antigua compañera de piso Eva María, por los 3 años compartidos junto a ella (y Emilio y Jenara). Y como no, a mis postus, Celia, Jara, Marta, Raquel y Silvia, compañeras y amigas con las que he compartido momentos inolvidables no solo en Salamanca, también en Portugal, Holanda y Suiza (y espero que, en un futuro, en muchos sitios más). Porque ni la distancia ni el tiempo han logrado ni lograrán separarnos. A las 5, de corazón, muchas gracias por todo.

A los Drs. que participan en el Máster de Biotecnología Molecular y Celular de Plantas del IBMCP (UPV), por su magnífico papel al enseñar y demostrar la importancia de conocer y seguir conociendo, a través de la investigación, a las plantas. A mi amigo Miguel, compañero de mesa en las largas tardes de clase. A todos los miembros de los laboratorios 2.07 y 2.08, a los IPs David Alabadí y Miguel Blázquez por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio durante mi TFM. A los post-docs Antonio, Cris, David y Eugenio, los pre-docs Anna, Jorge, Marco y Yaiza, y a mi compañera Amparo por una experiencia tan enriquecedora y porque con ellos compartí momentos geniales dentro del laboratorio. Especialmente a Noel, por la confianza que puso en mí, y porque siempre estaba dispuesto a ayudar, por lo momentos buenos y los menos buenos muchas gracias. También a Asier, que más que un compañero de trabajo es un amigo, porque desde el primer momento me acogió en su círculo presentándome a gente genial, como Carlos y Quico. Y porque me enseñó a disfrutar de Valencia y a vivir la vida.

A toda la gente que he visto pasar en el laboratorio 101, primero a Rocío, que me ayudó a dar mis primeros pasos en el CBGP y me presentó en sociedad para que conociese a un montón de gente buena. A Gerardo, mi compañero de laboratorio desde que entre hasta que salí, eterno en su estilo de hacer investigación a horas intempestivas, gracias por compartir un poco de tu genialidad y de tu locura conmigo. Por tu ayuda en momentos

críticos, y porque valoro tu opinión y tu criterio por encima del de muchos, te echaré de menos. A Laura “La Txurra”, porque su inesperada llegada al laboratorio me abrió un mundo nuevo de amistad, risas, cotilleos, críticas... En resumidas cuentas, que aterrizases en el labo y que acabases sentándote espalda con espalda conmigo fue como una bendición divina, aunque yo fuese para ti un auténtico demonio. Porque has sido como una hermana mayor durante tu estancia en el laboratorio y porque seguirás siendo una personita especial para mí, muchas gracias por todo. A Iris, que llegó como un pollito, tímido y callado, pero que ha acabado abarcando un buen cacho de mi corazón. Ella, la *Jack of all trades*, pintora, decoradora, estilista, cantautora, maquilladora y un sinfín de cosas más, yo me quedo con la parte de ser mi profesora particular de estadística. Has demostrado tener un potencial brutal para esto y sé que serás capaz de llegar muy lejos por tu propio pie, cree en ti porque eres muy capaz. Muchas gracias por acompañarme en esas noches de germinación y por soportar a mi demonio interior. Y quizá volvamos al local a cantar para nosotros lo de "Vacaciones del mes de noviembre" y dejar que esa chorrada nos empañe la mirada. A Héctor, David y Marina, que han traído risas y “buenrollismo” al laboratorio, sin vosotros el ambiente de trabajo hubiese sido apagado, que 2 viajes al Valle no son suficientes. Os deseo lo mejor de aquí en adelante.

A los miembros del 177-179, Abe, Javi, Jeni, José, Manuel, Mare, María, Marta, Noe (y sus dos garbancitos), Laura, Loreto, Pedro y Raquel; porque siempre habéis mostrado disponibilidad para ayudar, compartir y aconsejar, y por la amistad que me une a muchos de vosotros, gracias. Al equipo papita, Gara y Elena, ha sido una suerte conocerlos y poder compartir todo este tiempo con vosotras. Gara, gracias por todas esas horas en el gym, por los perreitos, las coreografías y los Eurovisión; porque poner una canaria en tu vida no decepciona, siempre podrás contar conmigo, muchas gracias. A René y Silvina, compañeros de comida en la época precovid, pero que siempre están dispuestos a echar una mano. A aquellos que se fueron pronto, pero tuve la oportunidad de conocer: Andrea, Laura Bacete, Elena, Marta Marina, Miguel, Paul, Víctor... Ha sido una suerte poder coincidir con vosotros. A Cristian, porque nunca hay conversaciones aburridas cuando se habla con él. A mi técnico favorita, Mar, por ser mi confidente, por su ayuda y su apoyo en momentos difíciles, porque siempre te puede sacar una sonrisa con datos del pasado del Centro, muchas gracias. A los miembros de la Unidad de Soporte Bioinformático, en especial a Sara, que siempre nos ha atendido con una sonrisa, nos ha ayudado enormemente y nos ha resuelto cualquier duda. A quienes mantienen este Centro totalmente funcional y evitan su total colapso: los encargados del invernadero, Chendo y Mar, porque nunca tantos debieron tanto a tan pocos; a María y Rubén del servicio de lavado y esterilizado, a Carlos de Microscopía, y, sobre todo, a Cris, porque sin ella se nos comería la mierda, muchas gracias por tus visitas, siempre sacan una sonrisa. Por último, y como cuatro años y medio dan para mucho, gracias a todos aquellos que no he podido nombrar, pero que se lo merecen igualmente.

A mis amistades madrileñas, Miriam y Samara, gracias por compartir vivencias en España y Alemania, por el apoyo y la amistad que nos une. A Alberto, por los años que hemos compartido y por los que hemos vivido juntos, por las experiencias, los viajes, las risas y los llantos que he tenido oportunidad de vivir contigo. Sin tu compañía no habría llegado tan lejos, muchas gracias por todo esto y por los años de amistad futura.

A Maxime, pour ton apparition inattendue dans les moments les plus difficiles de ma thèse, comme un rayon de soleil traversant l'orage. Merci beaucoup de partager ton temps avec moi et de me soutenir dans cette situation. Mon petit canard du sud de la France.

A mi familia, a toda ella, primos, tíos, abuelos, primos y tíos segundos; a los que están y a los que vi partir y, también, a los que no tuve la suerte de conocer. Por el gran ejemplo de unidad y esfuerzo que representáis para mí, muchas gracias a todos vosotros. A mi gato, Mateo, testigo y compañero inseparable de mis tardes de estudio, bola de pelo que me vio partir de casa y que cada vez que vuelvo no se separa de mí. Tus ronroneos curan cualquier mal. A mis padres y a mi hermano, el núcleo más profundo de mi tesoro, a vosotros os lo debo todo, sin vosotros no sería quién soy. Muchas gracias por vuestros sacrificios constantes, por la educación y los valores que me habéis enseñado, muchas gracias por confiar en mí y, sobre todo, por quererme. Sois unos ejemplos inigualables de sacrificio y resistencia en los peores momentos de la vida, pero también de resiliencia y de mirar al futuro con optimismo. Os lo debo todo y no me ocurre ninguna palabra con la que agradecereros tanto. Os quiero.

*Las colzas son fuertes mi Señor,  
profundas sus raíces.*

Iris Fañanás



# ÍNDICE

<b>RECONOCIMIENTOS</b> .....	<b>VII</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. La germinación de las semillas</b> .....	<b>3</b>
1.1. Estructura y desarrollo de las semillas .....	3
1.2. Aspectos generales de la semilla .....	4
1.3. Etapas de la germinación .....	6
1.4. Cambios metabólicos durante la maduración y la germinación de la semilla .....	6
1.5. Regulación hormonal de la germinación .....	9
1.6. Regulación transcripcional de la germinación .....	16
<b>2. Efecto de las condiciones ambientales en la germinación</b> .....	<b>17</b>
2.1. Efecto de la temperatura en las semillas y su regulación .....	17
2.2. Otras señales ambientales que afectan a la germinación .....	19
<b>3. <i>Brassica napus</i> como especie modelo para el estudio de la germinación en cultivos</b>	<b>21</b>
3.1. Importancia económica de los cultivos de colza .....	22
3.2. La germinación en el género <i>Brassica</i> .....	24
3.3. Principales diferencias entre las semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Brassica napus</i> .....	25
3.4. La importancia de la germinación en el establecimiento de las plántulas .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Material vegetal</b> .....	<b>33</b>
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
1.2. <i>Brassica napus</i> .....	33
<b>2. Material microbiológico</b> .....	<b>34</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i> : Transformación, siembra y cultivo .....	34
2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Transformación, siembra y cultivo .....	35
2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Transformación, siembra y cultivo .....	35
<b>3. Material plasmídico</b> .....	<b>36</b>

## ÍNDICE

<b>4. Clonajes</b> .....	<b>37</b>
4.1. Generación de construcciones mediante tecnología Gateway.....	37
4.2. Generación de construcciones mediante enzimas de restricción y reacciones de ligación.....	37
4.3. Generación de construcciones CRISPR/Cas9 mediante sistema pDE-CAS9-FASTGG .....	38
<b>5. Oligonucleótidos</b> .....	<b>38</b>
<b>6. Generación de mutantes y líneas transgénicas</b> .....	<b>39</b>
6.1. Generación de dobles mutantes en <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante cruzamiento genético .....	39
6.2. Mutagénesis dirigida .....	39
6.3. Transformación de <i>Brassica napus</i> .....	39
<b>7. Estudio de ácidos nucleicos (DNA)</b> .....	<b>40</b>
7.1. Reacción en cadena de la polimerasa .....	40
7.2. Electroforesis de DNA .....	41
7.3. Extracción y purificación de DNA.....	41
7.4. Secuenciación de DNA .....	42
<b>8. Genotipado</b> .....	<b>43</b>
<b>9. Análisis de expresión génica</b> .....	<b>44</b>
9.1. Extracción y purificación de RNA de semillas .....	44
9.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	44
9.3. PCR cuantitativa de tiempo real (qPCR).....	45
9.4. Secuenciación masiva de RNA (RNASeq) .....	45
<b>10. Ensayos de ruptura de testa y germinación</b> .....	<b>46</b>
10.1. Ensayos de germinación en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	46
10.2. Ensayos de germinación en <i>Brassica napus</i> .....	47
<b>11. Ensayos de Y1H en levadura</b> .....	<b>49</b>
<b>12. Ensayos de Y2H en levadura</b> .....	<b>50</b>
<b>13. Ensayos de expresión transitoria</b> .....	<b>50</b>
13.1. Ensayos de regulación transcripcional transitoria .....	50
13.2. Ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC) .....	51
<b>14. Estudio de proteínas</b> .....	<b>51</b>
14.1. Extracción de proteínas .....	52
14.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP) .....	52
14.3. Western Blot.....	52
<b>15. Análisis del meristemo radicular de <i>brassica napus</i> durante la germinación</b> .....	<b>53</b>
<b>16. Análisis bioinformáticos</b> .....	<b>54</b>
16.1. Análisis estadísticos .....	54

16.2. Análisis de datos fenotípicos, transcripcionales, metabolómicos y hormonales de la germinación de <i>Brassica napus</i> .....	55
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>2. Análisis del proceso de germinación en distintas variedades de <i>Brassica napus</i> .....</b>	<b>79</b>
2.1. La velocidad de germinación es el carácter clave que más contribuye a la variabilidad en la dinámica de germinación entre variedades de colza.....	79
2.2. Los perfiles metabolómicos durante la germinación definen un patrón común de cambio metabólico en <i>B. napus</i> .....	85
2.3. El balance hormonal entre GAs y ABA determina el rendimiento de la germinación en <i>B. napus</i> .....	88
2.4. Las interacciones entre proteínas clave en la señalización e intercomunicación entre ABA/GAs durante la germinación se conservan en <i>B. napus</i> .....	95
2.5. Los principales cambios transcriptómicos se producen en las primeras horas del proceso germinativo .....	97
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>167</b>
<b>4. La velocidad de germinación es un carácter clave en la variabilidad de la germinación de <i>B. napus</i> .....</b>	<b>173</b>
<b>5. La reactivación del metabolismo en <i>B. napus</i> es similar a otras especies, regulando el proceso de germinación.....</b>	<b>174</b>
<b>6. El balance entre ABA y GAs es determinante en el desarrollo de la germinación de <i>B. napus</i> .....</b>	<b>175</b>
<b>7. Los cambios transcripcionales a las 12h son cruciales en el desarrollo de la germinación en <i>B. napus</i> .....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>233</b>



## ABREVIATURAS

**3-AT:** Amitrol

**ABA:** Ácido abscísico

**AD:** Dominio de activación

***B. napus:*** *Brassica napus*

**BD:** Dominio de unión

**bp:** pares de base

**BR:** Brasinoesteroide

**cDNA:** DNA complementario

**CDS:** Secuencia codificante

**Co-IP:** Co-inmunoprecipitación

**CRISPR/Cas9:** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9

**CWRE:** Enzima de remodelación de la pared celular

**DEG:** Gen expresado diferencialmente

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**eBL:** 24-Epibrassinólido

**EDTA:** Ácido etilen diamino tetra acético

**EdU:** 5-etinil-2'-deoxiuridina

**FT:** Factor de transcripción

**GA:** Giberelina

**GAI:** *Gibberellic Acid insensitive*; proteína DELLA

**gDNA:** DNA genómico

**GO:** Ontología génica

**HSP:** HEAT SHOCK PROTEIN

**LB:** Luria & Bertani; medio de crecimiento para bacterias

**Log<sub>2</sub>(FC):** Logaritmo en base 2 de la magnitud del cambio entre dos muestras

**LUC:** Luciferasa

**MA:** Medio de agroinfiltración

**MES:** Ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico

## ABREVIATURAS

**miRNA:** microRNA

**mPS/PI:** modified pseudo-Schiff propidium iodide

**mRNA:** RNA mensajero

**MS:** Murashige & Skoog medium

**NCED:** NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE

**OD:** Densidad óptica

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PEG:** Polietilen glicol

**Phy:** Fitocromo

**p/p:** peso/peso

**p/v:** peso/volumen

**RGA:** *Repressor of gal-3*; proteína DELLA

**RGL:** *RGA like*; proteínas DELLA

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNaseq:** Secuenciación masiva de RNA

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**rpm:** Revoluciones por minuto

**rRNA:** RNA ribosomal

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa a tiempo real

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**TAE:** Tris-acetato EDTA

**TCA:** Ciclo de los ácidos tricarbónicos

**v/v:** volumen/volumen

**Y1H:** “Yeast one Hibrid”, Ensayo de un híbrido

**Y2H:** “Yeast two Hibrid”, Ensayo de doble híbrido

**YPAD:** Yeast Extract-Peptone-Adenine-Dextrose

$\frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$ : microeinstein por metro cuadrado y segundo

## RESUMEN

El primer paso crítico para la producción de cultivos, y que determina el éxito o el fracaso de la cosecha, es el establecimiento correcto de las plántulas tras la imbibición y germinación de las semillas. La germinación, definida como la emergencia de la radícula a través del endospermo y la testa, es un proceso controlado por la interacción entre el genotipo y las condiciones ambientales y regulado por el balance de dos hormonas con efectos antagónicos, el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs). El conocimiento de los procesos básicos que regulan la germinación se ha obtenido, en gran medida, gracias al estudio de la planta modelo *Arabidopsis*, un pariente cercano de los cultivos de *Brassica*. Estos estudios han proporcionado una guía valiosa para interpretar y abordar el análisis de este proceso en especies cultivables con valor agronómico. Entre las condiciones ambientales que afectan al proceso de germinación, las altas temperaturas limitan la productividad de los cultivos, aunque los mecanismos reguladores de respuesta en semillas no son bien conocidos.

En trabajos previos realizados en el laboratorio, se describió una red génica esencial para la germinación de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a GAs. Dicha red está controlada por dos factores de transcripción (FT) con papeles antagónicos, RGL2, la principal proteína DELLA encargada de inhibir el proceso germinativo, y el FT NAC25, un regulador positivo de la expansión celular del endospermo y la germinación. A su vez, estos FTs controlan la expresión del gen *EXPA2* (*EXPANSINA 2*) y otros genes que codifican enzimas de remodelación de la pared celular (*CWREs*) en el endospermo. Adicionalmente, en estos trabajos se obtuvieron evidencias preliminares de que dicha red podría integrar también la señalización por brasinoesteroides (BRs) mediante la participación del FT de tipo bHLH. Los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis nos han permitido comprobar que este FT de tipo bHLH interacciona con RGL2 y NAC25 y regula la expresión de la *EXPA2* a través de las secuencias E-box y G-box presentes en su promotor. Además, el análisis de mutantes de pérdida de función del gen confirmó que el FT de tipo bHLH es necesario para integrar la señalización mediada por BRs durante la germinación en *Arabidopsis*.

El segundo objetivo de esta tesis era establecer las características germinativas básicas de colza, *Brassica napus*, un cultivo de *Brassica* de gran interés agronómico. Para ello, se abordó el análisis en profundidad de 6 variedades de invierno de colza que muestran una gran variabilidad en el desarrollo del proceso germinativo. Los resultados indican que la velocidad de germinación es el principal componente que contribuye a esta variabilidad. El análisis comparativo entre estas variedades nos ha permitido determinar los procesos metabólicos y hormonales comunes entre ellas. Además, hemos identificado los niveles de malato y aspartato, así como el balance ABA/GAs como marcadores cruciales del rendimiento germinativo. También se demostró que las interacciones proteicas entre FTs claves en la germinación de *Arabidopsis thaliana* están conservados en *B. napus*. Finalmente, estudios transcriptómicos comparativos entre variedades con distintas dinámicas germinativas nos han permitido identificar varios genes y procesos biológicos cuya activación temprana podría ser responsable de las diferencias en germinación observadas.

## RESUMEN

Por último, se estudió el efecto de una temperatura más cálida en la germinación de las semillas de *B. napus*. Para ello, se utilizaron 12 variedades de primavera de colza que respondían de forma diferencial a este aumento de temperatura. El análisis de sus dinámicas de germinación nos ha permitido identificar los principales caracteres que contribuye a la variabilidad de respuesta al aumento de temperatura durante la germinación. Además, distintos estudios celulares del embrión de semillas de *B. napus* durante la germinación y en respuesta al aumento de temperatura, nos permitió determinar el escaso papel de la activación del meristemo radicular en la regulación de este proceso. Finalmente, llevamos a cabo un análisis transcriptómico comparativo entre dos variedades de colza que diferían en la respuesta al aumento de temperatura. Estos análisis nos han permitido obtener evidencias de que la aceleración de la germinación en respuesta a temperatura viene precedida por la activación precoz de genes de procesos reguladores clave en dicho proceso, así como la represión adelantada de genes relacionados con la maduración y la dormición de las semillas.

En conjunto, hemos descrito un módulo integrador de la señalización por GAs y BRs durante la germinación de Arabidopsis, así como identificado los procesos hormonales y metabólicos claves de la germinación de *B. napus* y el efecto de la temperatura sobre los mismos. Los conocimientos y datos generados en estas Tesis son de gran importancia para arrojar luz sobre el proceso de germinación en plantas de la familia de las Brassicáceas, y podrían ser utilizados para facilitar el estudio de la germinación en cultivos emparentados. Además, los genes claves identificados que regulan dicho proceso se podrían usar como posibles dianas para la mejora del rendimiento germinativo en estos cultivos.

## ABSTRACT

The first critical step for crop production, which determines the success or failure of the harvest, is the correct establishment of seedlings after imbibition and germination of the seeds. The latter is defined as the emergence of the radicle through the endosperm and the testa. Germination is a process controlled by the interaction between the genotype and environmental conditions and regulated by the balance of two hormones with antagonistic effects, abscisic acid (ABA), and gibberellins (GAs). Knowledge of the basic processes that regulate germination has been obtained to a large extent from the study of the model plant *Arabidopsis*, a close relative of *Brassica* crops. These studies have provided a valuable guide to interpret and address the analysis of this process in cultivable species with agronomic value. Among the environmental conditions that affect the germination process, high temperatures are an important environmental factor that limits crop productivity. However, the regulatory mechanisms of the response to increased temperatures in seeds are not well known.

In previous work carried out in the laboratory, an essential gene network for the germination of *Arabidopsis thaliana* seeds in response to GAs was described. This network is controlled by two transcription factors (TFs) with antagonistic roles, RGL2, the main DELLA protein responsible for inhibiting the germinative process, and NAC25, a TF which promotes the germination process in response to GAs. In turn, these TFs control the expression of the *EXPA2* gene (*EXPANSIN 2*) and other genes encoding cell wall remodeling enzymes (CWREs) in the endosperm. Additionally, preliminary evidence showed that this network could also integrate brassinosteroids (BRs) signaling through the participation of a bHLH-type TF. The results obtained during the development of this thesis have allowed us to verify that the bHLH-type TF interacts with RGL2 and NAC25 and regulates the expression of *EXPA2* through the E-box and G-box sequences localized in its promoter. Furthermore, analysis of loss-of-function mutants confirmed that the bHLH-type TF is required to integrate BRs-mediated signaling during germination in *Arabidopsis*.

The second objective of this thesis was to establish the basic germinative characteristics of oilseed rape (*Brassica napus*), a *Brassica* crop of great agronomic importance. In this context, an in-depth analysis of 6 winter varieties of oilseed rape that show great variability in the development of the germination process was addressed. The results obtained in these analyzes indicate that germination speed is the main component that contributes to this variability. Moreover, the comparative analysis between these varieties has allowed us to determine the common metabolic and hormonal processes between them. In addition, we have identified that malate and aspartate levels, as well as the ABA/GAs balance are crucial markers of germination performance. We have also showed that the main protein interactions between key TFs in *Arabidopsis thaliana* germination are conserved in *B. napus*. Finally, comparative transcriptomic studies between varieties with different germination dynamics have allowed us to identify several genes and biological processes whose early activation could be responsible for the observed germination traits differences.

## ABSTRACT

Finally, the effect of warmer temperatures on the germination of *B. napus* seeds was studied. For this goal, 12 spring varieties of oilseed rape that responded differentially to warmer temperatures were used. The analysis of its germination dynamics has allowed us to identify the main traits that contribute to the variability of their response to an increase in temperature during germination. In addition, different cellular studies of the *B. napus* seed embryo during germination and in response to increased temperatures, have allowed us to determine the little role of root meristem activation in the regulation of this process. Finally, we carried out a comparative transcriptomic analysis between two oilseed rape varieties with different responses to warmer temperatures. These analyses have allowed us to obtain evidence that the acceleration of germination in response to temperature is preceded by the early activation of genes related with key germination regulatory processes, as well as the earlier repression of genes related to maturation and dormancy of the seeds.

Taken together all these results, we have been able to describe an integrative module of GAs and BRs signaling during Arabidopsis germination together with the identification of key hormonal and metabolic processes of *B. napus* germination and the effect of temperature on them. The knowledge and data generated in this Thesis are of great importance to shed light on the germination process in plants of the Brassicaceae family and could be used to facilitate the study of germination in related crops. In addition, the key genes identified could be used as possible targets to improve germinative yield in these crops.

# INTRODUCCIÓN

---

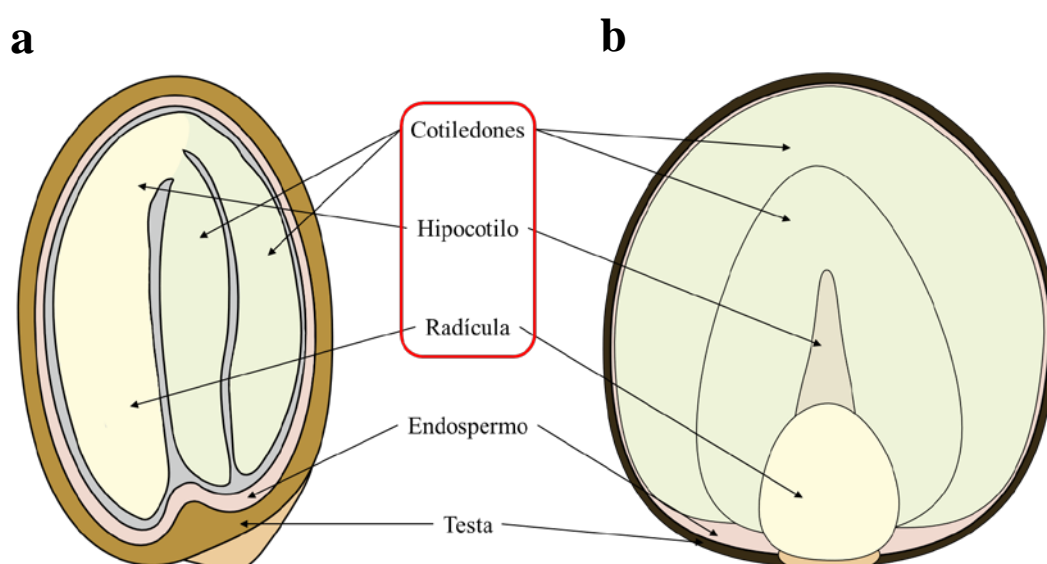


# 1. LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

La germinación es el proceso del desarrollo de las plantas en el que el embrión, que se encuentra dentro de la semilla, reanuda el crecimiento y su radícula atraviesa las diferentes capas de la semilla para establecer una plántula viable.

## 1.1. Estructura y desarrollo de las semillas

La semilla es el órgano encargado de contener y mantener viable el embrión que, en condiciones idóneas, es capaz de desarrollarse para dar lugar a una planta adulta. La semilla está compuesta por 3 elementos diferenciados: el embrión, encargado de dar lugar a una planta adulta, el endospermo y la testa (Figura 1). Los tres componentes de la semilla se forman a partir de distintos tejidos tras la fecundación del óvulo en el ovario.



**Figura 1. Esquema de los componentes de la semilla. (a)** Semilla de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. **(b)** Semilla de la especie *Brassica napus*. En rojo se marcan los órganos que componen el embrión. Modificado de Carrera-Castaño et al (2020).

El embrión se produce de la fecundación de la ovocélula por parte de una de las dos células espermáticas, ambas haploides y aportadas por los granos de polen, siendo por tanto diploide y con material genético materno y paterno. El endospermo es triploide y se desarrolla a partir de la fecundación de las células centrales diploides del óvulo por una de las células espermáticas. La anatomía y función del endospermo es un rasgo que varía ampliamente entre especies vegetales, siendo en algunos casos el principal tejido de reserva de la célula mientras que, en otros, forma una sola capa de células que separa al embrión de la testa. También hay especies, como el guisante o la soja, en las que los nutrientes del endospermo son absorbidos por el embrión durante el proceso de maduración de la semilla (Yan et al., 2014a). Por su parte, la testa es un tejido desarrollado

## INTRODUCCIÓN

a partir de los integumentos y, por lo tanto, diploide y de procedencia exclusivamente materna. Es un tejido formado por diferentes capas, el tegumento externo formado por dos capas celulares y el tegumento interno formado por tres capas, que tras el proceso de maduración acaban muriendo para formar un tejido que actúa como protección del embrión, pero a la vez permitiendo la interacción de la semilla con el medio que les rodea (Haughn and Chaudhury, 2005).

Tras esta doble fecundación, la formación y el desarrollo de la semilla y sus componentes para dar lugar a la semilla madura ocurre en dos etapas, la morfogénesis y la maduración de la semilla. La morfogénesis es el proceso en el que se definen los patrones de desarrollo coordinado entre el embrión (embriogénesis) y el endospermo (Goldberg et al., 1994). La maduración de la semilla ocurre una vez finalizada la morfogénesis y se puede dividir, a su vez, en dos etapas. En la primera, el embrión crece hasta ocupar todo el espacio disponible de la semilla y el endospermo termina su proceso de formación (Hands et al., 2016). En esta etapa también se produce la acumulación de las sustancias de reservas y se inicia el proceso para alcanzar la dormición que impide una germinación prematura de la semilla (Raz et al., 2001). La segunda etapa viene definida por un proceso de adaptación de la semilla a las condiciones de sequedad a la que va a ser sometida (Vicente-Carbajosa and Carbonero, 2005). Así, la semilla entra en un estado de quiescencia metabólica y de tolerancia a estrés hídrico que se conoce como dormición (Locascio et al., 2014).

### **1.2. Aspectos generales de la semilla**

La viabilidad de las semillas viene dada tanto por las condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta madre como por las que se encuentran las semillas, una vez finalizada la fase de maduración. Por tanto, la viabilidad y capacidad germinativa de las semillas viene definida por la interacción entre las condiciones ambientales y la composición genética de la planta y las semillas producidas. Esta interacción determinará los niveles de longevidad, dormición y potencial germinativo de las semillas.

La longevidad de la semilla es el período de tiempo durante el cual la semilla se mantiene viable y es capaz de mantener el potencial germinativo para dar lugar a una planta adulta. Mientras que algunas especies de interés comercial muestran longevidades muy cortas, otras especies han demostrado tener una gran capacidad de resistencia al deterioro a lo largo del tiempo (Shen-Miller et al., 2002; Sallon et al., 2008). Hay varios procesos que afectan a la adquisición de este carácter. Entre estos destacan la ralentización o parada metabólica de la semilla, así como el establecimiento de sistemas para contrarrestar el estrés oxidativo y reparar los posibles daños provocados en ácidos nucleicos y proteínas (Sano et al., 2016). Con el tiempo, el daño acumulado en la maquinaria celular y sus componentes, y la acción de las especies reactivas del oxígeno (ROS), conlleva una pérdida en la viabilidad de la semilla que resulta en la ralentización o imposibilidad de germinar (Carrera-Castaño et al., 2020).

La dormición, por su parte, es el proceso por el que la semilla madura y viable permanece en un estado de latencia en el que es incapaz de germinar pese a la presencia

de condiciones favorables para ello (Penfield, 2017). Aunque este proceso bloquea la germinación incluso en situaciones aparentemente idóneas, supone una ventaja adaptativa. Por un lado, facilita la dispersión de las semillas y evita la competencia por los recursos entre ellas y la planta madre, y por otro, así como permite que el crecimiento vegetativo tenga lugar cuando las condiciones sean las más favorables. En las semillas de angiospermas la dormición fisiológica es la más habitual y puede ser tanto primaria, establecida durante el proceso de maduración de la semilla, como secundaria (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Bewley et al., 2013; Willis et al., 2014). La aparición de esta última se da cuando la semilla pierde la dormición primaria y las condiciones ambientales no son aptas para la germinación (Cadman et al., 2006), indicando que son los factores ambientales los que condicionan la aparición e intensidad de la dormición secundaria. A nivel molecular, unas condiciones no idóneas para la germinación se traducen en un cambio en el equilibrio hormonal, principalmente, entre el ácido abscísico (ABA) y las giberelinas (GAs) (Carrera-Castaño et al., 2020). Un nivel alto de ABA y bajo de GAs promueve el mantenimiento del estado de dormición, mientras que la inversión de estos niveles elimina la dormición permitiendo el inicio de la germinación si las condiciones ambientales son las adecuadas (White et al., 2000; Yamaguchi, 2008; Nambara et al., 2010; Steber et al., 2013). *DOG1* es el principal encargado de mantener la dormición aumentando el balance ABA/GAs cuando las condiciones de temperatura no son las adecuadas (Chiang et al., 2011; Kendall et al., 2011). Además de la disminución del balance ABA/GAs, la dormición también se pierde por otros cambios moleculares que afectan a la sensibilidad a estas dos hormonas. Así, la sensibilidad a ABA puede disminuir mientras que se incrementa la sensibilidad a GAs mediante la acumulación de sus receptores (Corbineau et al., 2002; Koornneef et al., 2002; Leubner-Metzger, 2002; Ali-Rachedi et al., 2004; Chiwocha et al., 2005; Carrera-Castaño et al., 2020). Estas pérdidas de la dormición se pueden dar por dos procesos diferentes entre sí, el *after-ripening* y la estratificación de la semilla. El *after-ripening* es un período de tiempo variable en el que la semilla pierde su dormición al ser expuesta a situaciones de baja humedad y temperatura ((Donohue et al., 2005; Kucera et al., 2005; Bair et al., 2006). Los mecanismos moleculares que subyacen a este proceso, además de los cambios hormonales mencionados, incluyen cambios en la acumulación de ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA), proteínas y en la actividad enzimática de la semilla (Borghetti et al., 2002; Bove et al., 2005; Job et al., 2005; Chibani et al., 2006; Finch-Savage et al., 2007; Leymarie et al., 2007; Carrera et al., 2008; Arc et al., 2011). Por otro lado, la estratificación es un proceso, mucho más breve que el *after-ripening*, en el que las semillas pierden la dormición tras someterse durante unos días a condiciones de alta humedad y bajas temperaturas. El tratamiento de las semillas a baja temperatura provoca la expresión de los genes de los receptores de GAs, la familia *GID1* (Lee et al., 2010), y a su vez, contrarresta la función de *SPT* (*SPATULA*), un factor de transcripción que reprime la expresión de los genes de biosíntesis de GAs (Penfield et al., 2005). Por otro lado, la presencia de luz tras la estratificación provoca la represión de *PIL5*, otro FT que, al igual que *SPT*, reprime los genes de biosíntesis de GAs (Oh et al., 2004, 2006, 2007; Dong et al., 2008).

A nivel agronómico, interesa que los cultivos produzcan semillas con un gran nivel de longevidad, pero con un nivel moderado de dormición, lo que permitirá la germinación

de los cultivos en el momento más óptimo, aunque evitando una germinación prematura en el fruto (viviparismo) sin comprometer su viabilidad

### **1.3. Etapas de la germinación**

Una vez que se ha completado el proceso de maduración y se supera la dormición, la semilla está preparada para llevar a cabo la germinación. En este proceso la semilla pasa de un estado de quiescencia a otro de activación metabólica que comienza cuando la semilla se encuentra en condiciones ambientales favorables y dispone de una cantidad adecuada de agua (Weitbrecht et al., 2011; Rajjou et al., 2012). A nivel mecánico, en la germinación se pueden definir tres eventos principales: la ruptura de testa, la ruptura del endospermo y la protrusión de la radícula (considerada como germinación *sensu stricto*).

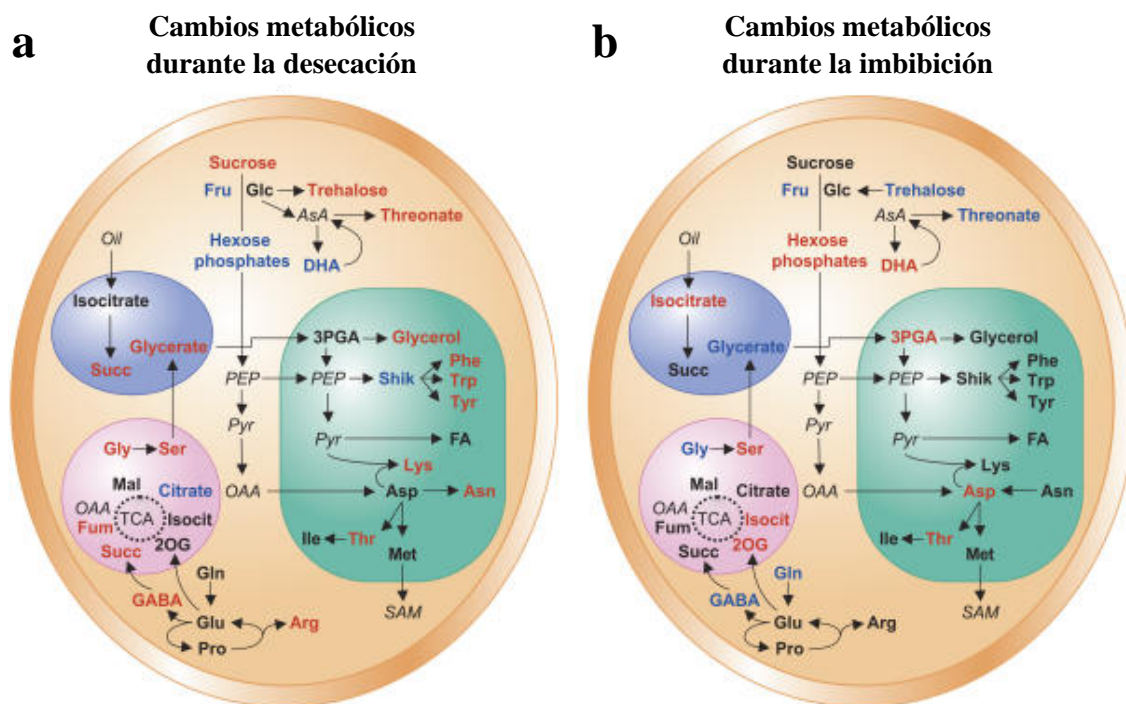
Al comienzo de la germinación, la entrada repentina de agua provoca el hinchamiento de la semilla, la rehidratación del embrión y el endospermo y la reactivación de la respiración celular y el metabolismo. No obstante, esta entrada de agua también provoca daños en membranas, proteínas y ácidos nucleicos que son reparados por la maquinaria celular acumulada durante la fase de maduración (Powell and Matthews, 1979; Bray and West, 2005; Waterworth et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011). Una vez que los niveles de agua permanecen estables en la semilla, la maquinaria celular reactiva la síntesis de proteínas que participan en el proceso de germinación. Por ejemplo, la síntesis de enzimas remodeladoras de la pared celular, CWREs, debilitan la robustez de estas facilitando los procesos de elongación celular en el embrión y el debilitamiento del endospermo que provocan la ruptura de testa (Penfield et al., 2006a; Linkies et al., 2009; Lee et al., 2010; Zhang et al., 2011; Dekkers et al., 2013; Graeber et al., 2014; Rombolá-Caldentey et al., 2014; Sánchez-Montesino et al., 2019). Como consecuencia de la ruptura de la testa y del debilitamiento de las paredes celulares, la entrada de agua en la semilla vuelve a incrementarse, provocando una mayor expansión celular que deriva en la protrusión de la radícula a través de del endospermo y la testa (Schopfer, 2006; Nonogaki et al., 2010; Weitbrecht et al., 2011; Yan et al., 2014b).

En resumen, la germinación es un proceso complejo que comprende la integración de numerosas señales endógenas y ambientales, y que a nivel celular se traducen en cambios metabólicos, moleculares y transcriptómicos, así como en alteraciones en los niveles hormonales.

### **1.4. Cambios metabólicos durante la maduración y la germinación de la semilla**

Durante el último estadio de la maduración, la semilla acumula proteínas, lípidos y carbohidratos. Posteriormente sufre un intenso evento de desecación entrando en un estado de quiescencia metabólica. En este estado, la semilla es capaz de retener su potencial germinativo durante largos períodos de almacenamiento (Roberts, 1973). Una vez que la semilla se embebe y comienza el proceso de germinación, se reactivan los

diferentes procesos necesarios para permitir la transición de semilla a plántula en los que los metabolitos acumulados previamente son claves (Weitbrecht et al., 2011; Nonogaki, 2014; Paszkiewicz et al., 2017). Estos procesos incluyen la respiración celular, la adquisición de energía, la reactivación de los mecanismos de reparación, la movilización de sustancias de reserva y la biosíntesis de proteínas a partir de mRNA almacenado o recién sintetizado. Todos ellos procesos necesarios para la transición desde un sistema de nutrición heterótrofa a uno autótrofa (Holdsworth et al., 2008b; Rajjou et al., 2012).



**Figura 2. Cambios en los niveles de metabolitos localizados en diferentes orgánulos celulares de las semillas.** (a) Cambios metabólicos que se dan durante el proceso de desecación de una semilla madura. (b) Cambios metabólicos que ocurren durante el proceso de imbibición y germinación de las semillas. Las letras azules indican niveles de metabolitos que disminuyen, mientras que las rojas, metabolitos que aumentan. Los orgánulos verdes son los plástidos; los rosas, las mitocondrias y en azul, los glioxisomas). Las flechas indican uno a varios pasos enzimáticos. AsA, Ascorbato; DHA, dehidroascorbato; FA, ácidos grasos; Fum, fumarato; Isocit, isocitrato; Mal, malato; 2OG, 2-oxoglutarato; OAA, oxaloacetato; 3PGA, 3-fosfoglicerato; Pyr, piruvato; Shik, shikimato; Succ, succinato. Modificado de Fait *et al.* (2006).

Durante el proceso de maduración, los niveles de metabolitos primarios (aminoácidos, azúcares, polioles y ácidos orgánicos) disminuyen ya que estos metabolitos se utilizan para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos, que en último término se usan para generar los aceites y proteínas de reserva de las semillas (Fait et al., 2006). Los lípidos que se acumulan en el endospermo de la semilla difieren de los del embrión. Esta diferencia también se refleja en su catabolismo dado que los lípidos del endospermo se movilizan más rápidamente que los del embrión tras el comienzo de la germinación (Penfield et al., 2004, 2006a).

## INTRODUCCIÓN

En el proceso de secado de la semilla (Figura 2a), los niveles de fructosa-6-fosfato y de glucosa-6-fosfato disminuyen, provocando una disminución en la glicólisis (Fait et al., 2006). Sin embargo, se produce una acumulación de ciertos aminoácidos (asparagina, lisina, arginina, triptófano, fenilalanina, tirosina, serina y alanina), así como azúcares y ácidos orgánicos. En particular, destaca la acumulación de la rafinosa, que ocurre desde la maduración y actúa como una fuente de energía, así como protector de las membranas celulares durante la desecación (Baud et al., 2002). La trehalosa, es otro carbohidrato que se acumula durante esta etapa, siendo muy importante en la estabilización y protección de proteínas frente a la desecación (Kaushik and Bhat, 2003). Además de la acumulación de aminoácidos y azúcares, también se observa un incremento en los niveles de ácidos grasos y compuestos derivados, como el glicerol, debido a la degradación de los aceites de la semilla (Chia et al., 2005). La degradación de lípidos en esta etapa de secado provee de energía a la semilla para continuar con su actividad metabólica, pero también se ha sugerido que podría suponer la generación de metabolitos de forma más rápida y más fácilmente disponibles favoreciendo así la recuperación metabólica en los primeros momentos de la germinación (Fait et al., 2006).

Con el proceso de imbibición (Figura 2b), la semilla pasa de un estado de quiescencia a uno de activación total de los procesos metabólicos necesarios para mantener, energéticamente, la germinación. Este cambio ocurre en cuestión de minutos ya que, por ejemplo, las mitocondrias de las semillas son completamente funcionales a los 15 minutos tras la entrada de agua (Paszkievicz et al., 2017). Este hecho concuerda con la rápida producción de ATP y el inicio del intercambio gaseoso en la semilla que tiene lugar en los primeros minutos de la germinación (Botha et al., 1992; Spoelstra et al., 2002; Benamar et al., 2008). En estos primeros momentos, los niveles de metabolitos primarios acumulados durante las fases de maduración y desecación empiezan a disminuir ya que son utilizados rápidamente para la generación de energía. Además, se observa una acumulación de hexosas-fosfato, lo que podría indicar la entrada de azúcares en la ruta de la glicólisis y del 2-oxoglutarato e isocitrato, intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), fruto de la activación de estas dos rutas metabólicas tras la imbibición (Betty and Finch-Savage, 1996; Gallardo et al., 2001; Fu et al., 2005; Fait et al., 2006; Wakao et al., 2008; Smiri et al., 2009; Müller et al., 2010). En *Arabidopsis*, los lípidos acumulados en el endospermo en forma de triacilglicérols se convierten en sacarosa a través de la ruta del glioxilato, y esta se transporta al embrión para ser usada como fuente de energía (en la glicólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones en la mitocondria) y carbono (Penfield et al., 2004). También se observa un aumento en los niveles de metabolitos del TCA, malato, citrato y succinato (Angelovici et al., 2011), siendo el malato un metabolito importante ya que puede oxidarse a oxalacetato, que es el precursor de la gluconeogénesis (Eastmond and Graham, 2001). Por lo general, durante la imbibición y la germinación, los niveles de la mayoría de los aminoácidos se reducen, pero algunos de ellos, como el aspártico, el glutámico y la treonina, se acumulan durante este periodo. El aspártico y el glutámico son substratos de las asparto- y alanina-aminotransferasas que se activan durante la germinación para participar en las rutas respiratorias, así como en la producción de oxalacetato (Perl, 1986; Botha et al., 1992; Miyashita et al., 2007; Rocha et al., 2010). El incremento en los niveles de aspártico y treonina indican una activación de la síntesis de este último aminoácido a partir de la vía de la aspartato-quinasa, lo que también conlleva un incremento en los

niveles de metionina, siendo esta vía importante para el crecimiento de la plántula (Ravanel et al., 2004).

En etapas más tardías de la germinación se produce un aumento en los niveles de azúcares como la fructosa, la glucosa, la maltosa, la sacarosa, y otros carbohidratos como la rafinosa, el sorbitol y la xilosa. El aumento en los niveles de estos metabolitos revela el elevado requerimiento de energía necesario para desarrollar el proceso germinativo (Hill et al., 2003; Schwender et al., 2003; Howell et al., 2009; Gu et al., 2016).

## **1.5. Regulación hormonal de la germinación**

Las señales ambientales tienen que ser integradas con las señales moleculares internas para controlar el proceso de germinación. En esta integración es donde las hormonas juegan un papel clave mediante el control de la expresión génica a lo largo de la germinación. De entre todas las hormonas presentes en las especies vegetales, es el papel antagónico que juegan las GAs y el ABA, el de mayor relevancia en este proceso, siendo las primeras inductoras de la germinación y represoras de la dormición, y la segunda inhibidora de la germinación y promotora de la dormición (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Miransari and Smith, 2014).

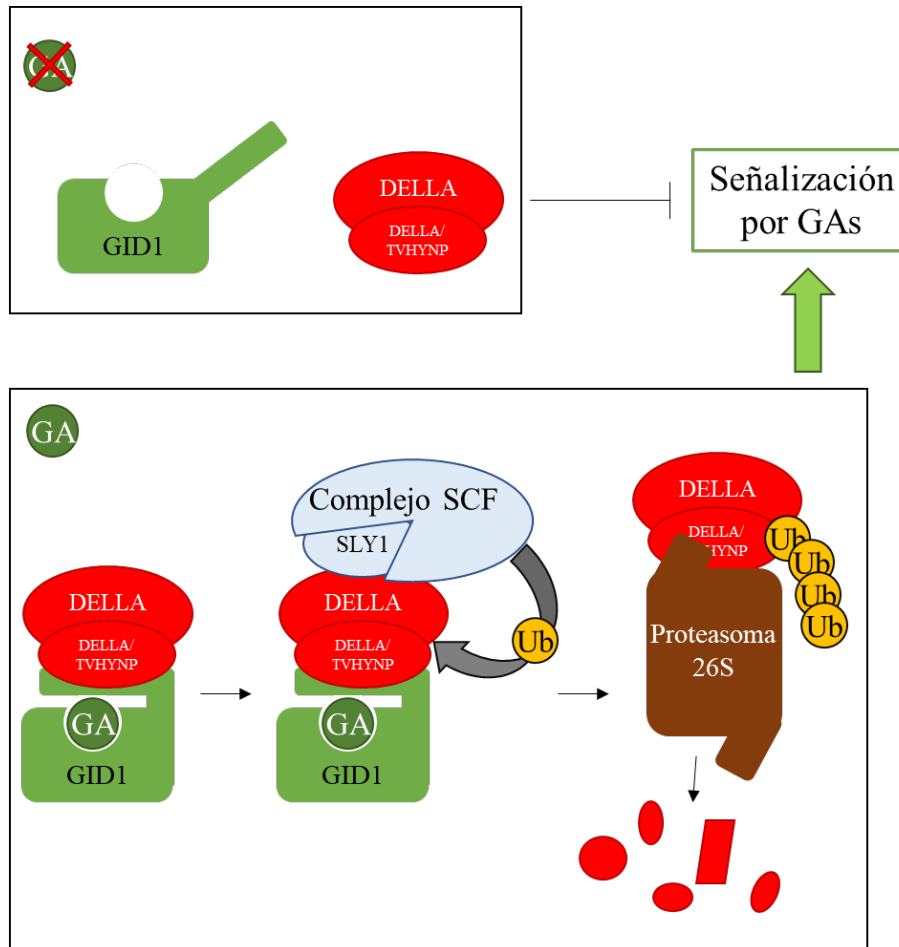
### **1.5.1. Las giberelinas**

Las GAs componen una numerosa familia de ácidos diterpenoides que se han descrito como promotores de procesos del desarrollo mediante la regulación de la división y la elongación celular. Históricamente se han relacionado con procesos como el desarrollo de la flor y el fruto, la germinación, la expansión foliar o la elongación de los internodos (Olszewski et al., 2002; Alabadí et al., 2004; Tyler et al., 2004; Yamaguchi, 2008; Davies, 2010; Cheminant et al., 2011; Shu et al., 2015; Rizza et al., 2017). En los últimos años también se ha desvelado que tienen un papel importante en la respuesta de las plantas a situaciones de estrés (Colebrook et al., 2014; Thomas et al., 2016; Hernández-García et al., 2021). En la germinación, las GAs juegan un papel clave promoviendo la elongación del embrión, la movilización de reservas y la expansión de las células del endospermo que permitirá la protrusión de la radícula a través del endospermo y la testa (Koorneef and van der Veen, 1980; Groot and Karssen, 1987; Silverstone et al., 1997; Telfer et al., 1997; Ogawa et al., 2003; Kucera et al., 2005; Rombolá-Caldentey et al., 2014; Sánchez-Montesino et al., 2019).

La biosíntesis de las GAs comienza a partir de un único precursor, el ent-kaureno, un hidrocarburo heterocíclico que se somete a una serie de oxidaciones, por parte de enzimas oxidasas como las GA<sub>20</sub> y GA<sub>3</sub> oxidasas, generando las principales GAs bioactivas (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>) (Ogawa et al., 2003; Sun, 2008, 2011; Yamaguchi, 2008; Hedden and Thomas, 2012; Lor and Olszewski, 2015; Davière and Achard, 2016). Por otra parte, la inactivación de estas formas activas se produce mediante la actividad de las GA<sub>2</sub> oxidasas. Así, por ejemplo, la GA<sub>1</sub> se cataboliza mediante la acción de una GA<sub>2</sub> oxidasa hasta la forma inactiva GA<sub>8</sub> (Sun, 2008). También se han descrito otros mecanismos de inactivación que implican su metilación o epoxidación o su conjugación con otras

## INTRODUCCIÓN

sustancias (Claeys et al., 2014). Adicionalmente, GA<sub>12</sub>, un precursor de las GAs bioactivas ha sido descrito como una molécula señalizadora a larga distancia dentro de la planta permitiendo la activación de la señalización de esta hormona en los órganos de la planta donde sea necesaria su acción (Regnault et al., 2015; Camut et al., 2019).



**Figura 3. Esquema de la señalización por GAs.** Las GAs son reconocidas por su receptor GID1, el cual sufre un cambio conformacional que le permite unirse a las proteínas DELLA a través de los dominios DELLA y TVHYNP. Los cambios en el motivo GRAS de la DELLA permite que SLY1 la reconozca y sea ubiquitinada por el complejo SCF, induciendo así su degradación mediante el proteasoma 26S y liberando la señalización por esta hormona.

GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1) es el receptor de GAs y está compuesto por un bolsillo de unión a GAs y un extremo N-terminal flexible (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). Cuando la hormona entra en este bolsillo (Figura 3), GID1 sufre un cambio conformacional en el que el extremo N-terminal se pliega cubriendo dicho bolsillo. En esta conformación el fragmento N-terminal es capaz de unirse a las proteínas DELLA, las principales represoras de la respuesta a GAs (Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Chandler et al., 2002; Ueguchi-Tanaka et al., 2007). Las proteínas DELLA son FTs de la familia GRAS cuyo rasgo diferencial es la presencia, en su extremo N-terminal,

de dos motivos conservados, el motivo DELLA, por el que se une a GID1 y que da su nombre a estas proteínas, y el motivo TVHYNP (Peng et al., 1999; Pysh et al., 1999; Dill et al., 2001; Ikeda et al., 2001; Bolle, 2004). La formación del complejo de alta estabilidad GA-GID1-DELLA promueve cambios conformacionales en el dominio GRAS que permiten su reconocimiento por la proteína F-box SLY1/GID2 (SLEEPY1/GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2) (Hirano et al., 2010). Esta F-box forma parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa SCF (S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN1 (SKP1), CULLIN1, F-BOX) que se encarga de la poliubiquitinación de las DELLAs activando su degradación por el proteasoma 26S (Silverstone et al., 2001; McGinnis et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Griffiths et al., 2006; Hartweck and Olszewski, 2006; Nakajima et al., 2006; Willige et al., 2007; Vera-Sirera et al., 2016).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* existen cinco proteínas DELLA: GAI (GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE), RGA (REPRESSOR OF *gal-3*), RGL1 (REPRESSOR OF *gal-3*-LIKE1), RGL2 y RGL3 (Pysh et al., 1999; Hussain and Peng, 2003; Hedden and Sponsel, 2015). Estas cinco DELLAs, aunque comparten funciones redundantes en la represión de la respuesta a GAs también tienen papeles específicos. Su capacidad represora se debe a la promiscuidad de estos FTs a la hora de interactuar con otras proteínas. Así, las DELLAs son capaces de secuestrar a otros reguladores transcripcionales y evitar o favorecer que actúen sobre sus secuencias diana (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Yoshida et al., 2014; Fukazawa et al., 2015, 2017; Marín-de la Rosa et al., 2015) o inhibir la actividad de otros FTs (Hou et al., 2010). La principal DELLA encargada de reprimir el proceso germinativo es RGL2 y, su pérdida de función en mutantes incapaces de sintetizar GAs permite recuperar su capacidad germinativa. También se ha descrito un papel menor de RGA, GAI y RGL1 en este proceso (Dill et al., 2001; Lee et al., 2002; Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004; Cao et al., 2005; Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009; Stamm et al., 2012; Yan et al., 2014b). En el contexto de la germinación, RGL2 actúa como un inhibidor del proceso, siendo capaz de secuestrar a los factores de transcripción, NAC25 y NAC1L, impidiendo que estos activen la expresión de los genes *CWRE* que facilitan la expansión del endospermo (Sánchez-Montesino et al., 2019). También se ha visto que es capaz de secuestrar a los factores de transcripción ATML1 y PDF2 necesarios para la elongación del embrión (Rombolá-Caldentey et al., 2014). Además, RGL2 es necesario para promover el movimiento de ABA desde el endospermo hasta el embrión para poder mantener la dormición (Lee et al., 2010) y, junto a DOF6 (DNA BINDING1 ZINC FINGER6), es capaz de activar el FT GATA12 y promover la dormición (Ravindran et al., 2017). Por otro lado, para llevar a cabo una regulación coordinada de la germinación, la señalización por GAs se integra con las de otras hormonas a través de las DELLAs. Por ejemplo, RGL2 interactúa con tres factores de transcripción NF-YCs (NF-YC3, NF-YC4 y NF-YC9) para promover la expresión de *ABI5* (*ABA-INSENSITIVE 5*), un inhibidor de la germinación que es parte de la señalización por ABA (Liu et al., 2016).

### 1.5.2. El ácido abscísico

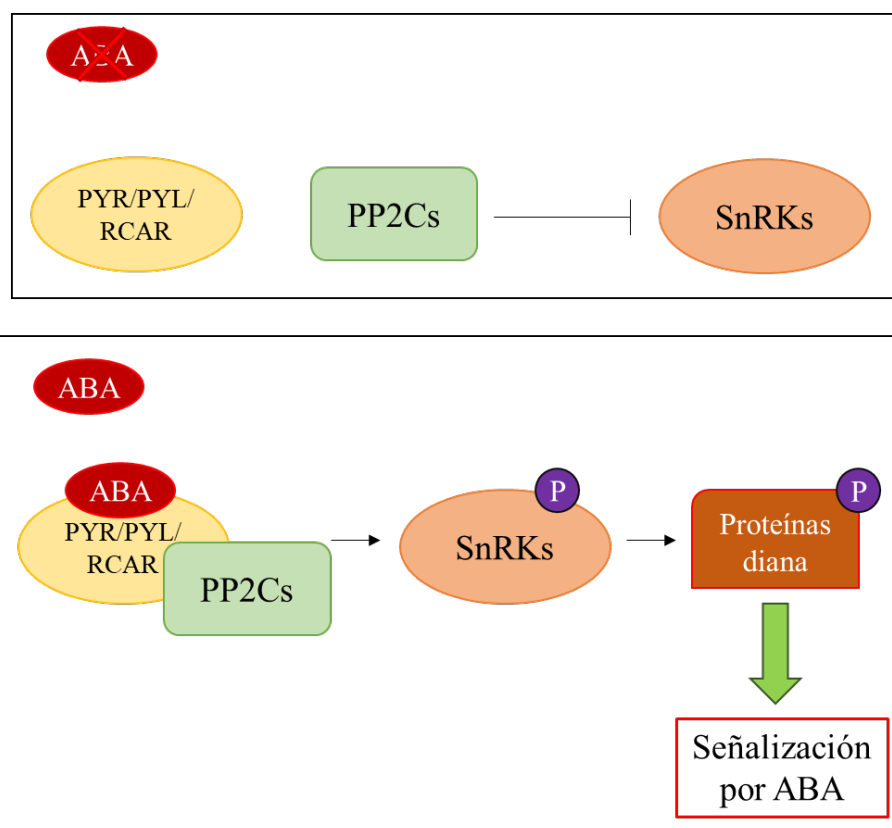
El ABA es la principal fitohormona encargada, durante la maduración y dormición de la semilla, de la preparación de las semillas para hacer frente a la desecación e inhibir la

## INTRODUCCIÓN

germinación cuando las condiciones no son las óptimas. Para ello, el ABA regula la acumulación y movilización de reservas e impide la pérdida de la dormición (Finkelstein et al., 2002, 2008).

La biosíntesis del ABA empieza a partir de la vía de los terpenoides, cuyo precursor es la zeaxantina. Entre las principales enzimas que participan en la biosíntesis de esta hormona están ABA1 (ABA DEFICIENT 1), que se encarga de oxidar la zeaxantina a neoxantina, y NCED6 (NINE-CISa EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 6) y NCED9, que rompen la neoxantina para dar lugar a los precursores más inmediatos del ABA (Seo and Koshiba, 2002). Se ha comprobado que la ausencia o sobreexpresión de sus correspondientes genes en diferentes mutantes eliminan la dormición o provocan una dormición profunda, respectivamente (Koornneef et al., 1982; Frey et al., 1999; Thompson et al., 2000; Lefebvre et al., 2006; Martínez-Andújar et al., 2011). La degradación del ABA en formas inactivas esta mediada por la enzima ABA 8'-hidrolasa (CYP707A2, Saito et al., 2004; Okamoto et al., 2006). Así, en los mutantes de pérdida de función de esta enzima se produce un descenso de su capacidad germinativa (Kushiro et al., 2004; Millar et al., 2006). La respuesta a ABA (Figura 4) comienza cuando los receptores PYR/PYL/RCAR (Ma et al., 2009; Park et al., 2009) se unen a la hormona, inactivando a las fosfatasa PP2C, lo que a su vez permite que las quinasas SnRKs fosforilen a sus proteínas diana (Miyazono et al., 2009; Nishimura et al., 2009). Entre estas proteínas se encuentran distintos canales iónicos y los factores de transcripción ABI3, 4 y 5 (ABA INSENSITIVE 3, 4 y 5) que regulan la señalización mediada por ABA (Koornneef et al., 1984; Giraudat et al., 1992; Finkelstein, 1994; Finkelstein and Lynch, 2000; Lopez-Molina et al., 2001; Finkelstein et al., 2002).

La decisión de germinar o de permanecer en el estado de dormición está determinada por el balance ABA/GAs en el interior de la semilla, por lo que la señalización de estas dos hormonas necesita estar fuertemente coordinada. Por ejemplo, la DELLA RGL2 forma parte de esta integración de la señalización de ambas hormonas potenciando la señalización por ABA mediante los factores NF-YCs (Liu et al., 2016). Además, como se describirá más adelante, este balance hormonal es el responsable de la integración de las respuestas a distintos factores ambientales durante la germinación.



**Figura 4. Esquema de la señalización por ABA.** Cuando el ABA se une a los receptores PYR/PYL/RCAR se produce una inactivación de las fosfatasa PP2C, lo que permite que las quinasas SnRKs fosforilen a aquellas proteínas diana que desencadenarán la respuesta a esta hormona.

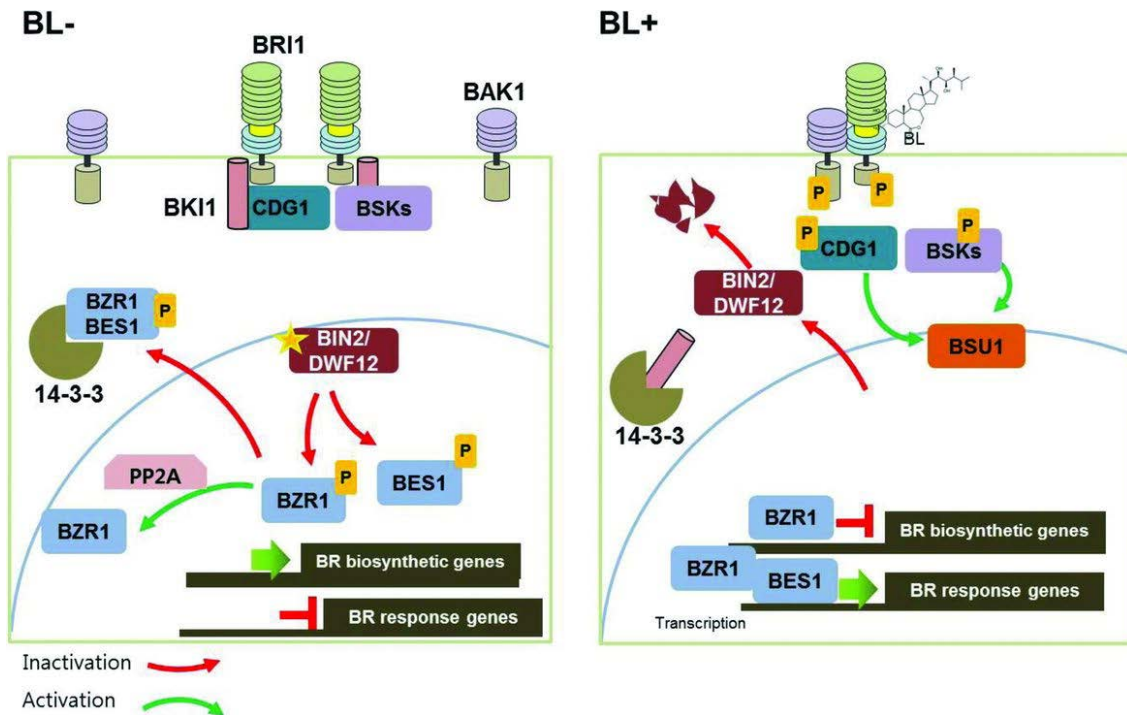
### 1.5.3. Los brasinoesteroides

Aunque las GAs y el ABA son las principales hormonas encargadas de regular la germinación, también se ha descrito un papel regulador de otras hormonas, como los brasinoesteroides (BRs) (Steber and Mccourt, 2001; Hu and Yu, 2014; Zhao et al., 2019; Carrera-Castaño et al., 2020). Los BRs son una familia de hormonas polihidroxiesteroideas que participan en un gran número de procesos durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Khrpach et al., 2000). Además, juegan un papel importante en la adaptación de las plantas a diferentes estreses bióticos y abióticos (Nolan et al., 2020). Por ejemplo, en respuesta a altas temperaturas, los principales TFs de la ruta de señalización de BRs, BES1 y BZR1, se acumulan para promover la respuesta termomorfogénica de la planta (Ibañez et al., 2018; Martínez et al., 2018). Bajo estas mismas condiciones, también se ha descrito que se favorece el crecimiento de la raíz mediante una disminución en la sensibilidad a BRs (Martins et al., 2017).

La biosíntesis de esta hormona empieza a partir del esterol, campesterol, que da lugar a la catasterona, el precursor inmediato del brasinólido activo, mediante dos posibles rutas de oxidación (Fujioka and Sakurai, 1997). Esta forma bioactiva puede sufrir reacciones de hidroxilación, epimerización, reducción o conjugación para dar lugar a otras formas

## INTRODUCCIÓN

activas, inactivas o de almacenamiento. Cuando los BRs se unen a su receptor BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1; Figura 5) se inicia la cascada de señalización mediante la activación de su actividad quinasa (Li and Chory, 1997; Wang et al., 2001, 2012; Kinoshita et al., 2005; Kim and Wang, 2010a; Clouse, 2011; Jaillais et al., 2011; She et al., 2011). Esto provoca la disociación de BRI1 del inhibidor BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR1) y su asociación con la quinasa BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) (Li et al., 2002; Nam and Li, 2002; Wang and Chory, 2006; Jaillais et al., 2011; Wang et al., 2011a; Gou et al., 2012). Cuando estas dos proteínas se encuentran unidas son capaces de autofosforilarse (Wang et al., 2008; Clouse, 2011) y, a su vez, fosforilar a las quinasas BSK1 (BRASSINOSTEROID-SIGNALLING KINASE1) y CDG1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1) (Tang et al., 2008; Kim et al., 2011). Esta cascada de fosforilación continúa cuando BSK1 y CDG1 activan a BSU1 (BRI1-SUPPRESSOR1) (Mora-García et al., 2004; Kim et al., 2009, 2011), encargado de inactivar a la quinasa BIN2 y eliminarla mediante su degradación por el proteasoma (Peng et al., 2008; Kim and Wang, 2010b). Una vez detectados los BRs, y en ausencia del represor BIN2, los factores de transcripción BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) y BES1 son capaces de defosforilarse (Tang et al., 2011) y trasladarse al núcleo donde pueden continuar con la cascada de señalización (He et al., 2005; Yin et al., 2005; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011).



**Figura 5. Esquema de la señalización por BRs.** Cuando los BLs son percibidos por BRI1, este se separa del inhibidor BKI1 y se asocia con la quinasa BAK1, produciéndose la autofosforilación de estas y la fosforilación de BSK1 y CDG1. La activación de BSU1 a partir de BSK1 y CDG1 provoca la degradación de BIN2 y la liberación de los FT BZR1 y BES1. Tomado de Chung and Choe, (2013).

En *Arabidopsis* se ha descrito un papel sinérgico de los BRs con las GAs en el control de la germinación. Así, aunque la ausencia de los BRs no provoca ninguna alteración significativa del proceso germinativo, si son capaces de recuperar la germinación de mutantes deficientes en la biosíntesis de GAs (*ga1-3*, *ga2-1* y *ga3-1*), así como de mutantes insensibles a esta hormona como *sly1-2* (Steber and McCourt, 2001). Por otro lado, los BRs también antagonizan la señalización del ABA (Steber and McCourt, 2001) y BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR1) interacciona con ABI5 para impedir que este se una a los promotores de sus genes dianas y ejerza su función (Zhao et al., 2019). Además, BES1 es capaz de interactuar con el complejo represor formado por TPL (TOPLESS)-HDA19 (HISTONEDEACETILASA 19) para deacetilar histonas en la cromatina de *ABI3*. Esta modificación de la cromatina provoca una mayor compactación de la misma, resultando en la represión transcripcional de *ABI3*, un inhibidor de la germinación de la ruta del ABA (Ryu et al., 2014). Por su parte, BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2), un regulador negativo de la señalización por BRs, es capaz de estabilizar ABI5 mediante su fosforilación, aumentando su estabilidad y potenciando la inhibición de la germinación por ABA (Hu and Yu, 2014).

El efecto promotor de los BRs se ha observado también en arroz (*Oryza sativa*), donde BZR1 es capaz de unirse al promotor de *RAmy3D* y promover su expresión, desencadenando la expresión de esta  $\alpha$ -amilasa que degrada el almidón presente en el endospermo (Xiong et al., 2022). La promoción de la germinación mediada por la señalización de BRs en el endospermo ya había sido observada anteriormente en tabaco (*Nicotiana tabacum*), en un proceso totalmente sinérgico al promovido por las GAs (Leubner-Metzger, 2001). Recientemente se ha observado que dos factores de transcripción del tipo bHLH (BEE2 y HBI1), inducidos en respuesta a GAs y BRs, participan en el proceso de ruptura del endospermo mediante la regulación de la expresión de *GASA6* (*GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6*). Este mecanismo apunta a un posible punto de unión entre la señalización de estas dos hormonas durante la germinación (Zhong et al., 2021).

#### 1.5.4. Otras hormonas

Además de las comentadas anteriormente, existen otras hormonas como las auxinas, las citoquininas, las estrigolactonas, el etileno y los jasmonatos que parecen tener un papel en control de la germinación (Carrera-Castaño et al., 2020).

Las auxinas son hormonas cuyo papel durante la germinación no está bien determinado, ya que han sido definidas tanto como promotoras como inhibidoras de la germinación dependiendo de su concentración (Hsueh and Lou, 1947; Brady et al., 2003; Liu et al., 2007; He et al., 2012). Por un lado, las auxinas son capaces de promover la dormición de manera dependiente del ABA, ya que mutaciones en los ARF (AUXIN RESPONSIVE FACTOR), factores de transcripción encargados de la señalización de esta hormona, provocan que las semillas sean menos durmientes y sensibles a tratamientos con ABA (Liu et al., 2013). Por otro lado, durante la imbibición, el importador de auxinas AUX1 (AUXIN RESISTANT 1) aumenta su expresión en el extremo de la radícula,

provocando una acumulación de la hormona en esta región fomentando la división celular y, por tanto, de la germinación (Wang et al., 2016b).

Al igual que con las auxinas, el papel de las citoquininas y de los jasmonatos en la germinación no está bien definido ya que se han realizado observaciones en las que se describen como promotoras o inhibidoras de la germinación (Nikolić et al., 2006; Riefler et al., 2006; Wang et al., 2011c; Jacobsen et al., 2013). Por otro lado, las estrigolactonas y el etileno han sido descritas como hormonas promotoras de la germinación mediante el desbalance del ratio ABA/GAs, además, la aplicación exógena de etileno permite germinar a mutantes incapaces de sintetizar GAs (Toh et al., 2012; Corbineau et al., 2014; Shu et al., 2016).

### 1.6. Regulación transcripcional de la germinación

Tras la desecación de la semilla, su estado de quiescencia molecular no es completo ya que se ha comprobado que ocurren cambios en los niveles de acumulación de transcritos y proteínas que influyen en la pérdida de la dormición durante el *after-ripening*. Esta acumulación de mRNAs específicos se dan en zonas concretas de las células que se encuentren hidratadas (Bove et al., 2005; Leubner-Metzger, 2005). Además, la pérdida de dormición se ha asociado a la presencia y acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden provocar la oxidación de las proteínas y los transcritos acumulados (Oracz et al., 2007; Bailly et al., 2008; Bazin et al., 2011; El-Maarouf-Bouteau et al., 2013). Así, la acumulación de mRNAs en semillas con dormición primaria y semillas durmientes embebidas guardan una gran similitud entre sí, mientras que difieren de los transcritos acumulados en semillas que han pasado el *after-ripening* (Cadman et al., 2006; Finch-Savage et al., 2007). Por lo tanto, los cambios en la acumulación de transcritos durante la pérdida de dormición en las semillas secas son necesarios para establecer el potencial germinativo de las semillas (Carrera et al., 2007; Holdsworth et al., 2008a).

Cuando las semillas no durmientes se embeben y comienzan la germinación, no necesitan de la transcripción de nuevos mRNAs, ya que los transcritos acumulados durante la maduración y desecación de la semilla son suficientes para poder llevar a cabo este proceso (Rajjou et al., 2004). No obstante, los cambios transcripcionales que ocurren en la semilla si son necesarios para asegurar una germinación rápida y uniforme, así como para el establecimiento de la plántula (Nakabayashi et al., 2005; Holdsworth et al., 2008a). En las tres primeras horas desde la imbibición, la expresión de los genes relacionados con la traducción del RNA, la degradación de proteínas y la modificación de las paredes celulares aumentan enormemente (Ogawa et al., 2003; Masubelele et al., 2005; Nakabayashi et al., 2005; Cadman et al., 2006; Carrera et al., 2007; Finch-Savage et al., 2007; Holdsworth et al., 2008a). También se produce un incremento en la expresión de genes que codifican para enzimas participantes en distintos procesos metabólicos (Nakabayashi et al., 2005; Preston et al., 2009), como las  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas que forman parte de la generación de sacarosa a partir de almidón (Li et al., 2022) o las enzimas claves en los procesos de fosforilación oxidativa, glicólisis y el TCA (Xu et al., 2020b).

Conforme avanza la germinación, la expresión de genes de la biosíntesis de GAs (*GA3* y *GA20ox*) aumentan en la radícula, el hipocótilo y el endospermo micropilar, mientras que los genes de biosíntesis de ABA (*NCED6* y *9*) se reprimen al mismo tiempo que se acumulan los de degradación (*CYP707A2*) en la radícula (Yamaguchi et al., 1998; Ogawa et al., 2003; Oh et al., 2006; Okamoto et al., 2006). Todos estos cambios resultan en una alteración en el balance ABA/GAs que promueve el proceso germinativo y el establecimiento de plántula (Weitbrecht et al., 2011).

Cada uno de los compartimentos celulares acumula diferentes mRNAs durante el desarrollo y la germinación de la semilla (Le et al., 2010). Por ejemplo, mientras que el embrión expresa más transcritos relacionados con los procesos de traducción (Penfield et al., 2006b), en el endospermo se expresan más genes relacionados con la remodelación de pared, como la XTH endotransglicosilasas/hidrolasas (Holdsworth et al., 2008b; Endo et al., 2012) o las expansinas (*EXPA1*, 2, 3, 8, 9, 15 y 20; Penfield et al., 2006; Carrera et al., 2008; Linkies et al., 2009; Weitbrecht et al., 2011; Yan et al., 2014; Sánchez-Montesino et al., 2019). Todas estas enzimas favorecen el crecimiento celular mediante el debilitamiento de las paredes celulares, provocando, posteriormente, la ruptura de la testa y del endospermo.

Además, de las previamente mencionadas, existen otras vías de regulación transcripcional en semillas. Los microRNA (miRNA) se han descrito como reguladores de la expresión génica durante el desarrollo y germinación de las semillas (Willmann et al., 2011; Das et al., 2015; Liu and El-Kassaby, 2017). De igual forma, se ha observado que los mecanismos de control epigenético son capaces de modular la expresión de genes involucrados en la dormición, la maduración y la germinación (Carrera-Castaño et al., 2020).

## **2. EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LA GERMINACIÓN**

Para poder germinar en situación óptima, la semilla debe ser capaz de detectar las condiciones ambientales e integrarlas en los mecanismos moleculares que controlan la germinación. Esta integración se lleva a cabo principalmente por los factores que alteran el balance de ABA/GAs dentro de la semilla y los programas de expresión génica que desencadenan.

### **2.1. Efecto de la temperatura en las semillas y su regulación**

Junto con la luz, uno de los factores ambientales más importantes en el control de la germinación es la temperatura. Ante temperaturas bajas, SPT se degrada y deja de reprimir la expresión de *GA3ox* favoreciendo la síntesis de GAs y la germinación (Penfield et al., 2005), por su parte, la presencia de luz provoca la degradación de PIL5, que reprime la síntesis de GAs en ausencia de luz (Oh et al., 2006). Además, la degradación de SPT provoca una disminución en la expresión de *ABI5* y un aumento de

## INTRODUCCIÓN

la expresión de *MFT* (MOTHER OF FT AND TFL1; Vaistij et al., 2013). *MFT* es un promotor de la germinación en semillas que han superado el *after-ripening* (Xi et al., 2010). En ausencia de luz y bajas temperaturas, *PIL5* y *SPT* tienen que actuar complementariamente para bloquear de la germinación (Vaistij et al., 2018), otorgando a las semillas un mecanismo que les permite germinar en la estación adecuada.

Cuando la semilla se encuentra ante temperaturas superiores a las óptimas para llevar a cabo la germinación, se inicia un proceso conocido como termoinhibición, el cual supone la entrada en un estado de dormición secundaria. Este programa, que se inicia con la síntesis *de novo* de ABA para inhibir la biosíntesis de GAs representa una respuesta adaptativa que permite el establecimiento de plántulas en las estaciones más apropiadas para su desarrollo (Reynolds and Thompson, 1971; Abeles, 1986; Gallardo et al., 1991; Yoshioka et al., 1998; Toh et al., 2008). Entre los cambios inducidos por el proceso de termoinhibición, está el aumento de expresión de *FUS3* (*FUSCA3*) y *SPY* (*SPINDLY*), un FT y una N-acetilglucosamina transferasa respectivamente, que aumenta el balance ABA/GAs regulando negativamente la germinación. A su vez, *SPY* actúa potenciando el efector represor de las DELLAs aumentando aún más la represión sobre la germinación (Jacobsen and Olszewski, 1993; Jacobsen et al., 1996; Lee et al., 2002; Wen and Chang, 2002; Silverstone et al., 2007; Chiu et al., 2012). Las altas temperaturas no solo afectan de manera directa al proceso de germinación, sino que también tienen un efecto indirecto durante el proceso de desarrollo, maduración y dormición de la semilla. Un aumento gradual de las temperaturas durante el desarrollo de las semillas en *Arabidopsis*, se traduce en una pérdida paulatina de la capacidad de germinación (Malabarba et al., 2021). Y de igual manera, las bajas temperaturas en la planta madre provoca un aumento de la dormición de las semillas que se están desarrollando debido a la acumulación de *DOG1* y de varias enzimas que catabolizan las GAs (Kendall et al., 2011).

Los fitocromos parecen tener, también, un papel en el control de la germinación en respuesta a la temperatura. Así, *PhyA* tiene un papel importante en la germinación en temperaturas cálidas, *PhyE* parece actuar principalmente en la germinación a temperaturas bajas y *PhyB* contribuye en la germinación a diferentes temperaturas (Heschel et al., 2007). Finalmente, cuando las temperaturas vuelven a unos niveles normales tras un período de temperaturas extremas, *PhyD* se encarga de reducir el nivel de dormición provocada por la termoinhibición eliminando a *PIL5* (Martel et al., 2018).

Además de los cambios moderados en temperatura, los eventos de temperaturas extremas afectan gravemente a la viabilidad de las semillas (Silva-Correia et al., 2014; Lamichaney et al., 2021). El efecto del incremento extremo de la temperatura en las semillas no se da, tan solo, directamente en su viabilidad, sino que también altera de manera indirecta su capacidad germinativa y la composición de la semilla durante el desarrollo de la planta madre o el desarrollo de los frutos (Domergue et al., 2019). Así, por ejemplo, se ha visto que en distintos cultivos de *Brassicaceae* (como *Brassica napus*, *Brassica rapa* o *Brassica juncea*), la temperatura afecta a la producción de silicuas, así como al número de semillas por silicua (Angadi et al., 2000; Morrison and Stewart, 2002). En cuanto al efecto de la temperatura en la calidad de las semillas, se ha observado que las altas temperaturas provocan una menor acumulación de lípidos, almidón y proteínas de alto valor alimentario en cereales y semillas oleaginosas, mientras que provocan un

aumento en los niveles de prolina, carbohidratos solubles, glucosinolatos y otras sustancias de bajo valor nutricional (Aksouh et al., 2001; Jagadish et al., 2015; Morita et al., 2016; Chen et al., 2017; Fahad et al., 2017; Qaseem et al., 2019). Todos estos cambios no solo tienen como resultado una disminución en la calidad y valor nutricional de las semillas, sino que repercuten en su capacidad germinativa.

Por lo general, la respuesta de las plantas a altas temperaturas se ha estudiado en condiciones extremas que desencadenan un choque térmico, pero hay que tener en cuenta que hasta los cambios más pequeños en temperatura pueden tener efectos muy graves en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Calleja-Cabrera et al., 2020). Aunque, existe una extensa bibliografía relativa a la respuesta y tolerancia de plantas modelos y cultivos a altas temperaturas, la literatura referente a la adaptación de las plantas a temperaturas cálidas (o a un incremento moderado) es mucho más reducida (Quint et al., 2016; Dai Vu et al., 2019; Vu et al., 2019). En *Arabidopsis* se ha visto que el incremento leve de la temperatura provoca una aceleración del ciclo vital, incluyendo el tiempo de desarrollo, secado y maduración de la semilla (Huang et al., 2018a). Los pequeños cambios en la temperatura media durante el ciclo vital de la planta madre, así como durante la maduración de la semilla, provocan cambios en la dormición y en el rendimiento germinativo de las semillas. Por ejemplo, en *Brassica oleracea*, la maduración de las semillas bajo temperaturas cálidas provoca una disminución en los niveles de ABA y la inducción de genes relacionados con la germinación en el endospermo (Chen et al., 2021). Este efecto también se ha observado en arroz y cebada, donde la aplicación de temperaturas cálidas durante el llenado del fruto provoca la inducción de la biosíntesis de GAs y una reducción en los niveles de ABA que se refleja en una promoción de la germinación (Hsuan et al., 2019; Sakai et al., 2022). Todos estos resultados sugieren que un posible aumento moderado de las temperaturas durante el invierno causaría un adelanto en la germinación de algunas especies de plantas, mientras que otras especies que necesiten un periodo de estratificación para su germinación podrían no superar el estado de dormición. Por otro lado, si este incremento de temperaturas se produce en primavera o verano se podría producir una inhibición de la germinación, provocando que la germinación de distintas plantas silvestres y cultivos se retrasasen hasta el otoño (Mondoni et al., 2012; Lippmann et al., 2019). Por lo tanto, un leve incremento de las temperaturas tendría un gran impacto ecológico y agronómico. Es necesario estudiar en profundidad los efectos y los mecanismos de respuesta de las plantas a estos aumentos leves de temperatura si queremos generar cultivos más resilientes.

## **2.2. Otras señales ambientales que afectan a la germinación**

De entre todas las señales percibidas por la semilla, la luz es una de las más importantes a la hora de tomar la decisión de germinar o no. Para asegurar el establecimiento y crecimiento de una planta autosuficiente, es necesario garantizar un nivel de luz suficiente que le permita a la planta obtener la energía necesaria (Quail, 2002; de Lucas and Prat, 2014). Los fitocromos son los fotorreceptores encargados de percibir la luz y traducir esa señal en señales fisiológicas capaces de promover o no la germinación. En *Arabidopsis* existen cinco fitocromos, del phyA al phyE, siendo los más importantes phyA y phyB (Rockwell et al., 2006; Strasser et al., 2010; Kami et al., 2012;

## INTRODUCCIÓN

de Lucas and Prat, 2014). En presencia de niveles de luz suficiente, los fitocromos pasan de su forma inactiva a su forma activa para trasladarse al núcleo, donde son capaces de unirse al factor de transcripción PIL5 e inducir su degradación por la vía del proteasoma 26S. Sin la actividad de PIL5, los genes de biosíntesis de GAs, *GA3ox1* y *GA3ox2*, se inducen, mientras que los de la síntesis de ABA, *NCED6* y *NCED9*, se reprimen (Yamaguchi et al., 1998; Oh et al., 2006). De igual manera, la ausencia de PIL5 provoca una caída en los niveles de SOM (SOMNUS), un regulador negativo de la germinación que aumenta la relación ABA/GA en la semilla, y que promueve la expresión de GAI y RGA que también contribuyen a la represión de la germinación (Oh et al., 2004, 2007; Dong et al., 2008; Piskurewicz et al., 2008; Piskurewicz and Lopez-Molina, 2009; Park et al., 2011; Lim et al., 2013). De los otros fitocromos, PhyD y PhyE promovería la germinación en condiciones de luz roja lejana mediante la estimulación de la actividad de PhyA (Hennig et al., 2002; Arana et al., 2014), y PhyC regularía de manera negativa la respuesta de la germinación a la luz mediante la interacción con el resto de fitocromos (Clack et al., 1994).

Otros de los reguladores importantes de la germinación son los nutrientes presentes en el suelo. De entre ellos, el nitrato es uno de los más importantes ya que supone la principal fuente de nitrógeno de las plantas y es el sustrato a partir del cual se sintetiza el óxido nítrico (NO). El NO media la capacidad de la planta de percibir el entorno nutricional en el que se encuentran, además de ser una molécula señalizadora en diferentes procesos biológicos (Bethke et al., 2007; Sanz et al., 2015; Sami et al., 2018). En la germinación, la acumulación de NO se ha relacionado con la activación del PhyB y con la capacidad de estabilizar a HFR1, que a su vez es capaz de unir e inactivar a PIL5 (Shi et al., 2013; Li et al., 2018b). También se ha descrito la capacidad del NO para fomentar la degradación de ABA (Liu and Zhang, 2009), y desestabilizar a ABI5 (Bethke et al., 2007; Gibbs et al., 2014; Sanz et al., 2015). También se ha descrito que, en las primeras fases de imbibición de las semillas, el NO activa la síntesis de GAs y el catabolismo de ABA en el endospermo (Bethke et al., 2007; Liu and Zhang, 2009; Matakiaadis et al., 2009; Sami et al., 2018), así como con la acumulación de algunas proteínas DELLA (Sami et al., 2018). Por otro lado, el calcio ( $Ca^{2+}$ ) también parece tener un papel en el control de la germinación (Liu and Zhu, 1997; Bonilla et al., 2004; Kong et al., 2015). Durante la imbibición se incrementa el bombeo de calcio al interior de las células a través de los canales de  $Ca^{2+}$  (Clarkson, 1984; Hepler and Wayne, 1985; Dodd et al., 2010; Kudla et al., 2010; Kong et al., 2015). Esta entrada de  $Ca^{2+}$  favorece la expresión génica y reprime el efecto del ABA, alterando la expresión de *ABI4* (Penfield et al., 2006b; McAinsh and Pittman, 2009; Dodd et al., 2010; Kudla et al., 2010; Finkelstein, 2013). Finalmente, la presencia de patógenos en el suelo también puede tener un efecto inhibitorio en la germinación evitando que la plántula crezca en condiciones perjudiciales. Por ejemplo, la presencia de compuestos liberados por *Pseudomonas aeruginosa* provoca la expresión de ABI5 de manera dependiente a la actividad de las DELLAs (Chahtane et al., 2018).

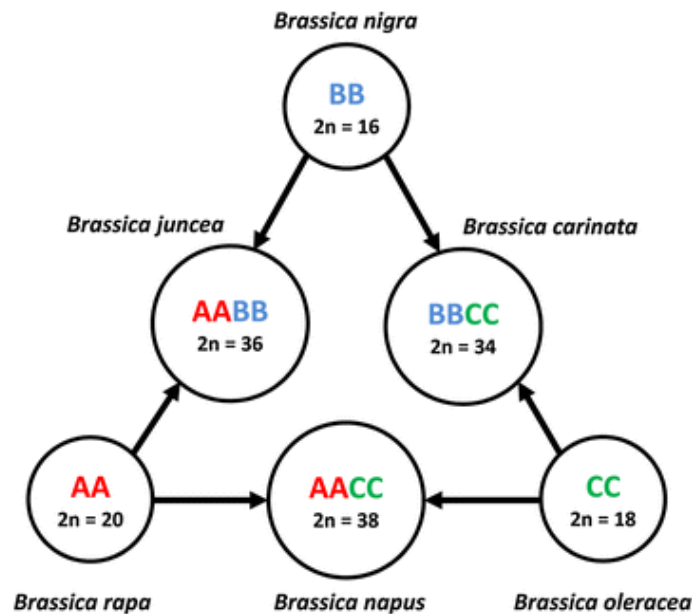
Como ya se ha comentado, la germinación es un proceso del desarrollo influenciado por las condiciones internas y externas de la semilla. El efecto de las señales ambientales está estrictamente integrado y regulado por señales moleculares, coordinadas

principalmente por el balance entre ABA y GAs, para permitir una germinación viable en el momento óptimo.

### **3. *BRASSICA NAPUS* COMO ESPECIE MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN EN CULTIVOS**

*Brassica napus*, colza, es un cultivar perteneciente al género *Brassica* originado a partir de la hibridación de otras dos especies de este género, *Brassica rapa* y *Brassica oleracea*, en un proceso que ocurrió hace 7.500-51.000 años (Yang et al., 2016; Lu et al., 2019). El género *Brassica* reúne a los cultivos vegetales más cercanos filogenéticamente a la planta modelo *Arabidopsis*. Estas especies divergieron de un ancestro común hace unos 10-20 millones de años, y evolucionado hasta poseer genomas mucho más complejos que los de la planta modelo *Arabidopsis* (Wang et al., 2011b). La similitud de los genomas dentro de las especies del género *Brassica* ha permitido la formación de especies híbridas viables como *Brassica napus*. Esta especie es el resultado de una hibridación interespecífica entre *Brassica rapa* ( $2n=20$ , AA) y *Brassica oleracea* ( $2n=18$ , CC) y, por tanto, es una especie alopoliploide conteniendo ambos juegos de cromosomas de los parentales diploides ( $2n=38$ , AACC). Este proceso de hibridación no es el único que ha ocurrido en la familia *Brassica*, dado que las formas ancestrales de las especies *Brassica rapa* ( $2n=20$ , AA), *Brassica oleracea* ( $2n=18$ , CC) y *Brassica nigra* ( $2n=16$ , BB) también se hibridaron entre sí para dar lugar a diferentes especies tetraploides, *Brassica napus* ( $2n=38$ , AACC), *Brassica juncea* ( $2n=36$ , AABB) y *Brassica carinata* ( $2n=34$ , BBCC). La relación entre todas estas especies se recoge en la llamada teoría del “Triángulo de U” que representa la evolución producida entre ellas (Nagaharu, 1935; Figura 6).

Esta relación de proximidad de *B. napus* la hace un buen modelo de cultivo para estudiar distintos procesos del desarrollo vegetal en los que poder aplicar los conocimientos ya existentes en la planta modelo *Arabidopsis*. Adicionalmente, en los últimos años ha crecido el interés por secuenciar el genoma de diferentes variedades de este cultivo, lo que está generando una gran cantidad de información genómica, así como el desarrollo de herramientas bioinformáticas para el análisis de esta especie. Además, dado su parentesco directo con las especies *B. rapa* y *B. oleracea*, los enfoques y estudios realizados con *B. napus* pueden ser transferidos fácilmente a los diferentes cultivos del género *Brassica*.



**Figura 6. Diagrama del Triángulo de U.** En los vértices del triángulo se encuentran las especies diploides, en el centro de cada lado se encuentran las especies híbridas resultantes del cruce entre las especies de los vértices que une cada lado. Tomado de (Koh et al., 2017).

### 3.1. Importancia económica de los cultivos de colza

La alta variabilidad obtenida durante la generación de las distintas variedades cultivadas del género *Brassica* ha dotado a estas especies de un alto grado de adaptabilidad a las condiciones ambientales, así como ha aportado una amplia variedad de especies de alto valor agronómico. La especie *Brassica rapa* comprende cultivos como los grelos, el nabo o la col china; *Brassica oleracea* incluye cultivos como el repollo, la coliflor, el brócoli o la berza; y por su parte *Brassica nigra*, *Brassica juncea* y *Brassica carinata* se cultivan para la producción de diferentes tipos de mostaza a partir de sus semillas.

Las semillas de cereales y oleaginosas son de un gran interés agronómico al constituir una de las principales bases de la alimentación para la humanidad y la ganadería. Las semillas de *Brassica napus* son una de las principales fuentes de aceites vegetales a nivel mundial y su cultivo desde los años 70 se ha incrementado considerablemente hasta situarse como tercer cultivo oleaginoso a nivel mundial. Este aumento se debe a la generación de variedades con un bajo nivel de ácido erúxico en su aceite que era dañino, así como a la alta calidad nutricional de su aceite. En particular, su elevado nivel de ácidos grasos monosaturados y ácidos grasos omega-3, y niveles bajo de ácidos grasos saturados, lo que lo convierten en un aceite muy valorado a nivel nutricional. Con una producción mundial de aceite de 24,4 millones de toneladas, se encuentra solo detrás del aceite de palma (74,6 millones de toneladas) y del aceite de soja (60 millones de toneladas; FAO, <https://www.fao.org/faostat/en>; datos de producción mundial de aceite de 2019). Canadá, la Unión Europea, China e India son los principales productores de colza a nivel mundial,

representando el 78,7 % del total de hectáreas de colza cultivada (35,5 millones) y un 81,7 % de la producción.

El uso del aceite de colza no solo se reduce al consumo humano, sino que también se utiliza con fines industriales y como base para la producción de biocombustibles. Estos últimos han ganado bastante importancia por ser combustibles menos contaminantes y emitiendo menos CO<sub>2</sub> a la atmósfera (European Biodiesel Board, <https://ebb-eu.org/>). En España, el área dedicada al cultivo de colza y su producción han aumentado en los últimos años (Figura 7, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España, <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/>). Parte de este incremento en la producción se debe a un aumento en la demanda de su aceite para la producción de biocombustibles y a una bajada en la producción de este cultivo en otros países. Así, la colza cultivada en España se destina principalmente a su exportación o a la fabricación de biocombustibles.

Además de los diferentes usos del aceite extraído de sus semillas, las partes verdes de la colza también se usan como forraje para alimentar el ganado. De manera similar a lo que ocurre con el ácido erúxico, los altos niveles de glucosinolatos en los tejidos de esta planta pueden tener un efecto tóxico y concederle un sabor poco agradable para las reses. Por este motivo la obtención de variedades con un contenido reducido de glucosinolatos y ácido erúxico (conocidos en inglés como *canola*) supuso un hito en los programas de mejora de este cultivar. Otro de los usos de este cultivar es como cultivo de cobertura, sembrándose durante períodos de inactividad en los campos de cultivo de rotación para evitar la erosión y favorecer la oxigenación del suelo.

Los cultivos de colza se pueden dividir en dos tipos principales: de invierno y de primavera. Las variedades de invierno requieren de un periodo de vernalización para poder florecer, por lo que suelen sembrarse en otoño. Mientras que los cultivos de primavera no necesitan vernalización y se siembran en primavera para crecerlos durante los veranos suaves. En Europa, un clima templado en invierno permite el cultivo de variedades de invierno, mientras que en Canadá se usan preferentemente variedades de verano para evitar la crudeza del invierno (Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada; <https://inspection.canada.ca/>). En regiones de Asia y Australia se utilizan variedades conocidas como semi-invierno (Sun et al., 2017) que se originaron por eventos de introgresión con variedades de col chinas (*B. rapa*; Qian et al., 2007). Estas variedades requieren de un menor tiempo de vernalización que las variedades de invierno (Matar et al., 2021) y difieren de aquellas existentes en Europa por ser menos resistentes a condiciones de frío extremo. Se ha observado que las variedades de invierno son mucho más productivas, y que este efecto puede ser debido al desarrollo de un sistema radicular mucho más extenso y robusto que las otras variedades, lo que les permite obtener un mejor acceso a fuentes de agua y nutrientes (Rahman and McClean, 2013).

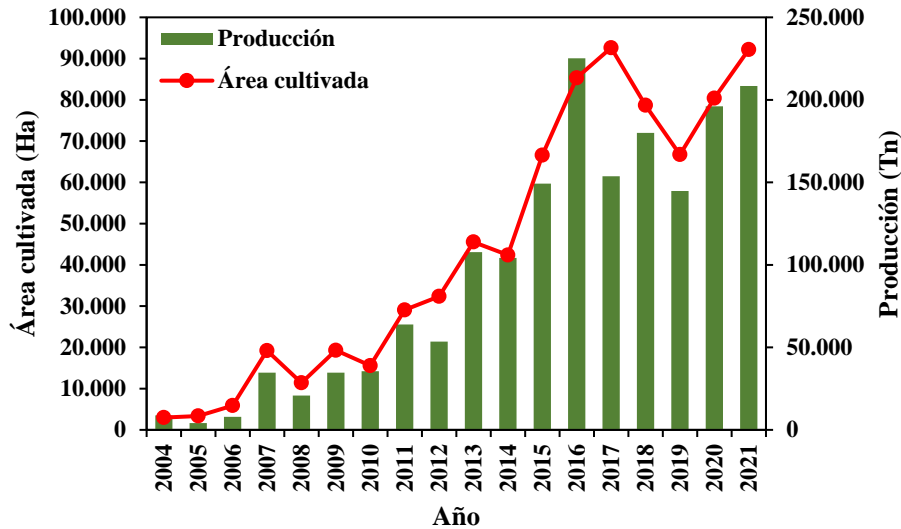


Figura 7. Área y producción del cultivo de colza en España.

### 3.2. La germinación en el género *Brassica*

Hasta la fecha se han realizado muy pocos análisis sobre la germinación en los cultivos de *Brassica*, siendo las especies más estudiadas *Brassica rapa*, *Brassica oleracea* y *Brassica napus*. Análisis de QTLs en variedades de *B. rapa* han permitido encontrar potenciales controladores de la germinación en este cultivar. Así, FLC2 (FLOWERING LOCUS C 2), un importante regulador del tiempo de floración también parece participar en el control de la germinación. Dicho control podría darse de manera similar a lo que ocurre en *Arabidopsis*, donde FLC promueve la germinación mediante la activación del catabolismo del ABA y de la síntesis de GAs (Chiang et al., 2009; Basnet et al., 2015). En *B. rapa* también se ha observado que durante la germinación se inducen las proteínas CWRE, como las endo- $\beta$ -mananasas, que facilitan el debilitamiento del mucílago y la ruptura del endospermo y de la testa durante la germinación (Carrillo-Barral et al., 2017). Además, en esta especie, EXLB1 (EXPANSINE LIKE B1), una proteína encargada de la síntesis de pared celular que se expresa durante el desarrollo de la semilla es capaz de ralentizar la germinación al favorecer la solidez de la pared (Krishnamurthy et al., 2019; Muthusamy et al., 2020).

Por otro lado, en *B. oleracea* durante la maduración de las semillas se acumulan transcritos relacionados con la síntesis de sustancias de reserva y de la proteína LEA (LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT) que preparan a la semilla para su desecación. Además, tras la imbibición de la semilla se produce un gran cambio transcripcional a partir del cual los genes expresados durante la maduración se reprimen, pasándose a expresar genes relacionados con la reactivación metabólica y con la remodelación de las paredes celulares (Soeda et al., 2005). Adicionalmente, en esta especie se ha confirmado el papel de ABI5 como inhibidor de la germinación (Zhou et al., 2013) y, de forma similar a lo que ocurre en *Arabidopsis*, la exposición a temperaturas más cálidas que no supongan un estrés térmico provoca una bajada de la dormición y la aceleración del proceso de germinación (Awan et al., 2018).

La germinación en *B. napus* es un proceso afectado por factores internos y externos, similares al descrito para otras especies. Por ejemplo, la alteración de la germinación en la variedad 1012-98 de *B. napus* se debe a un desbalance hormonal en el que se acumulan metabolitos de ABA y auxinas (Nguyen et al., 2016). También se ha observado que las condiciones de la planta madre durante la producción y maduración de las semillas tiene un fuerte efecto en el vigor y en la capacidad germinativa de las mismas (Hatzig et al., 2015). A nivel de metabolismo, se ha observado que las variedades con un mayor contenido en lípidos también muestran una mayor actividad metabólica, lo que a su vez puede afectar positivamente a su capacidad germinativa (Gu et al., 2019). Finalmente, se han identificado en colza varios genes como *SCO1* (SNOWY COTYLEDON 1), *ARR4* (ARABIDOPSIS TWO-COMPONENT RESPONSE REGULATOR 4) y *ATE1* (ARGINYL-t-RNA PROTEIN TRANSFERASE 1) cuyos ortólogos participan en el proceso de germinación de Arabidopsis (Albrecht et al., 2006; Holman et al., 2009; Wang et al., 2011c). En resumen, aunque se han visto que existen procesos comunes en la regulación de la germinación de *B. napus* y Arabidopsis, también se espera que existan mecanismos diferenciales entre ambas especies, en parte debido a la presión selectiva ejercida sobre este cultivo durante la selección de variedades para su uso en la agricultura.

### **3.3. Principales diferencias entre las semillas de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus***

Como ya hemos comentado, *B. napus* está emparentada con la planta modelo Arabidopsis debido a que ambas comparten un antepasado común dentro de la familia *Brassicaceae*. Así, los miembros de esta familia comparten distintos rasgos comunes, como las flores compuestas por cuatro pétalos en disposición de cruz que les confiere el nombre de crucíferas, y una alta producción de semillas en frutos con forma de vaina llamados silicuas. Ambas plantas comparten un proceso de desarrollo muy similar entre sí y, genéticamente, mantienen un 85 % de similitud (Cavell et al., 1998). Pese al parentesco, el cultivo de colza ha supuesto un constante proceso selectivo en el que se han seleccionado aquellas plantas con rasgos de interés agronómico al que no ha estado sometida Arabidopsis. En el caso de la colza, sus semillas son la principal fuente de aceite lo que se traduce en diferencias muy significativas en el tamaño y forma de sus semillas. Mientras que las semillas de Arabidopsis presentan una forma elipsoidal con una longitud de unos 485  $\mu\text{m}$  y un ancho de 270  $\mu\text{m}$ , las semillas de colza tienen una forma esférica con un diámetro que ronda los 2000  $\mu\text{m}$  (Figura 1; Li et al., 2006). Las diferencias en peso y volumen entre ambas especies son mayores, siendo las semillas de colza más de 200 veces más pesadas que las semillas de Arabidopsis. Estas diferencias de tamaño también se traducen en diferencias en las proporciones de los tejidos que componen las semillas. Así, testa y endospermo suponen un 30 % del peso y el volumen de las semillas de Arabidopsis, pero solo un 15 % en semillas de colza. Igualmente, los tamaños de los órganos del embrión también son diferentes, siendo los cotiledones de colza relativamente mucho más grandes que los de Arabidopsis. Debido al tamaño desproporcionado de los cotiledones, el 90 % de las reservas de ácidos grasos de la semilla se acumulan aquí, lo que supone una gran diferencia con respecto a Arabidopsis (59 %) (Li et al., 2006). En cuanto a la composición de los lípidos y ácidos grasos, la diferencia más notable entre

*Arabidopsis* y *B. napus* es el contenido, en esta última, de ácidos grasos  $\omega$ 9 22:1 (ácido erúxico) en todos los compartimentos de la semilla, y el contenido de ácidos grasos  $\omega$ 7 22:1 en el endospermo.

Estas diferencias de tamaño y composición entre semillas pueden significar diferencias a nivel del proceso germinativo, como la velocidad o el control molecular de este proceso. No obstante, no se ha realizado un análisis extensivo que analice la germinación de *B. napus* en comparación a los conocimientos que se tienen de *Arabidopsis*.

### **3.4. La importancia de la germinación en el establecimiento de las plántulas**

El vigor de las semillas se define como la suma de las propiedades que determinan su potencial para tener un rendimiento germinativo rápido y uniforme bajo un extenso abanico de condiciones ambientales (Perry, 1978). La germinación es uno de los componentes principales del vigor de las semillas, siendo un paso crítico en el desarrollo de las plantas y determinando su supervivencia y su éxito reproductivo (Graeber et al., 2014). Se ha observado en diferentes cultivos que un mayor vigor de las semillas se relaciona con un mejor rendimiento de dichos cultivos en condiciones de campo (TeKrony and Egli, 1991; Ghassemi-Golezani et al., 2010a; Ghassemi-Golezani et al., 2010b; Mondo et al. 2013; Finch-Savage, 2020). Además, las semillas más vigorosas son capaces de hacer frente a situaciones de estrés abiótico y biótico con mayor éxito (Foolad et al., 1999; Bettey et al., 2000; Hatzig et al., 2015). Así, la obtención de cultivos vigorosos es de vital importancia para garantizar la seguridad alimentaria en el futuro, siendo la calidad de las semillas un componente esencial de este objetivo (Finch-Savage and Bassel, 2016).

La germinación comprende la integración de un gran número de mecanismos de control (Rajjou et al., 2012). La complejidad de estos mecanismos ya se ha estudiado extensamente en la planta modelo *Arabidopsis* pero se sabe muy poco sobre el control del proceso de germinación en cultivos del género *Brassica*. El estudio en profundidad de estos procesos en estos cultivos nos permitiría identificar aquellos procesos claves del metabolismo, la señalización hormonal y los cambios transcripcionales que controlan la germinación para usarlos como herramientas para mejorar el vigor de estos cultivos (Hatzig et al., 2015). Además, en el contexto del cambio climático es de gran interés mejorar nuestro conocimiento de cómo afectarán los cambios de temperatura al proceso germinativo y por tanto al vigor de las semillas y la productividad de los cultivos.

# OBJETIVOS



La germinación es un proceso del desarrollo clave para las plantas que está regulado por la interacción entre el genotipo y las condiciones ambientales. Este proceso es el primer paso crítico para el establecimiento de los cultivos y por tanto con un notable impacto sobre su rendimiento. En el contexto de la agricultura se busca que las semillas sean capaces de germinar de forma eficiente bajo distintas condiciones ambientales. La variación en la temperatura provoca respuestas que afectan fuertemente a la dormición e influyen en el proceso de germinación. No obstante, los mecanismos reguladores subyacentes a estas respuestas siguen siendo en gran parte desconocidos en los cultivos. Se ha estudiado con bastante profundidad el papel del ABA y GAs, pero se sabe menos del papel de otras hormonas vegetales como los BRs. En trabajos previos realizados en el laboratorio, se describió por primera vez una red génica esencial en la regulación del proceso germinativo mediada por GAs en el endospermo de *Arabidopsis thaliana*. Evidencias preliminares señalaban que dicha red podría integrar también la señalización por BRs a través de un factor transcripcional de tipo bHLH conocido como BEE2, capaz de activar la expresión de la *EXPA2*, un gen clave durante la germinación. Por ello, decidimos estudiar en mayor detalle el papel de la señalización por BRs mediada por BEE2 en la germinación. Por otro lado, *Brassica napus* es una especie de cultivo emparentada con la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, lo que la confiere una gran ventaja para su estudio como planta modelo de cultivo. Además, en el laboratorio disponíamos de 18 variedades de este cultivo, varias de las cuales presentaban respuestas diferenciales en su respuesta a la temperatura en la parte vegetativa. Por ello, decidimos aprovechar esta fuente de variabilidad genética para poder analizar las bases genéticas y moleculares del control de la germinación, así como los cambios que se producen en este proceso en respuesta a la temperatura en este cultivo. En resumen, los objetivos específicos planteados durante esta tesis son:

1. Caracterizar, a nivel genético y molecular, el papel de BEE2 en la respuesta a BRs en el endospermo durante la germinación de *Arabidopsis thaliana*.
2. Establecer un modelo del control de la germinación en *B. napus* a diferentes niveles: hormonal, metabólico, molecular y transcriptómico.
3. Dilucidar el impacto del incremento de la temperatura ambiente en la cinética de germinación de semillas de *B. napus*, así como en los mecanismos moleculares que regulan dicho proceso.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. MATERIAL VEGETAL

### 1.1. *Arabidopsis thaliana*

En esta tesis se utilizó la especie *Arabidopsis thaliana* como uno de los modelos experimentales, y en concreto, se utilizaron plantas y líneas del ecotipo Columbia (Col-0). Además, todas las líneas mutantes de pérdida de función utilizadas en este trabajo están en este mismo fondo genético. La línea mutante *gal-3* cedida por el Dr. David Alabadí (IBMCP, CSIC) que fue generada originalmente en el ecotipo Landsberg *erecta* (*Ler*), fue introgresada en el ecotipo Col-0. La línea triple mutante *bee1bee2bee3* fue cedida por el doctor Jaime Martínez García (CRAG, CSIC). El resto de las líneas mutantes usadas fueron: *nac25-2* (SM\_3\_37315), *nac11-1* (SALK\_063384), *bee2-1* (SALK\_059288) y *bee2-2* (SALK\_006394) procedentes del NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Center).

Previamente a su siembra, las semillas fueron esterilizadas en tubos eppendorf con etanol 70% (v/v) durante 15 minutos, se lavaron posteriormente con etanol absoluto y se dejaron secar. Todas las semillas destinadas a la generación de los diferentes lotes de semillas fueron germinadas *in vitro* en placas de MS1/2 [MS, Murashige & Skoog de Duchefa, al 0,5 % (p/v); 1% de sacarosa (p/v); MES 2 mM a pH=5,7 ajustado con KOH 1 M; Plant Agar al 7 %] y posteriormente se estratificaron 4 °C y oscuridad durante 3 días. Pasado el tiempo de estratificación, las placas se crecieron en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 22°C, fotoperíodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y una densidad de flujo fotónico aproximada de  $130 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$ . Tras 10 días de crecimiento, las plantas se trasplantaron a alveolos con una mezcla de turba y vermiculita en proporción 3:2 (v/v) y se crecieron en una cámara de cultivo controlado con una humedad relativa del 66 % y condiciones de temperatura, intensidad lumínica y fotoperíodo similares a las utilizadas en la cámara de cultivo *in vitro*. Las plantas que se utilizaron para los distintos ensayos de germinación se crecieron hasta su maduración en condiciones idénticas para asegurar una recolección de semillas uniforme.

### 1.2. *Brassica napus*

La especie *Brassica napus* (colza) fue usada como modelo de cultivo para los distintos análisis. En total, se utilizaron 19 variedades de *Brassica napus* cedidas por el Dr. Rod Snowdon (Universidad de Justus Liebig, Giessen, Alemania). Estas variedades tienen distintos periodo de siembra en el campo, 6 son variedades de invierno: C129 (Jupiter), C032 (Lipton), C033 (Lisek), C166 (Aphid Resistant Rape (ARR)), C124 (Groß Lüsewitzer) y C110 (Zenith); y otras 13 son variedades de primavera: RV31, C238 (Drakkar), C275 (Duplo), C262 (Dux), C286 (Fido), C250 (Industry), C251 (Karat), C277 (Line), C278 (Marnoo), C279 (Nugget), C240 (Westar), C285 (Wesway) y C270 (Weihenstephaner).

La esterilización de las semillas de colza se realizó en tubos falcon de 50 mL con etanol 70 % (v/v) y Tween-20 0,1 % durante 20 minutos. A continuación, se realizaron 3

lavados con etanol absoluto, posteriormente se lavaron con agua miliQ y se dejaron secar. Las semillas se sembraron en placas altas de 90 mm Ø de MS/4 [MS, Murashige and Skoog de Duchefa, al 0,25% (p/v); MES 0,5 g/L a pH=5,7 ajustado con KOH 1M; Plant Agar al 6 g/L] y se estratificaron durante 4 días a 4 °C y en oscuridad. Tras este período, las placas se sacaron a una cámara de cultivo a una temperatura constante de 22 °C, fotoperiodo de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y densidad de flujo fotónico aproximada de 130  $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ .

Para un crecimiento óptimo de las variedades de invierno, tras 7 días de crecimiento en placa, las plántulas se transfirieron a macetas de 10,5 cm Ø (3:1, turba:vermiculita) y se fertilizaron con NPK 25-9-10 [25 % nitrógeno (p/p), 9 % fósforo (p/p) y 10 % potasio (p/p)] cada 15 días. Las plantas se crecieron en el invernadero con los mismos regímenes de luz y temperatura descritos anteriormente durante un mes, y pasado este tiempo se trasladaron a un módulo de vernalización a 4–6 °C durante 2 meses para inducir la floración. Finalmente, las plantas se trasplantaron a macetas de mayor tamaño (25 cm Ø) fertilizadas con NPKS 15-15-15-25 [15 % nitrógeno (p/p), 15 % fósforo (p/p), 15 % potasio (p/p) y 25 % azufre (p/p)] para su crecimiento en el invernadero. Por su parte, las variedades de primavera se trasplantaron a los 7 días de crecimiento en placa, directamente a macetas fertilizadas con NPKS 15-15-15-25 y se crecieron en el invernadero sin ser sometidas a un periodo de vernalización. En ambos casos, las plantas se crecieron hasta la maduración de las semillas que fueron recolectadas una vez las plantas estuvieron secas.

## 2. MATERIAL MICROBIOLÓGICO

### 2.1. *Escherichia coli*: Transformación, siembra y cultivo

En el desarrollo de esta tesis se ha usado *Escherichia coli* como medio para la producción, selección y almacenamiento de plásmidos. Las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo son DH5 $\alpha$  [hsdR17(rk-, mk+) supE44 thi-1 recA1 gyrA (NaIr) relA1  $\Delta$  (lacZYAargF) i169 (m80lacZ  $\Delta$ M15)] y DB3.1 [F- gyrA462 endA1 glnV44  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5  $\Delta$ leu mtl1]. La cepa DH5 $\alpha$  fue usada para la selección de todas las construcciones generadas, mientras que las cepas DB3.1 se usaron para la selección de plásmidos vacíos de pDE-CAS9-FAST GG.

Las cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli* se transformaron mediante un protocolo de choque térmico (adaptación de Inoue et al., 1990). Brevemente, se añadieron los plásmidos de interés (100-500 ng) a una alícuota de células termocompetentes, tras su incubación a 4 °C durante media hora, se sometieron a un choque térmico de 42 °C durante 30 segundos. Tras el choque térmico, se añadieron 800  $\mu\text{L}$  de LB [triptona 1 % (p/v); extracto de levadura 0,5 % (p/v); NaCl 1 % (p/v)] a las bacterias, se incubaron 5 minutos a 4 °C y se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación. Posteriormente, el cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 5000 rpm, y finalmente se plaqueó sobre una placa con medio LB con el antibiótico correspondiente a 37 °C durante 24 horas. Por su parte, las cepas DB3.1 electrocompetentes se transformaron mediante electroporación. En este caso, las células

se transformaron con un protocolo adaptado de Dower et al., 1988. Una vez añadido el plásmido de interés a la alícuota bacteriana, esta se introdujo en una cubeta de electroporación y se sometió a un pulso eléctrico (25  $\mu$ F de capacitancia, voltaje de 2,5 kV y una resistencia de 200  $\Omega$ ), durante 5 ms. Tras el pulso, se añadieron 800  $\mu$ L de LB y se pasó el cultivo a un tubo Eppendorf para su incubación a 37 °C y agitación durante 1 hora. Tras la incubación, los cultivos se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm y se plaquearon en medio LB con el antibiótico necesario para el crecimiento y selección de *E. coli* y se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

## 2.2. *Agrobacterium tumefaciens*. Transformación, siembra y cultivo

*Agrobacterium tumefaciens* fue usada como bacteria para la transformación de plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Brassica napus*. Se usaron las cepas C58C1 [PMP90] y AGL1 que se transformaron mediante electroporación. El protocolo de transformación es similar al realizado con las células electrocompetentes de *E. coli*, con varias modificaciones: la incubación posterior al pulso eléctrico se llevó a cabo a 28 °C durante 1-2 h; los cultivos se plaquearon en medio LB con los antibióticos rifampicina (50  $\mu$ g/mL), gentamicina (40  $\mu$ g/mL) necesarios para el crecimiento y selección de *A. tumefaciens* junto con el antibiótico de selección de las bacterias transformadas y los cultivos se incubaron durante 48 horas a 28 °C.

## 2.3. *Saccharomyces cerevisiae*. Transformación, siembra y cultivo

Para el desarrollo de esta tesis, se usó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo eucariota para testar interacciones proteína-proteína (Y2H) o proteína-DNA (Y1H) tal y como se ha descrito en Castrillo et al., 2011; Sánchez-Montesino and Oñate-Sánchez, 2017, 2018).

En estos ensayos de levaduras se utilizaron cepas sexualmente compatibles, así, se usó YM4271 como cepa de tipo “a” y las cepas de tipo “ $\alpha$ ” Y187 para los ensayos de Y1H y pJ694 para los de Y2H. Las levaduras se crecieron en medio YPAD (2 % (p/v) peptona, 1 % (p/v) extracto de levadura, 2 % (p/v) glucosa). Una vez obtenidas las levaduras transformadas, estas se crecieron en medio selectivo DOB (*Dropout base for synthetic defined dropout medium*; MP Biomedicals) a una concentración de 27 g/L, suplementado con una mezcla comercial de los aminoácidos correspondientes (MP Biomedicals). Todos los medios usados para crecer levaduras se autoclavaron a 120 °C durante 10 min.

La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* se realizó usando la solución PATE [Polietilenglicol (PEG) 40 % (v/v); Acetato de litio 100 mM; TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8 equilibrado con HCl y AcNA)]. Tras crecer las levaduras de partida en 3 mL de medio YPAD durante una noche, se centrifugaron a 5000 rpm durante 2 min y se desecharon 2,5 mL del sobrenadante. Posteriormente, las levaduras precipitadas se resuspendieron en el volumen restante de YPAD al que se le añadió 500  $\mu$ L de solución PATE, 10  $\mu$ L de DNA monocatenario de esperma de arenque (Promega) y 1  $\mu$ g del

## MATERIALES Y MÉTODOS

plásmido de interés. La mezcla se resuspendió suavemente y se incubó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante una noche. Finalmente, se realizaron 3 lavados consecutivos con agua y se plaquearon en medio selectivo DOB, donde se incubaron durante 2-3 días a 28 °C.

El siguiente paso en los ensayos de Y1H y Y2H, es la obtención de las células diploides a partir de las células haploides transformantes que hemos generado previamente (*mating*, Fields and Song, 1989). Para ello, se prepararon cultivos de cada una de las cepas haploides en 1 mL de YPAD y se enriquecieron mediante agitación a 28 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, se generaron los diploides inoculando 200 µL de cada cultivo cebo con cada cultivo presa para generar todas las interacciones deseadas. Este *mating* se dejó incubar a 28 °C en oscuridad y sin agitación durante 1-2 días. Finalmente, para seleccionar las células diploides, se inocularon 100 µL de cada combinación en 900 µL medio selectivo DOB-L-W durante 3 días a 28 °C y agitación. Tras este paso de enriquecimiento de diploides, se plaqueó en el mismo medio selectivo un pequeño volumen del cultivo, dejándose crecer a 28 °C durante 2-3 días.

### 3. MATERIAL PLASMÍDICO

En la Tabla 1. Se recogen todos los vectores empleados en la realización de esta tesis, así como las resistencias o auxotroffías que confieren a bacterias, plantas y levaduras, y los experimentos en los que fueron utilizados.

**Tabla 1. Listado de plásmidos usados, resistencias que confieren y uso.**

Vector	Resistencia bacteria	Resistencia planta /Auxotrofia levadura	Finalidad	Referencia
pDONR207	Gentamicina	-	Clonaje	Invitrogen
pDEST22	Carbenicilina	Triptófano		Invitrogen
pGADT7	Ampicilina	Leucina	Expresión en levadura	Clontech
pGBKT7	Kanamicina	Triptófano		
pTUY1H	Ampicilina	Leucina		Castrillo et al., 2011
pGreenII-0800-LUC-GW	Kanamicina	Kanamicina	Detección de bioluminiscencia en planta	Hellens et al., 2005
pYRO	Espectinomicina	Kanamicina		Chen and Singh, 1999
pCXGW	Espectinomicina	BASTA	Sobreexpresión en planta	W. Frommer, Carnegie Institution for Science
pNXGW				
pMDC43	Kanamicina	Higromicina		Curtis and Grossniklaus, 2003
pGG:AtU6 AB	Ampicilina	-	Clonaje para CRISPR/Cas9	Decaestecker et al., 2019
pGG:AtU6 BC				
pDE Cas9 FAST GG	Espectinomicina	Kanamicina	CRISPR/Cas9	

## 4. CLONAJES

Las construcciones realizadas a lo largo de esta tesis se generaron mediante las tecnologías Gateway (Invitrogen), GoldenGate (Engler and Marillonnet, 2014), o mediante el uso de enzimas de restricción y reacciones de ligación. En la Tabla Suplementaria 1 se recogen todas las construcciones generadas y utilizadas. Todas las construcciones fueron comprobadas mediante PCR, y posterior secuenciación de las mismas.

### 4.1. Generación de construcciones mediante tecnología Gateway

Gateway es una tecnología basada en la inclusión de insertos en vectores mediante reacciones de recombinación ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Los plásmidos de este sistema llevan incorporados un cassette en el que se incluye el gen suicida de *E. coli ccdB* y un gen de resistencia para el cloranfenicol (*CmR*), y están flanqueados por sitios de recombinación derivados del bacteriófago lambda. En primer lugar, las secuencias de interés se amplificaron con ayuda de la polimerasa de alta fidelidad Platinum™ Pxf DNA Polymerase (Invitrogen), incluyendo en cada extremo las secuencias attB1 y attB2. Una vez obtenidos estos amplicones, se introdujeron en los plásmidos de entrada (pDONR207 y pDONR221) cuyos cassettes se encuentran flanqueados por secuencias attP1 y attP2. La recombinasa BP es capaz de reconocer las secuencias attP1, attP2, attB1 y attB2 y realizar una recombinación attB1-attP1 y attB2-attP2 de tal manera que el cassette Gateway es sustituido por los amplicones de interés flanqueados por secuencias attL1 y attL2. El siguiente paso en la clonación por este sistema fue la introducción de nuestro inserto en el plásmido de destino mediante una reacción de recombinación tipo LR. Esta reacción se lleva a cabo con la clonasa LR, capaz de reconocer las regiones flanqueantes attL1 y attL2 del plásmido de entrada y recombinarlas con las regiones attR1 y attR2 de los plásmidos de destino.

### 4.2. Generación de construcciones mediante enzimas de restricción y reacciones de ligación

El uso de reacciones de digestión-ligación fue necesario para la clonación de secuencias de interés en los plásmidos pYRO y pTUY1H, que no llevan incorporados el sistema Gateway. Para los clonajes en el vector pTUY1H, la región del promotor de interés se amplificó con la polimerasa de alta fidelidad Platinum™ Pxf DNA Polymerase (Invitrogen) usando como molde DNA genómico (gDNA) de Col-0 y oligonucleótidos a los que añadimos las secuencias de las enzimas de restricción XmaI y XbaI. Tanto el fragmento amplificado como el plásmido pTUY1H fueron digeridos con estas enzimas según las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se precipitó la digestión con acetato de sodio y el fragmento digerido y purificado se ligó en pTUY1H usando la ligasa T4 DNA ligase (Invitrogen, según las indicaciones del fabricante). La ligación se incubó a 16 °C durante 16 horas y se usó directamente para transformar *E. coli*.

Para los clonajes en el vector pYRO, se amplificó la secuencia de interés introduciéndole los sitios de digestión para las enzimas BglII y HindIII. El plásmido se digirió con las enzimas BamHI y HindIII, mientras que el amplicón se digirió con las enzimas BglII y HindIII. La ligación de plásmido y amplicón se realizó con la ligasa T4, que une los extremos generados por BglII y BamHI, compatibles entre sí, y los extremos generados por HindIII. Posteriormente la reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 16 horas y se usó directamente para transformar *E. coli*.

### 4.3. Generación de construcciones CRISPR/Cas9 mediante sistema pDE-CAS9-FASTGG

La clonación de las guías de CRISPR/Cas9 se realizó en el sistema de pDE-CAS9 FASTGG (Deacaestecker et al., 2019) basado en la tecnología Golden Gate, cedido por el Dr. José Antonio Abelenda (CBGP, UPM). Para aumentar la probabilidad de generar un plásmido capaz de detectar y alterar la secuencia de *BnaRGL2*, se decidió introducir dos guías de la secuencia del gen. Para ello se diseñaron dos oligonucleótidos para cada una de ellas de manera que pudieran ser compatibles con el sistema de clonaje (Tabla 3). El anillamiento de cada par de oligonucleótidos se realizó hirviendo una mezcla de 2 µM de cada uno de los oligonucleótidos a 95-100 °C durante 5 minutos y posterior enfriamiento lento a temperatura ambiente. El clonaje de cada una de las guías se realizó mediante dos reacciones de digestión-ligación: primero con BbsI para su introducción en los plásmidos de entrada pGGAtU6AB y pGGAtU6BC para ser clonadas de manera secuencial en el plásmido final, y el paso final entre ambos plásmidos de entrada y el plásmido final pDE CAS9 FAST GG se realizó con la enzima BsaI (Figura suplementaria 1).

## 5. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos diseñados en esta tesis relacionados con *Arabidopsis* fueron diseñados a mano y su calidad se comprobó con el programa OligoAnalyzer™ (Integrated DNA Technologies). Por su parte, el diseño de los oligonucleótidos para la especie aloploiploide *Brassica napus* se realizó en varios pasos. Primero, se realizó una búsqueda de ortólogos del gen de interés mediante similitud con las secuencias de las bases de datos disponibles y posteriormente se llevó a cabo un cribado de aquellos genes seleccionando aquellos con un patrón de expresión similar a los genes de *Arabidopsis*. Para ello, se buscaron los diferentes ortólogos para cada gen mediante el alineamiento de las secuencias de los genes de *Arabidopsis* con la base de datos de Genescope (<https://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>). Para los genes con mayor porcentaje de similitud, que serán los posibles ortólogos, se analizaron sus patrones de expresión usando los datos de expresión génicas de los RNA-Seq de las variedades de invierno obtenidos previamente y se compararon con las cinéticas de expresión de los genes de *Arabidopsis* durante el proceso de germinación (<http://vseed.nottingham.ac.uk/>). Se diseñaron oligos específicos de aquellas copias que presentaron un patrón de expresión similar al de *Arabidopsis*. Todos los oligonucleótidos fueron suministrados por Sigma Aldrich y se reúnen en la Tabla Suplementaria 2.

## 6. GENERACIÓN DE MUTANTES Y LÍNEAS TRANSGÉNICAS

### 6.1. Generación de dobles mutantes en *Arabidopsis thaliana* mediante cruzamiento genético

Para estudiar la posible relación genética entre nuestras proteínas de interés, o su comportamiento en fondos genéticos con ausencia de giberelinas, se generaron líneas de dobles mutantes mediante cruces entre los mutantes simples. Entre los mutantes generados se obtuvieron: *bee2-1gal1-3*, *bee2-1nac25-2*, *bee2-1nac11-1* y *bee2-2gal1-3*. En aquellas combinaciones de mutantes con diferentes marcadores de resistencia a antibióticos o incapaces de germinar sin aplicación de giberelinas exógenas, los cruces se sembraron en MS/2 suplementado con la combinación de antibióticos y/o hormonas necesarias para su selección. En posteriores generaciones, la selección de los dobles mutantes se realizó mediante el genotipado de las plántulas seleccionadas tal y como se indica en el apartado 8 de Materiales y Métodos.

### 6.2. Mutagénesis dirigida

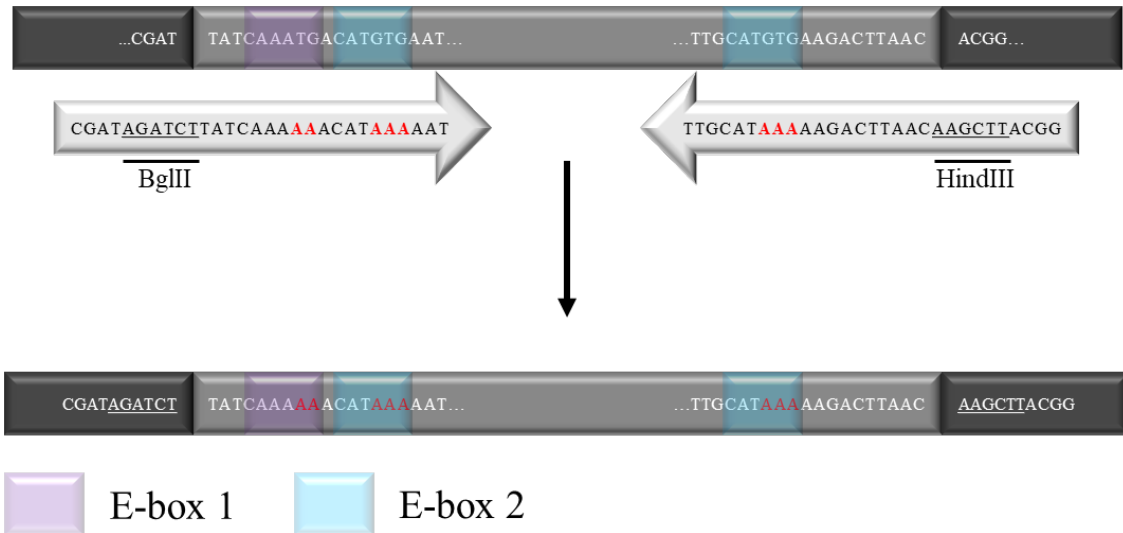
Para generar la versión mutada de la *EXPA2*, 4xbHLH-mut::*LUC*, se utilizó la técnica de mutagénesis dirigida. Con esta estrategia introdujimos cambios de 2 ó 3 nucleótidos en los motivos de unión para el bHLH identificados en el fragmento de 134 bp del promotor de la *EXPA2*. Como los motivos de unión a bHLH se encuentran en los extremos de este fragmento, la mutagénesis (Figura 8) fue realizada diseñando una sola pareja de oligonucleótidos que anillan a cada extremo de la región de estudio y que incluyen los cambios de bases deseados. Además, se insertaron zonas de restricción para las enzimas BglII y HindIII en los extremos 5' y 3' respectivamente, para su posterior clonaje en el plásmido pYRO. El fragmento con las mutaciones se amplificó en una sola reacción de PCR usando el plásmido 4xbHLH::*LUC* (LO1848) como molde. Se comprobó primeramente que el amplicón tenía el tamaño de banda correcto mediante electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 3 %). Posteriormente se purificó el fragmento directamente desde la PCR con AcNa, tal y como se indica en el apartado 7.3.4. de Materiales y Métodos. Por último, el fragmento purificado se digirió con las enzimas BglII y HindIII y se insertó en el plásmido pYRO mediante una reacción de ligación como se explica en el apartado 4.2. de esta sección.

### 6.3. Transformación de *Brassica napus*

Para la transformación de los meristemos florales de *Brassica napus*, las bacterias *A. thumefaciens* de la cepa AGL1 se transformaron con la construcción que contiene las dos guías del sistema CRISPR/Cas9 y se crecieron durante toda la noche en 500 mL de LB. Cuando las bacterias alcanzaron la densidad óptima para la transformación (OD<sub>600</sub> de 0,4-0,6) se centrifugaron a 7000 rpm y se resuspendieron en un volumen similar de solución de infiltración para Brassicas [MS/2, 0,5 g/L de MES; 50 g/L de sacarosa; 0,1 mg/L BAP

## MATERIALES Y MÉTODOS

y 0,03 v/v de Silwet L-77; pH=5,8 ajustado con NaOH]. Para mejorar la permeabilidad de las hojas y favorecer la infiltración, las plantas se sumergieron brevemente en una dilución de Triton X-100 o TWEEN al 0,1 % (v/v). Así mismo, se aplicó vacío durante un período de 1-5 minutos para facilitar la entrada de las bacterias en el meristemo floral.



**Figura 8. Proceso de mutagénesis dirigida usando la construcción 4xbHLH::LUC para generar la construcción mutada 4xbHLH-mut::LUC.** La mutagénesis de los 3 E-box reconocibles por TFs de tipo bHLH se llevó a cabo en un solo paso mediante una reacción de PCR. Los oligonucleótidos utilizados se presentan como flechas blancas, las mutaciones insertadas se muestran en rojo.

## 7. ESTUDIO DE ÁCIDOS NUCLEICOS (DNA)

### 7.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica que se utilizó para la detección de los genes de interés o para la amplificación de genes o fragmentos de DNA que fueron clonados posteriormente. Para la primera tarea se usó la polimerasa NZY Taq 2X Green Master Mix (NZYTech) (1,4 U de enzima), con oligonucleótidos a concentración final de 0,3  $\mu$ M y usando 0,5  $\mu$ L de molde de gDNA. Estas PCRs se realizaron en un termociclador Touch™ de BioRad, con el siguiente programa:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Nº de ciclos
Desnaturalización	95	120	1
Desnaturalización	95	45	
Anillamiento	T <sub>m</sub> +/- 5 de los oligonucleótidos	30	35
Extensión	72	60 s/kb	
Extensión	72	430	1
Conservación	4	∞	1

Por otro lado, para amplificar genes o fragmentos de interés, se usó la enzima de alta fidelidad Platinum™ Pxf DNA Polymerase (Invitrogen, 3 U de enzima). Estas PCRs se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 7.2. Electroforesis de DNA

Las electroforesis de DNA se realizaron para separar fragmentos de DNA dependiendo de su tamaño y su posterior visualización y/o aislamiento. Todo el material que se sometió a electroforesis procedió de reacciones de PCR o de digestiones de plásmidos. Para ello, se usaron geles horizontales de concentraciones variables de agarosa (desde el 0,7 al 2,5 %, p/v) dependiendo del tamaño de banda de DNA esperado, diluidos en tampón TAE [Tris 0,5% (p/v), ácido acético 0,1 % (v/v), EDTA 1μM pH=8]. Para poder observar los fragmentos de DNA bajo el UV, se usó bromuro de etidio (0,4 μg/mL) o GreenSafe (NZYTech, siguiendo las instrucciones del fabricante). A las reacciones de PCRs se les añadió glicerol al 5 % (v/v) para su carga en los geles, que se sometieron a un voltaje de 70-120 V. Posteriormente, las bandas de DNA se visualizaron tras exposición del gel a luz ultravioleta en un transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System deBioRad, asociado al software Quantity One 4.6.5 de BioRad.

## 7.3. Extracción y purificación de DNA

Dependiendo de la naturaleza del DNA, se usaron diferentes métodos para su extracción y purificación, los cuales se detallan a continuación.

### 7.3.1. Extracción de DNA genómico

La extracción de gDNA se realizó sobre muestras de plantas silvestres de *Arabidopsis Col-0* y los diferentes mutantes y dobles mutantes de pérdida de función analizados en esta tesis para su genotipado, así como sobre muestras de *B. napus* variedad RV31 y las plantas modificadas con el sistema CRISPR/Cas9. Para *Arabidopsis*, se utilizó como tejido de partida hojas de roseta previo a la aparición del botón floral y para *B. napus* se

## MATERIALES Y MÉTODOS

usaron discos tomados de hojas jóvenes. A cada muestra se añadieron bolitas de vidrio (1 mm Ø) y se congelaron para su posterior trituración en un molino de muestras MM300 (Retsch). Se usó para la extracción de DNA un protocolo adaptado de Edwards et al., 1991. Brevemente, primero se añadieron 400 µl de buffer de extracción de Edwards [Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%] a cada muestra y se homogeneizó durante 5 s mediante agitación con vórtex. Tras una centrifugación de 1 min a máxima velocidad, se recogieron 300 µL del sobrenadante y se mezclaron con un volumen equivalente de isopropanol a 4 °C. Tras una incubación de 2-5 min, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 5 min, y tras eliminar el sobrenadante, el DNA fue diluido en 100 µL de agua de grado PCR (Applichem). Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

### 7.3.2. Aislamiento de DNA plasmídico

El DNA plasmídico, fruto de los clonajes de nuestros genes o de diferentes fragmentos de interés, se aisló usando el kit comercial Plasmid DNA isolation Miniprep (Macherey-Nagel) según las instrucciones del fabricante. Se partió de 3 mL de cultivo crecido durante 24 h y tras purificar el DNA plasmídico, este se resuspendió finalmente en 30 µL de tampón TE. En el caso de extraer plásmidos de la levadura *S. cerevisiae*, se utilizó el mismo kit excepto que la lisis celular se realizó durante 10 min.

### 7.3.3. Extracción de DNA de geles de agarosa

El DNA extraído de geles de agarosa fue purificado usando el kit GeneCleanTurbo™ Kit (MP Biomedicals), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 7.3.4. Purificación de DNA obtenido por PCR

El DNA resultante de las PCRs y digestiones se purificó mediante un método de precipitación con acetato de sodio (AcNa). Para ello, se añadieron 2,5 volúmenes de agua de grado PCR (Applichem) al DNA, y 1/10 de volumen de AcNa pH 5,2 3M. Para precipitar el DNA, se añadieron 3 volúmenes de etanol puro y se centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v) y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua de grado PCR.

## 7.4. Secuenciación de DNA

Las construcciones generadas en el laboratorio fueron validadas mediante secuenciación, la cual se realizó de manera externa por la empresa Macrogen mediante secuenciación de tipo Sanger (Sanger et al., 1977).

## 8. GENOTIPADO

El genotipado de todas las plantas mutantes de pérdida de función por inserción de T-DNA se realizó mediante PCR. Se identificó tanto la presencia de la inserción de T-DNA (reacción BP+LP) como la ausencia del gen silvestre (reacción RP+LP) en cada plántula. RP y LP son las regiones del gen de interés que se encuentran en el lado 5' y 3' del inserto, mientras que BP es una región del inserto del T-DNA. Como controles positivos y negativos, se usaron plantas Col-0 y los diferentes mutantes simples. Los genotipados se realizan a partir de gDNA extraído de plántulas tal y como se indica en el apartado 7.3.1 de esta sección. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos utilizados para cada reacción y mutante.

**Tabla 2. Listado de los oligonucleótidos utilizados para el genotipado de las líneas de mutantes simples y dobles.**

Línea	Oligonucleótidos	
	Reacción LP+RP	Reacción BP+RP
<i>nac25-2</i>	LO1385+LO1386	LO1333+LO1386
<i>nac11-1</i>	LO1379+LO1380	LO1222+LO1380
<i>bee2-1</i>	LO1946+LO1947	LO1332 +LO1946
<i>bee2-2</i>	LO1946+LO1947	LO1222 +LO1947
<i>gal-3</i>	LO2165+LO2166	LO2167+LO2168
<i>gal-3 bee2-1</i>	LO2165+LO2166 LO1946+LO1947	LO2167+LO2168 LO1332 +LO1946
<i>gal-3 bee2-2</i>	LO2165+LO2166 LO1946+LO1947	LO2167+LO2168 LO1222 +LO1947
<i>gal-3 nac25-2</i>	LO2165+LO2166 LO1385+LO1386	LO2167+LO2168 LO1333+LO1386
<i>gal-3 nac11-1</i>	LO2165+LO2166 LO1379+LO1380	LO2167+LO2168 LO1222+LO1380
<i>bee2-1 nac25-2</i>	LO1946+LO1947 LO1385+LO1386	LO1332 +LO1946 LO1333+LO1386
<i>bee2-1 nac11-1</i>	LO1946+LO1947 LO1379+LO1380	LO1332 +LO1946 LO1222+LO1380

## 9. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 9.1. Extracción y purificación de RNA de semillas

Todas las extracciones de RNA llevadas a cabo durante la realización de esta tesis se realizaron mediante una adaptación del protocolo descrito en Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, (2008). Como material de partida se utilizaron 20 mg de semillas de *Arabidopsis* secas o embebidas en agarosa al 0,6 % y en el caso de *Brassica napus* se utilizaron 25-30 semillas secas o embebidas en agarosa al 0,6 % o agua a diferentes tiempos durante la germinación. Las muestras recogidas se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se trituraron en un mortero autoclavado y en condiciones de frío constante. Posteriormente las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción se inició añadiendo al material vegetal molido, 550 µL de tampón de extracción [LiCl 400 mM; Tris-HCl 200 mM a pH 8; EDTA 25 mM a pH=8; SDS al 1 % (p/v)] y 550 µL de cloroformo. Tras una breve centrifugación, se recuperaron 500 µL de la fase superior a la que se le añadió 1 volumen de fenol saturado en agua y 200 µL de cloroformo. Las muestras se colocaron en columnas Phase Lock Gel Heavy 2 mL (5PRIME) y se centrifugaron durante 5 min. Después, se recogieron 450 µL de la fase líquida y, en un tubo nuevo, se añadieron 1/3 de volumen de LiCl (8 M) y se mezclaron y se dejaron incubar durante toda la noche a 4° C. Tras esta incubación, las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 30 min a 4 °C y, una vez retirado el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 90 µL de agua de grado PCR. Las muestras se volvieron a centrifugar para asegurar la completa eliminación de compuestos orgánicos, recuperándose 87 µL de sobrenadante a los que se les añadieron 10 µL de Tampón DNasa I libre de RNasa 10x y 3 µL DNasa I libre de RNasa (30 unidades; Roche) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. En el caso de la extracción de RNA de colza, para asegurar la completa digestión de todo el DNA, se duplicaron los volúmenes, y el precipitado se resuspendió en 180 µL, recuperándose 174 µL tras la segunda centrifugación, a los que se les añadió 20 µL de Tampón DNasa I libre de RNasa 10x y 6 µL DNasa I libre de RNasa. Además, la digestión se prolongó durante 90 min. Posteriormente, se comprobó la ausencia del gDNA en las muestras mediante PCR usando los oligonucleótidos LO2 y LO3, que amplifican un fragmento del gen de la  $\beta$ -Tubulina 8, usando como control gDNA de Col-0. Después, se añadieron 400 µL de agua (300 µL para la extracción en colza), 7 µL de NaAc 3 M pH=5,2 y 250 µL de etanol absoluto a las muestras y se centrifugaron durante 10 min a 4 °C. Tras recuperar 750 µL del sobrenadante, se añadieron 43 µL de NaAc 3M pH=5,2 y 750 µL de etanol absoluto, se incubaron durante 1 h a -80 °C y se centrifugaron 20 min. Finalmente, los precipitados se lavaron con etanol 70 % (v/v) y se resuspendieron en 30 µL de agua de grado PCR. La concentración de las muestras de RNA se cuantificó por espectrofotometría usando un NanoDrop® ND-1000, y su integridad se comprobó, además, cargando 1 µL de muestra en un gel de agarosa al 1 %.

### 9.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de cDNA se usó el kit Transcription First Strand cDNA Synthesis Kit (RocheDiagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando 2,5 µM de Oligo

dT para *Arabidopsis* y una mezcla de 2,5  $\mu$ M de Oligo dT y 20  $\mu$ M de Random Hexamers (para amplificar RNA no codificantes) en el caso de *B. napus*.

### 9.3. PCR cuantitativa de tiempo real (qPCR)

El análisis de los patrones de expresión de los diferentes genes diana o de interés en *Arabidopsis* y colza se efectuaron mediante qPCR a tiempo real (RT-qPCR). Estas RT-qPCR se realizaron a partir del cDNA sintetizado en el apartado anterior utilizando el termociclador EcoTM Illumina® (ThermoFisher Scientific). Estas reacciones se realizaron a un volumen final de 10  $\mu$ L añadiendo 2  $\mu$ L de 1/10 de cDNA molde, 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2  $\mu$ L de PyroTaq EvaGreen qPCR Master Mix Plus (ROX) 5X que contiene la polimerasa (Cultek Molecular Bionline). Las condiciones de las PCRs fueron las siguientes:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Nº de ciclos
Desnaturalización	95	900	1
Desnaturalización	95	15	
Anillamiento	Tm +/- 5 de los oligonucleótidos	20	40
Extensión	72	20	
	95	15	
Disociación	60	30	1
	95	1	

Como normalizador se usó el gen de la ENZIMA CONJUGADORA DE LA UBIQUITINA 21 (*UBC21*) o el gen de la ACTINA 8 (*ACT8*) para *Arabidopsis* ya que muestran una expresión constitutiva durante el proceso de germinación. En el caso de colza, se realizaron una serie de pruebas iniciales para identificar un gen normalizador. Así, dos de los genes candidatos iniciales *BnaEIF3E* y *BnaSUI*, de uso general en qPCRs en *Arabidopsis*, se observó que su expresión variaba entre las diferentes variedades y a lo largo de la germinación. Por lo tanto, se decidió usar el RNA ribosomal (*rRNA*) 18S cuya expresión, aunque muy alta (se utilizaron concentraciones muy diluidas de cDNA, 1/1000) era estable en nuestras condiciones.

### 9.4. Secuenciación masiva de RNA (RNASeq)

Los datos de transcriptómica cedidos por el Dr. Snowdon provenían de muestras de semillas embebidas en papel humedecido con agua destilada sobre un recipiente de germinación Jacobsen. Posteriormente, dichas semillas se recogieron a los diferentes

tiempos (0, 2, 12,36 y 72 h) y se congelaron en nitrógeno líquido. El RNA se aisló utilizando el Kit Nucleospin miRNA (Mecherey-Nagel), su calidad se midió mediante electroforesis capilar QIAxcel (Qiagen) y se cuantificó usando un Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies). Se utilizaron 3 réplicas biológicas de 30 semillas cada una. Las muestras se secuenciaron en la plataforma HiSeq2000 de LGC Genomics (Berlín, Alemania). La librería para la secuenciación fue realizada con el kit TruSeqnRNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) y las lecturas obtenidas fueron de 100 bp desde cada extremo. El procesamiento de los datos obtenidos se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos.

Para estudiar los cambios de expresión génica globales en los primeros tiempos de germinación y en respuesta a temperatura en las variedades C238 y C277, se llevó a cabo un análisis de RNAseq. Para llevar a cabo dicho análisis, las muestras de semilla seca se congelaron directamente en nitrógeno líquido, mientras que las muestras de 4 y 12 h se embebieron en agua en tubos falcon de 50 mL y se congelaron tras su secado. Se aisló el RNA total de 3 réplicas biológicas provenientes de un grupo de 30 semillas de 6 plantas individuales tal y como se describe en el apartado 9.1. Tras comprobar la integridad del RNA extraído usando un Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), las muestras se secuenciaron de forma externa (Macrogen). La librería para la secuenciación fue realizada con el kit Truseq stranded mRNA Library, y las lecturas obtenidas fueron de 125 bp desde cada extremo. El procesamiento de los datos se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos.

## **10. ENSAYOS DE RUPTURA DE TESTA Y GERMINACIÓN**

Los ensayos de ruptura de testa y de germinación consistieron en el conteo, a diferentes tiempos desde la imbibición de las semillas, del número de semillas que presentaron ruptura en la zona micropilar de la testa y de aquellas semillas ya germinadas. Consideramos como semillas germinadas aquellas semillas cuyas radículas hubieran protruido del endospermo y de la testa. Para cada ensayo, se utilizaron semillas de un mismo lote tal y como se describe en el apartado 1 de Materiales y Métodos. Todas las semillas usadas, tanto de *Arabidopsis* como de colza, se conservaron en condiciones de baja humedad (y frío en el caso de colza) al menos durante un mes posterior a su colecta.

### **10.1. Ensayos de germinación en *Arabidopsis thaliana***

Los diferentes ensayos de germinación de *Arabidopsis* se realizaron en placas de agarosa al 0,6 %. En la tabla 3 se recogen las diferentes condiciones que se utilizaron en los distintos experimentos realizados con estas semillas. En cada ensayo se usaron aproximadamente 50 semillas de entre 3-8 plantas independientes para cada genotipo. El conteo de semillas germinadas se realizó usando una lupa Olympus SZ51.

**Tabla 3. Condiciones de germinación para cada uno de los diferentes tipos de ensayos realizados con semillas de Arabidopsis.**

Ensayos	Estratificación	Tratamiento	Condiciones de crecimiento	Rango de conteo
Fenotipado mutantes <i>bee2</i>	Sí	5 $\mu$ M eBL	130 $\frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	24 h
Fenotipado de mutantes	No	-	130 $\frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	4-12 h

## 10.2. Ensayos de germinación en *Brassica napus*

Para los ensayos de germinación con las variedades de invierno de colza, se usaron 15 semillas de 4 plantas independientes de cada variedad en placas de agarosa al 0,6 %. Mientras que para las variedades de primavera se usaron, para cada variedad, 25-30 semillas de 3 grupos de 6 plantas independientes cada uno. Los primeros ensayos de germinación se realizaron directamente en placas de 0,6 % de agarosa mientras que para los ensayos de germinación con variedades de primavera y la preparación de muestras para el RNASeq, las semillas se embebieron primero en 10 mL de agua durante 12 h y posteriormente se pasaron a placas de agarosa al 0,6 %. En estos ensayos, se establecieron tres estadios diferentes durante el proceso germinativo: estadio B, en el que la radícula rompe la testa; estadio C, donde la radícula protruye a través de la testa; y el estadio D, en el que la radícula empieza el proceso de elongación (Figura 37, Resultados). En la tabla 4 se recogen las diferentes condiciones para los distintos experimentos realizados con estas semillas. En la tabla 5 se recogen los distintos caracteres de germinación cuantificados durante el fenotipado de la germinación de las variedades de primavera.

**Tabla 4. Condiciones de germinación para cada uno de los diferentes tipos de ensayos realizados con semillas de colza.**

Ensayos	Estratificación	Tratamiento	Condiciones de crecimiento	Rango de conteo
Fenotipado de variedades de invierno	No	-	$130 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	24 h
Fenotipado de variedades de primavera	No	21 o 29 °C	$100-110 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	4 – 12 h
Fenotipado y preparación para RNASeq	No	21 o 29 °C	$100-110 \frac{\mu E}{m^2 \cdot s}$	4 h

**Tabla 5. Caracteres de germinación y semilla fenotipados en los ensayos realizados con semillas de colza.**

Rasgo	Abreviatura	Descripción
Primera germinación	FG	Tiempo requerido para que germine la primera semilla desde la imbibición.
Última germinación	LG	Tiempo requerido para que germinen todas las semillas desde la imbibición
Período	-	Tiempo entre la primera y la última semilla germinada
Tiempo para germinación de X %	TX	Tiempo requerido para alcanzar un porcentaje de germinación del X % (entre el 10 y el 80 %) desde la imbibición
Uniformidad	-	T80-T20 (tiempo requerido para que germinen todas las semillas, obviando eventos extremos)
Tiempo medio de germinación	MGT	Tiempo medio requerido para que se produzca la germinación desde la imbibición
Tiempo medio B	MBT	Tiempo medio requerido para alcanzar el estadio B desde la imbibición
Tiempo medio C	MCT	Tiempo medio requerido para alcanzar el estadio C desde la imbibición

Ratio de germinación 1/2	GR 1/2	Porcentaje de germinación a tiempo medio del experimento
Ratio de germinación total	GRTot	Porcentaje de germinación a tiempo final del experimento
Velocidad de germinación	GS	Definida con la siguiente fórmula: $GS = \frac{\sum_{T_o}^{T_f} \%Germ}{T_f}$ Dónde FT es el tiempo final y T <sub>o</sub> es el tiempo inicial
Pendiente	-	Definida como r en la siguiente fórmula: $N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K-N_o}{N_o}\right)e^{-rt}}$ Calculado a partir de la cinética de germinación con la ayuda del paquete de R Growthcurver (v.0.3.1), refleja la rapidez y el ritmo de germinación
Área	A	Área de la semilla
Peso de 1000 semillas	TSW	Peso estimado de 1000 semillas a partir de la medida de 3 réplicas de 100 semillas
Longitud del hipocótilo	HPL	Longitud del hipocótilo (mm) a 168 h tras la germinación. (Se tomaron imágenes de los hipocótilos de las plántulas y se analizaron posteriormente con el software ImageJ)

## 11. ENSAYOS DE Y1H EN LEVADURA

La metodología utilizada para el desarrollo de estos ensayos es una adaptación de Castrillo *et al.* (2011). En un primer paso, se clonaron la secuencia de interés del promotor de *EXPA2* (cebo) en el plásmido pTUY1H, aguas arriba del gen *HIS3*. Por su lado, los TFs (presa) fueron aislados de una genoteca de factores de transcripción (Castrillo et al., 2011) o provenían de clonajes previamente realizados en pDEST22, con el CDS fusionado a GAL4AD. Ambos se transformaron en las cepas Y187 ( $\alpha$ ) e YM4271 (a) sexualmente compatibles para la generación de diploides (ver apartado 2.3 de Materiales y Métodos).

Para testar las posibles interacciones positivas, las células se crecieron en medio selectivo DOB-L-W-H, y los diploides se plaquearon en el mismo medio selectivo, pero con la adición de una concentración creciente de 3-AT (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 y 50), un inhibidor competitivo del producto de *HIS3*. Las placas se incubaron a 28 °C durante 10 días y la detección de los posibles positivos se realizó en los días 2, 3, 4, 7 y 10 de crecimiento. Los positivos se identificaron como un mayor crecimiento en los medios DOB-L-W-H $\pm$ 3- AT en comparación con los controles negativos. Los controles negativos usados fueron diploides provenientes del apareamiento de nuestro cebo de

interés junto con un plásmido presa vacío o expresando una proteína no interactora, la GFP.

### 12. ENSAYOS DE Y2H EN LEVADURA

La metodología utilizada para el desarrollo de estos ensayos es una adaptación de Castrillo *et al.* (2011). En esta tesis se usó el sistema de Y2H de Clontech, en el que se usan los plásmidos pGADT7(presa)/pGBKT7(cebo). Tras clonar nuestras proteínas en estos plásmidos, las presas se usaron para transformar levaduras de la cepa YM4271a (-L) y los cebos pJ694 $\alpha$  (-W). A partir de estas dos cepas, se generaron diploides para cada una de las interacciones a analizar.

La comprobación de interacciones positivas se realiza de igual manera a la descrita en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Las células se crecen en medio selectivo DOB-L-W-H y en el caso de Y2H el uso de concentraciones crecientes de 3-AT nos permitió comprobar la fuerza de interacción entre las diferentes proteínas testadas. Las placas se incubaron a 28 °C durante 10 días y la detección de los posibles positivos se realizó en los días 2, 3, 4, 7 y 10 de crecimiento.

### 13. ENSAYOS DE EXPRESIÓN TRANSITORIA

Para los ensayos de expresión transitoria se generaron todas las construcciones necesarias y se transformaron en la bacteria *A. tumefaciens* C58C1 [PMP90] como se describe en el apartado 2.2. de esta sección. Además de los cultivos bacterianos con nuestros plásmidos de interés, también se crecieron cultivos que llevaban incorporados el plásmido pBIN61-35S:P19. A partir de colonias de cada transformante, se inocularon 10 mL de LB suplementados con los antibióticos adecuados en tubos de 50 mL. Los tubos se incubaron a 28 °C en agitación durante 1 día, y una vez crecidos, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Tras decantar el sobrenadante, las células se resuspendieron en un volumen de 5 mL de medio de agroinfiltración [MA; MES 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Acetosiringona 150  $\mu$ M]. La agroinfiltración se realizó a un volumen final de 5 mL con una OD<sub>600</sub> de 0,1 (para pYRO::pEXPA:4xbHLH) o 0,3 (para el resto). Los cultivos con las respectivas combinaciones se dejaron incubar durante al menos 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, los cultivos se infiltraron en el envés de hojas de *N. benthamiana* de 3 semanas de edad con una jeringa de 1 mL. El análisis de las hojas se realizó a los 3 días tras la infiltración (Apartados 13.1 y 13.2 de esta sección).

#### 13.1. Ensayos de regulación transcripcional transitoria

En estos experimentos, el promotor de la *EXPA2* o fragmentos generados a partir del mismo se clonaron aguas arriba del gen delator de la luciferasa (LUC). En primer lugar se generaron las construcciones de las líneas delatoras (*pEXPA*, *pEXPA2:EI*, y *pEXPA:4xbHLH*) y las efectoras (*35S::BEE2*, *35S::NAC25*, *35S::RGL2* y *35S::RGA*). La

línea delatora *pEXPA2:EI* se clonó en el plásmido pGreenII-0800-LUC-GW, mientras que la construcción *4xbHLH::LUC* se clonó en el vector pYRO. Por su parte, las líneas efectoras *35S::BEE2* y *35S::NAC25* fueron clonadas en el vector pCXGW, y las líneas *35S::RGL2* y *35S::RGA* se clonaron en el vector pNXGW. Como controles para el experimento, se usaron los vectores pCXGW y pNXGW vacíos, así como su combinación, y como control de la actividad de la luciferasa se usaron hojas de plantas sin infiltrar.

La detección de la actividad luciferasa se hizo usando la cámara CCD (NightOwl II LB 983 NC-100; Berthold Technologies). El procedimiento usado para analizar los ensayos de regulación transcripcional es una adaptación del descrito en Espinosa-Ruiz et al. (2017). A los tres días de la infiltración, se extrajeron al menos 8 discos de cada una de las plantas infiltradas con la ayuda de un sacabocados, y se colocaron en los pocillos de una placa negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One) que contiene 250  $\mu$ L de agarosa al 0,6 %. Encima del envés de estas hojas se aplicaron 40  $\mu$ L de luciferina (100  $\mu$ M) y se incubaron durante 30 minutos. La medición de la luminiscencia se realizó durante 10 minutos por placa, usando parámetros de baja ganancia y binning 1x1. La señal de cada muestra fue seleccionada manualmente con superficies idénticas para facilitar la comparación entre las muestras. Se obtuvieron las medias y los errores estándar de cada una de las muestras tal y como se indica en el apartado 16 de Materiales y Métodos.

### 13.2. Ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia (BiFC)

Para nuestros experimentos de BiFC fusionamos los TFs BEE2 y NAC25 al extremo C-terminal de la CFP y los TFs NAC25, RGL2 y RGA al extremo N-terminal de la YFP. Después, estos plásmidos se introdujeron en *A. tumefaciens* y se infiltraron en plantas de *N. benthamiana* tal y como se indica en el apartado 13. Como controles negativos se usaron las combinaciones *pCX:BEE2* y *pCX:NAC25* con *pNX:Ø* y *pNX:NAC25*, *pNX:RGL2* o *pNX:RGA* con *pCX::Ø*. Tres días después de la infiltración, las hojas infiltradas se recogieron y se observó la reconstitución de la proteína GFP mediante la toma de imágenes con un microscopio de fluorescencia Leica DM200 y una cámara acoplada, usando un filtro L5 de excitación BP480/40 y supresión BP527/30.

## 14. ESTUDIO DE PROTEÍNAS

Para el estudio de las proteínas de interés durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron construcciones previamente generadas en el laboratorio que expresaban estas proteínas fusionadas a epítomos detectable mediante anticuerpos. Dichas construcciones fueron: BEE2 clonado en el vector de sobreexpresión pEarleyGate201 fusionado al epítopo HA (HA-BEE2) y NAC25 y RGL2 clonados, respectivamente, en los vectores pMDC43 y pMDC83, fusionados a GFP en los extremos amino y carboxi terminal respectivamente (GFP-NAC25 y RGL2-GFP). Además, usamos la construcción YFP-RGA, cedida por Salomé Prat (CNB, CSIC).

### 14.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de tejido vegetal pulverizado de *Nicotiana benthamiana*, obtenido de manera similar a como se indica en el apartado 13 de esta sección. Este tejido fue infiltrado con cada una de las construcciones por separado y, se coinfiltró también con las construcciones HA-BEE2 junto a las construcciones GFP-NAC25, RGL2-GFP o YFP-RGA. A las 72 horas de la infiltración, se recogió todo el material (14 g aproximadamente) y se pulverizó en nitrógeno líquido.

Partiendo de un volumen aproximado de 700  $\mu$ L de tejido, las muestras se homogeneizaron en tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM a pH 8, NaCl 150 mM, Triton 100X 1%, Glicerol 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM y 1x Roche protease inhibitor mixture), se dejaron incubar durante 15 min a 4 °C y se centrifugaron dos veces a 13.000 rpm a 4 °C durante 10 min. La concentración de la proteína total se determinó mediante el método de Bradford usando el kit Bio-Rad Bradford Protein Assay. Para cada muestra, se añadieron 5  $\mu$ L de las mismas a tubos con 1 mL de Bradford 1x (Bio-Rad), y tras un período de 5 min de incubación se midió la absorbancia a 595 nm.

### 14.2. Co-inmunoprecipitación de proteínas (Co-IP)

La co-inmunoprecipitación se ha utilizado para comprobar las interacciones entre el FT BEE2 y las proteínas NAC25, RGA y RGL2, estas interacciones (excepto la interacción BEE2-RGL2) fueron identificadas previamente en levadura (Tesis de Rocío Sánchez Montesino, 2019). A partir de las proteínas extraídas en el apartado anterior, se procedió a utilizar el siguiente protocolo de IP:

- Por un lado, se preparó el control positivo de extracción de proteína, usando 20  $\mu$ g de proteína total al que se le añadió un 25 % (v/v) de buffer Laemli 4X [Tris-HCl 1 M a pH=6,8; glicerol 32 % (v/v); SDS 6,4 % (p/v);  $\beta$ -mercaptoethanol; bromophenol blue 0,005 % (p/v)].
- Por otro lado, se preparó la IP. Al extracto de proteína total, se incorporaron 50  $\mu$ L de bolitas magnéticas  $\alpha$ -GFP (Milteny Biotec), y se dejó incubar durante 2 horas a 4 °C. Pasado este tiempo, la mezcla se cargó en las columnas del kit de Miltenyi ( $\mu$ MACSTM, Miltenyi Biotec) y se sometieron a un campo magnético. Una vez pasado todo el extracto, las columnas se sometieron a una serie de lavados (800  $\mu$ L de Buffer de lavado [Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM y Triton 100X 1 %] y 100  $\mu$ L de tampón de lavado. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron en 70  $\mu$ L de tampón de elución.

### 14.3. Western Blot

Con los extractos proteicos obtenidos en el paso anterior se llevó a cabo un Western Blot en el que las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, 12% de acrilamida). Tras este paso, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida fueron transferidas a una membrana de

PVDF (Immobilon®Ptransfer membrane, Millipore) mediante una transferencia húmeda (electroblotting), a 4 °C y un voltaje constante de 100 V durante 1 hora. Tras comprobar la presencia de proteínas mediante la tinción de las membranas con Ponceau S (0,1% Ponceau S en 5% ácido acético), las membranas se lavaron con agua destilada y se bloquearon con PBS-T [NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,272 g/L y Tween 0,1 %] + 5 % de leche en polvo durante 1 hora en agitación suave.

La detección de las proteínas de interés fusionadas a cada epítipo (HA y GFP) se realizó incubando las membranas bloqueadas con los anticuerpos  $\alpha$ -GFP-HRP 1:5000 (Miltenyi) y  $\alpha$ -HA-HRP 1:2000 (Roche). La incubación se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4 °C. Después las membranas se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con el sustrato quimioluminiscente HRP (Milipore). La actividad de la HRP se detectó mediante la exposición de la señal en películas radiográficas (AGFA).

## 15. ANÁLISIS DEL MERISTEMO RADICULAR DE *BRASSICA NAPUS* DURANTE LA GERMINACIÓN

Para el análisis del desarrollo del meristemo radicular a lo largo de la germinación, se analizaron dos réplicas biológicas de entre 10 y 20 embriones en cada uno de los 4 estadios establecidos (semilla seca, ruptura de testa, protrusión de radícula y elongación de la radícula). Los embriones se diseccionaron con ayuda de un escalpelo y unas pinzas de precisión, y se seccionaron la testa y el endospermo para poder extraer el embrión sin dañarlo.

Para visualizar la estructura de los meristemas y llevar a cabo la cuantificación de los distintos parámetros celulares en los meristemas radiculares de embriones de *Brassica napus* a diferentes estadios de la germinación, se utilizaron dos técnicas de tinción diferentes:

- Tinción mPS-PI adaptada de Truernit et al. (2008): esta tinción se basa en el vaciado del contenido celular y la tinción de las paredes celulares para facilitar la cuantificación de los parámetros celulares. El primer paso de este proceso consistió en diseccionar la semilla, separando el embrión del endospermo y de la testa. Tras separar el embrión, estos se fijaron en una mezcla de metanol 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) durante al menos 12 h a 4 °C. Los embriones se transfirieron a una solución de etanol 80 % (v/v) y se incubaron durante 1-5 min a 80 °C. Tras este paso, se vuelven a introducir en la solución de fijado durante 1 h. Posteriormente, los embriones se transfirieron a una solución de SDS al 1 % (v/v) y NaOH 0,2 N y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante una noche. Tras esta incubación, los embriones se lavaron en agua y se incubaron durante 1-5 min en lejía al 25 % (v/v), tras lo cual se volvieron a lavar y se transfirieron a una solución de ácido periódico 1 % (m/v) a temperatura ambiente durante 40 min. Los embriones se volvieron a lavar en agua y se incubaron durante 1-2 h en reactivo de Schiff con yoduro de propidio [100 mM metabisulfito de sodio y 0,15 N de HCl; a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL]. El material ya teñido

se colocó en los portaobjetos y se cubrió con hidrato de cloral [4 g Hidrato de cloral, 1 mL de glicerol y 2 mL de agua], donde se mantuvieron durante una noche, posteriormente las muestras se cubrieron con los cubres para su observación mediante microscopía confocal. Se tomaron imágenes de la punta de la radícula (desde la zona meristemática hasta las primeras células diferenciadas) usando un microscopio confocal Zeiss LSM-880-Axio-Imager2 con un objetivo LD/LCI-Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr-DIC-M27. La longitud de onda de excitación fue de 561 nm y la emisión se recogió a 568-702 nm.

- Tinción EdU: esta tinción se basa en el uso de un análogo detectable mediante microscopía confocal de la timidina (5-etinil-2'-deoxiuridina, EdU) que se incorpora al DNA durante su síntesis activa. Para llevar a cabo este protocolo, primero se esterilizaron las semillas de colza como se indica en el apartado 1.2. de esta sección, después las semillas se pusieron a germinar en agua y se pasaron a una placa con 10  $\mu$ M de EdU donde se incubaron durante 2 h. Se lavaron al menos dos veces para eliminar los restos de EdU y se devolvieron al agua para continuar con el proceso germinativo. Tras diseccionar los embriones en los diferentes estadios analizados se pasaron a una solución de fijación (3,7 % (v/v) de formaldehído en tampón fosfato salino (PBS) y se realizaron 3 incubaciones de 1h, y una última incubación en el mismo fijador durante una noche. Después, las semillas se lavaron dos veces en un tampón de lavado (3 % BSA (v/v) en PBS), y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min en un tampón de permeabilización (0,5 % Triton X-100 (v/v) en PBS). Tras lavarlas con tampón de lavado, se incubaron en 1 mL de Click Reaction Mix (BaseClick) durante 30 min en oscuridad y temperatura ambiente. Tras el período de reacción, las semillas se lavaron primero con tampón de lavado y después con PBS. Finalmente, se tiñeron durante 30 min con solución DAPI (1X) y se visualizaron mediante microscopía confocal. La toma de imágenes se realizó con el mismo microscopio confocal que se usó para la toma de imágenes de muestras teñidas con mPS-PI. En este caso, la longitud de onda de excitación fue de 488 nm, mientras que la emisión se recogió a 498-598 nm.

Una vez obtenidas las imágenes del meristemo radicular teñidas con mPS-PI, estas se analizaron en el software ImageJ. Para cada variedad y condición de temperatura, se contaron el número de células de la capa más externa de la endodermis y el tamaño de cada una de estas células desde el centro quiescente hasta el final de la caliptra. El tamaño del meristemo se calculó sumando el tamaño de cada una de las células del meristemo.

## 16. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

### 16.1. Análisis estadísticos

Los datos representados en esta tesis muestran la media aritmética de las réplicas técnicas o biológicas, las barras de errores muestran, para la mayoría de los experimentos, el error estándar calculado a partir de la desviación estándar. Las barras de error de los ensayos de las medidas del número de células y del tamaño del meristemo de *B. napus* muestran la desviación estándar de los valores recogidos.

Para la comparación estadística de dos categorías o grupos independientes recurrimos a una prueba t de Student unilateral o de una cola. En el caso de contar con tres o más grupos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA, *Analysis of Variance*) seguido de una prueba de Dunnett para comparaciones múltiples (*post hoc*) que nos permitiera detectar diferencias específicas frente al grupo control. En esta última también se aplicó un contraste unilateral acorde a la hipótesis de trabajo. Por ejemplo: comprobar si los mutantes estudiados en el apartado 1.5 de Resultados retrasan la germinación o la ruptura de testa respecto a Col-0. Ambos análisis devuelven un valor p para cada comparación que se representa en las gráficas de la siguiente manera: Si  $p < 0,05$  (\*) la diferencia será significativa con un nivel de confianza del 95 %; si  $p < 0,01$  (\*\*) la diferencia será significativa con una confianza del 99 %; si  $p < 0,001$  (\*\*\*) el nivel de confianza será superior al 99,9 % y si  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) el nivel de confianza será superior al 99,99 %.

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del software R (versión 4.2.2) y la interfaz de RStudio, así como con los paquetes PMCMRpluss (para los test de Dunnett; v.1.9.6; <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>) y rstatix (para las pruebas t de student, v.0.7.1; <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>).

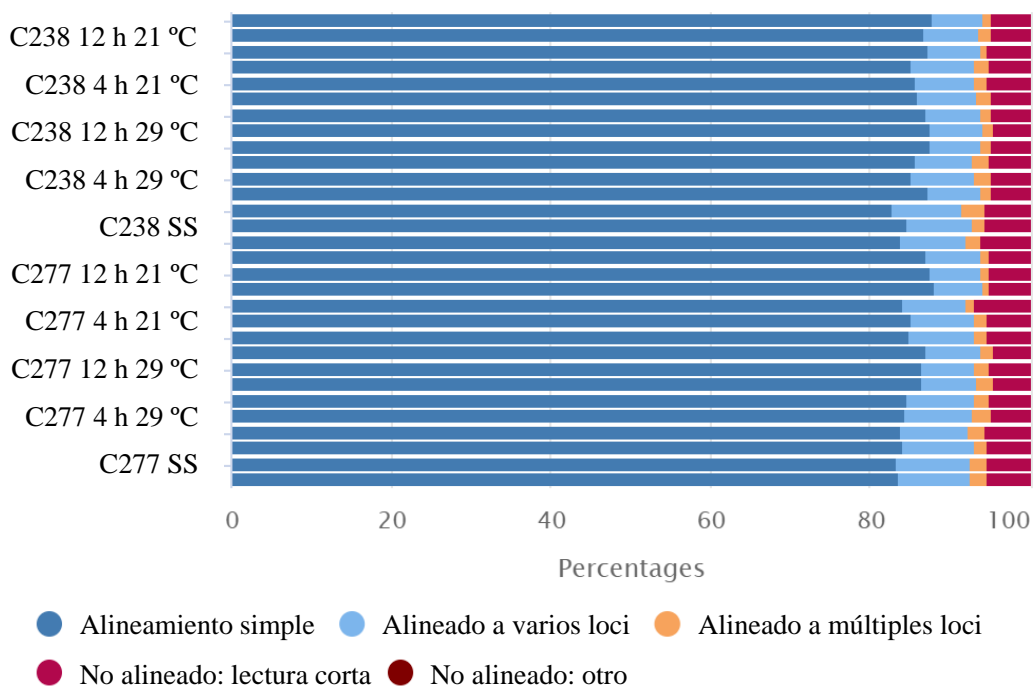
## 16.2. Análisis de datos fenotípicos, transcripcionales, metabolómicos y hormonales de la germinación de *Brassica napus*

El agrupamiento jerárquico de las variedades de invierno y primavera se realizó usando los datos de germinación con la función HCLUST del software R usando como medida la distancia de correlación de Pearson. Las matrices de correlación calculadas a partir de los datos de fenotipado y hormonales se realizaron con el paquete Hmisc de R (v.4.7.1), y de igual manera al caso anterior, se usó como medida la distancia de correlación de Pearson. Los análisis de componente principal (PCA) se realizaron con los paquetes FactoMiner (Lê et al., 2008) y factoextra (<https://rpkgs.datanovia.com/factoextra/index.html>) de R (v1.42 o v2.4 y 1.0.5 o v1.0.7, respectivamente).

El tratamiento previo de los datos genómicos cedidos consistió en el filtrado de las lecturas obtenidas para eliminar la posible presencia de adaptadores, las lecturas se mapearon en el genoma de referencia (Genome assembly, AST\_PRJEB5043\_v1, Chalhoub et al., 2014) usando HISAT. El ensamblaje y cuantificación de cada uno de los transcritos se realizó con StringTie, seleccionándose aquellos que diesen al menos una lectura (74.019 genes de 101.040). La lista de genes expresados diferencialmente (DEGs) se obtuvo mediante comparación por pares de todos los transcritos por muestras y condiciones [cutoff  $-1 > \log_2$  fold change (FC)  $> 1$ ]. Los análisis de correspondencia se obtuvieron con la herramienta COA del software MeV (Chu et al., 2008). El agrupamiento de k-means de genes expresados diferencialmente se realizó usando el algoritmo Fuzzy K-means del software XLSTAT (Addinsoft) usando un coeficiente de fuzziness de 1. Por último, el análisis de ontología génica (GO) se hizo con el software SeqEnrich (Becker et al., 2017), y la comparación de los GO resultantes para cada grupo se realizó utilizando la herramienta SEACOMPARE incluida en el kit de herramientas AgriGO (Du et al., 2010).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El procesamiento de los datos genómicos generados en el laboratorio a partir de las variedades de primavera consistió en el filtrado de las lecturas obtenidas para eliminar la posible presencia de adaptadores con Trimmomatic (Bolger et al., 2014), las lecturas se mapearon en el genoma de referencia (*Brassica napus* - Ensembl Genomes 52., AST\_PRJEB5043\_v1) usando STAR (Dobin et al., 2013). El ensamblaje de cada uno de los transcritos, así como el control de calidad se realizó con FastQC (Babraham Bioinformatics, Figura 9), la cuantificación de transcritos se realizó usando HTSeq 2.0 (Putri et al., 2022). Se seleccionaron aquellos transcritos que diesen al menos 50 lecturas en al menos 1 de las 30 muestras (60.749 genes de 101.040) y se obtuvo la lista de genes expresados diferencialmente (DEGs) con el paquete de R DESeq2 (v3.15, Love et al., 2014) mediante comparación de todos los transcritos por muestras y temperatura o variedad [cutoff  $-0,58 > \log_2$  fold change (FC)  $> 0,58$ ]. La comparación de DEGs entre cada muestra y su representación en mediante diagramas de Venn se realizó utilizando el software jvenn (Bardou et al., 2014). El agrupamiento de k-means de DEGs se realizó usando el paquete factoextra (v1.0.7) de R usando una medida de distancia euclidiana y un método de aglomeración completo. Por último, los análisis GO de cada uno de los grupos obtenidos se hicieron utilizando la herramienta GO enrichment de la plataforma *Brassica napus* Information resource (<http://yanglab.hzau.edu.cn/BnIR/GO>; Yanglab; Huazhong Agricultural University), obteniéndose aquellas categorías con un valor  $p < 0,001$ . La complejidad de los datos se redujo utilizando la herramienta REVIGO (Supek et al., 2011), utilizando *allowed similarity = 0.5*; *semantic similarity measure = SimRel*). La representación de los análisis de GO se realizó usando los paquetes ggplot2 (v.3.3.6; Wickham, 2016) y treemapify (v.2.5.5; <https://wilkoj.org/treemapify/>) de R.



**Figura 9. Porcentaje de alineamiento de los datos de RNASeq de semillas de *Brassica napus* obtenido con el software de alineamiento de RNASeq FastQC.** Cada muestra cuenta con 3 réplicas biológicas. Se muestran los porcentajes de lecturas que alinean con una sola secuencia, los que alinean con varias o muchas, o los que no alinean con ninguna de las secuencias del genoma de referencia.

# RESULTADOS

---

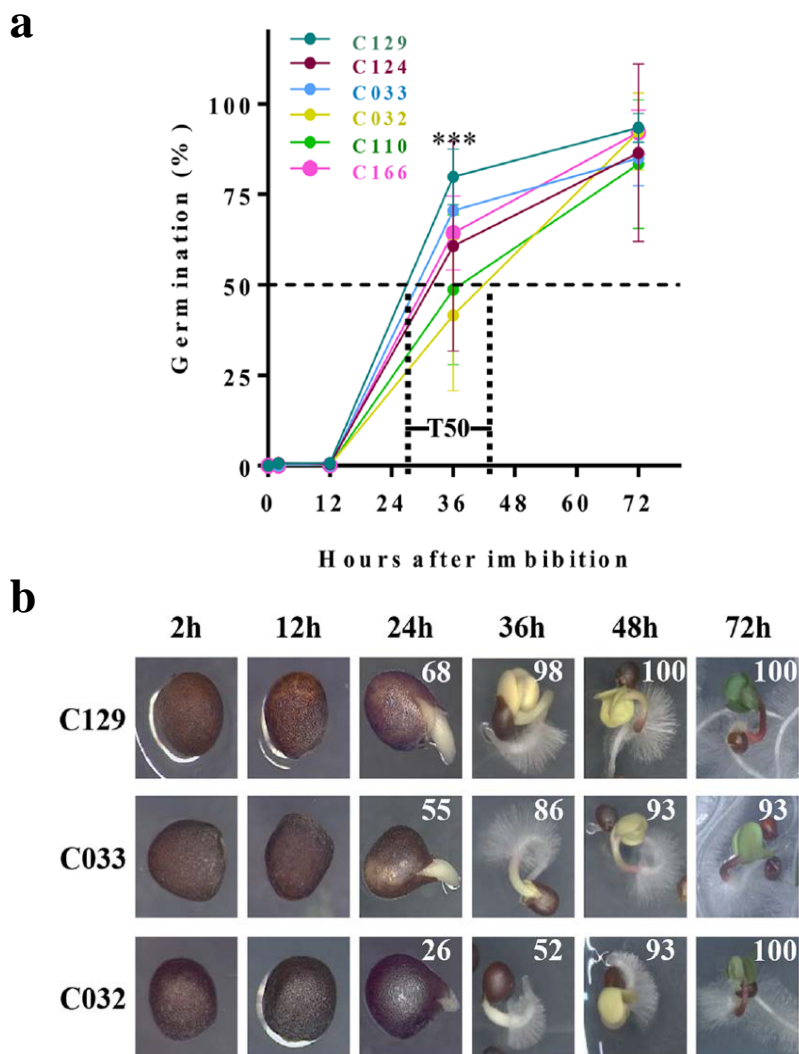


## **2. ANÁLISIS DEL PROCESO DE GERMINACIÓN EN DISTINTAS VARIEDADES DE *BRASSICA NAPUS***

Hasta ahora, la mayoría de los estudios realizados en colza se han centrado en el análisis y la mejora de los caracteres relacionados con el desarrollo vegetativo y la floración, mientras que los estudios sobre el vigor de las semillas, el proceso germinativo o el control genético de estos caracteres han sido menos numerosos. Estos procesos son fundamentales en el rendimiento de la colza, y en los que el estrés abiótico tiene efectos severos (Driedonks et al., 2016). En trabajos previos, se ha demostrado mediante análisis genéticos y fenotípicos de diferentes variedades de colza que el vigor de este cultivo aún tiene margen de mejora (Hatzig et al., 2015). Así, se decidió analizar en profundidad el proceso germinativo en un panel de variedades de invierno de colza que difieren entre sí por su capacidad germinativa.

### **2.1. La velocidad de germinación es el carácter clave que más contribuye a la variabilidad en la dinámica de germinación entre variedades de colza**

Una germinación uniforme es clave para garantizar la productividad de los cultivos. Pero a pesar de su importancia, no se habían identificado los principales procesos que regulan el proceso de germinación en colza. Por lo tanto, decidimos estudiar en profundidad dicho proceso mediante el análisis de la variabilidad del proceso germinativo en un panel de seis variedades de invierno de *B. napus*. Para ello se realizó primero un ensayo de germinación con estas variedades donde se analizó en detalle los distintos eventos germinativos que ocurren a lo largo de este proceso (Figura 23a), incluyendo la ruptura de testa, la protrusión y elongación de la raíz, la apertura y desarrollo de cotiledones y, finalmente, su enverdecimiento (Figura 23b).



**Figura 23. Las variedades de invierno de colza muestran una variabilidad significativa durante el proceso germinativo. (a)** Aunque algunas variedades comenzaron a germinar a las 12 h, las principales diferencias en la velocidad de germinación se presentan cuando se alcanza el T50. La gráfica muestra los porcentajes de semillas germinadas en los tiempos de conteo (2, 12, 36 y 72 h) para las variedades analizadas C166, C129, C124, C033 y C032. **(b)** Se eligieron 3 de las 6 variedades representativas de las diferentes velocidades de germinación (alta, C129; media, C033; y baja, C032), y se tomaron fotos a los diferentes tiempos para mostrar las diferencias en cada etapa de germinación: la imbibición de la semilla (12 h), la protrusión de la radícula a través de la testa (24 h), la elongación de la radícula y la expansión del cotiledón (36 h), la plántula emergida (48 h), y, finalmente, la plántula verde (72 h). Los porcentajes de germinación para cada punto de tiempo se indican en la esquina superior derecha de cada imagen. Todos los datos se obtuvieron utilizando cuatro repeticiones biológicas (25 semillas por réplica; Boter et al., 2019).

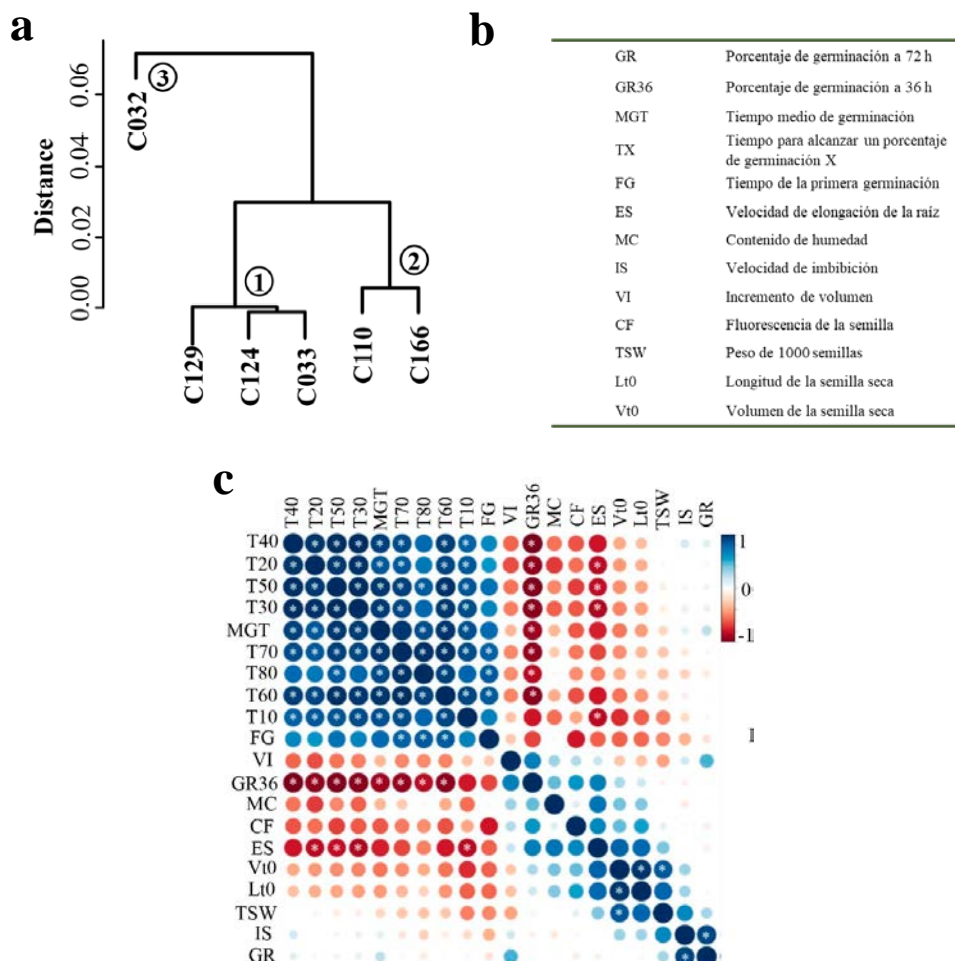
Así se observó que en *B. napus* el primer evento de germinación (ruptura de la testa) ocurrió muy temprano, a las 12 horas después de la imbibición, en algunas variedades.

Sin embargo, este suceso tuvo lugar de manera mayoritaria en torno a las 24 h (Figura 23). De hecho, la mayor parte de la variabilidad observada en las dinámicas de germinación entre las diferentes variedades ocurrió en los tiempos más tempranos de germinación. Así, el 50 % de semillas germinadas (T50) se alcanzaba entre las 27 (C129) y las 42 h (C032) entre las distintas variedades analizadas. Además, la germinación a tiempo final (GR) variaba entre el 93 % (C129) y el 83 % (C110) (Figura 23a). No obstante, el proceso de establecimiento de plántula tras la germinación fue similar entre las diferentes variedades. Se observó que la apertura de los cotiledones ocurre a las 36 h, y su desarrollo completo ocurre a las 48 h, mientras que el enverdecimiento se completa a las 72 h (Figura 23b). En general, se observó que todas las variedades siguen un patrón de desarrollo común durante el proceso de germinación, y que las diferencias entre variedades se deben principalmente a las diferencias en cinéticas de germinación más que a los porcentajes de germinación totales. Por ejemplo, las variedades C129, C124, y C033 alcanzaban un 70 % de germinación a las 36 h mientras que C032 solo tenía un 40 % de semillas germinadas, sin embargo, sus porcentajes de germinación totales solo variaban desde el 93 % (C129) al 83 % (C110).

Una vez realizada la cuantificación de los caracteres germinativos, para poder estudiar cuáles de ellos son más relevantes a la hora de determinar las diferencias de cinética observadas, se realizó un agrupamiento jerárquico de las diferentes variedades basándose en dichos parámetros cinéticos de germinación (Tabla suplementaria 3). Este análisis agrupó las variedades en 3 grupos diferentes, el grupo 1 incluía a las variedades C129, C124 y C033, que son las que presentaban una germinación más rápida; el grupo 2 incluía a las variedades C110 y C116 con una velocidad intermedia entre el grupo 1 y el grupo 3 y, por último, el grupo 3 contenía una única variedad (C032) que se separaba del resto de grupos debido a su baja velocidad de germinación (Figura 24a). Este agrupamiento apoya la observación previa de que el principal rasgo que diferencia unas variedades de otras es la velocidad de germinación. Para caracterizar en mayor profundidad la variabilidad observada y confirmar esta hipótesis, se incorporó a nuestros análisis la cuantificación de un amplio número de caracteres germinativos (Figura 24b) de estas variedades obtenida en el laboratorio de la Dra. Nathalie Nesi usando una plataforma de fenotipado automático (Tabla suplementaria 4; Ducournau et al., 2004, 2005; Wagner *et al.*, 2011; Demilly et al., 2014; Hatzig et al., 2015). Con todos estos datos se realizó un análisis de correlación que nos permitió identificar las interacciones y relación entre los diferentes caracteres germinativos (Figura 24c), así como un análisis de componentes principales (PCA) para determinar las diferentes relaciones entre variedades y caracteres germinativos y discernir cuales son aquellos que tienen más influencia en la variabilidad de las dinámicas de germinación que hemos identificado (Figura 23). Como se puede observar en la Figura 20c, los caracteres relacionados con la velocidad de germinación (TX, que es el tiempo requerido desde la imbibición para alcanzar una germinación del X % y MGT, tiempo medio requerido desde la imbibición para que se produzca la germinación) guardan una correlación positiva entre sí, mientras que su correlación con GR36 (el porcentaje de germinación a las 36 h, es decir, a tiempo medio del experimento) es negativa. Esta correlación negativa se explica porque cuanto más rápida es la germinación de una variedad y por tanto menor es su TX o MGT, se requiere menos tiempo para alcanzar un porcentaje de germinación determinado, y en consecuencia mayor será el número de semillas germinadas a las 36 h. Curiosamente, todos estos caracteres no guardan ninguna

## RESULTADOS

correlación con los caracteres relacionados con las características de la semilla (TSW, el peso de 1000 semillas; IS, velocidad de imbibición; Lto, longitud de la semilla seca; Vto, volumen de la semilla seca; CF, fluorescencia de la semillas; MC, contenido de humedad; o VI, incremento del volumen) ni con el porcentaje de germinación a tiempo final. Todos estos resultados parecen apoyar nuestra hipótesis de que las diferencias más significativas entre variedades se deben precisamente a sus diferencias en la velocidad de germinación, especialmente en los estadios iniciales.

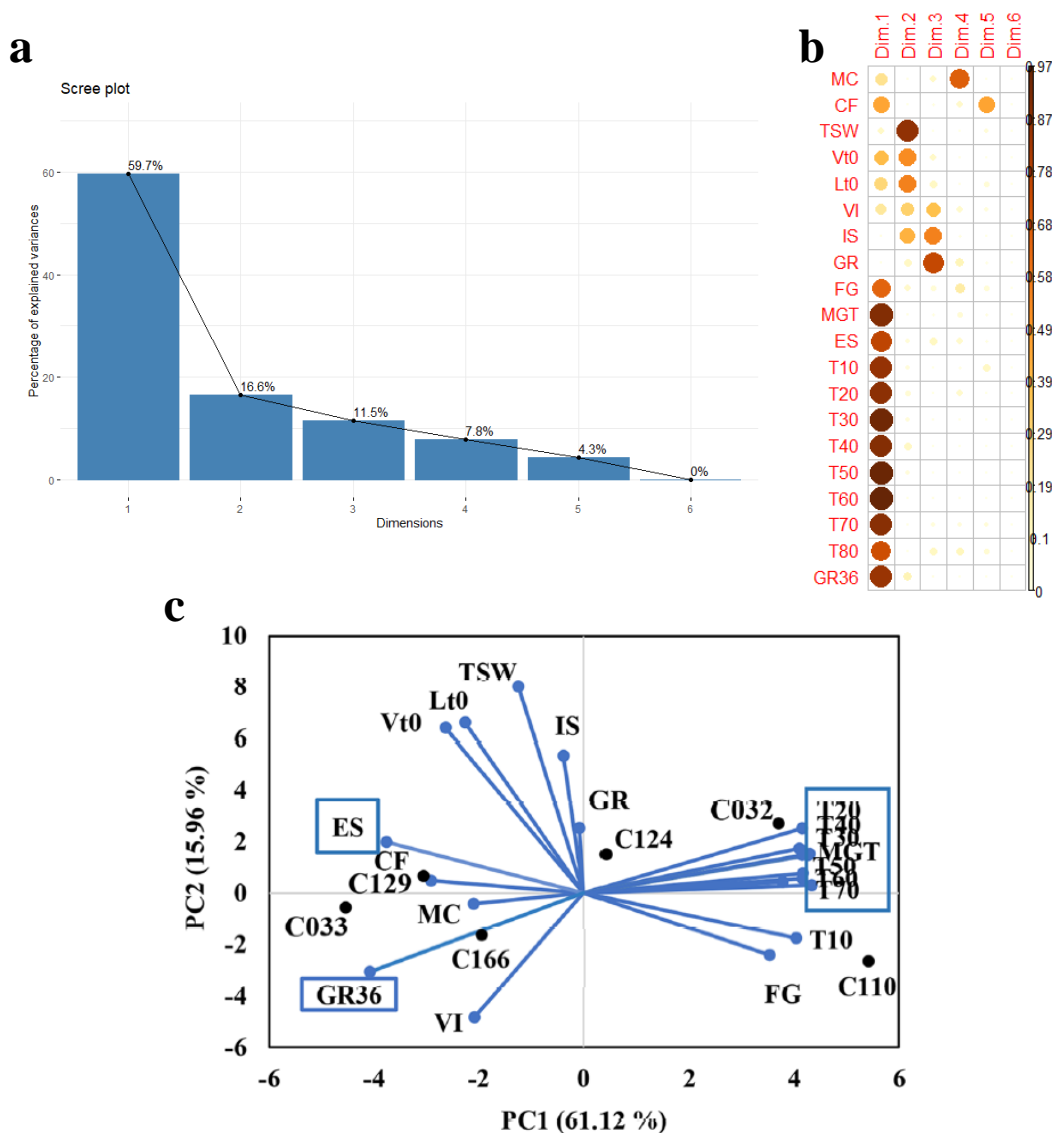


**Figura 24. Las diferencias de germinación entre variedades se deben a diferencias en los caracteres de germinación relacionados con su cinética. (a)** Dendrograma de las variedades de invierno que se agrupan en tres grupos (1, 2 y 3) de acuerdo con su cinética de germinación. Se utilizó un agrupamiento jerárquico donde el eje Y representa la similitud en función de los coeficientes de correlación de Pearson. **(b)** Leyenda que resume los caracteres de germinación y semilla cuantificados. **(c)** Gráfico de correlación, donde se comparan las posibles interacciones entre los distintos caracteres de germinación. Los tonos de azul representan correlaciones positivas entre los caracteres, mientras que los tonos rojos representan correlaciones negativas. Los asteriscos indican una correlación significativa:  $p < 0,05$ .

La representación de los análisis del PCA, nos permite visualizar la separación entre las variedades a partir de todas las correlaciones entre los caracteres observados (Figura 24c) resumidas en nuevas variables que son combinaciones de estas correlaciones. Primero, los resultados del análisis previo del PCA nos permitieron extraer información importante sobre la contribución de cada uno de los caracteres a la variabilidad observada. Al analizar los datos de la plataforma de fenotipado vimos que los caracteres de semilla y germinación se podían descomponer hasta en 6 dimensiones (Figura 25a), de las cuales, las 3 primeras son capaces de explicar hasta un 87,8 % de la variación observada. Solamente la primera dimensión es capaz de explicar hasta casi un 60 % de la variabilidad observada, mientras que el peso de la segunda dimensión desciende hasta un 16,6 % y la tercera hasta un 11,5 %. Un análisis más profundo de las dimensiones nos ayudó a comprobar cuáles son los caracteres que determinan cada una. En la figura 25b se observa la influencia de cada uno de los caracteres de germinación y semilla para cada dimensión. Así, podemos observar que en la primera dimensión los caracteres con mayor contribución son aquellos relacionados con la cinética de germinación, mientras que en la segunda dimensión se observa que son los caracteres de relacionados con la semilla y en la tercera dimensión aparecen algunos caracteres de germinación como el porcentaje de germinación total (GR). Por lo tanto, decidimos que las dimensiones 1 y 2 son las más completas, reuniendo entre ellas a la mayoría de los caracteres analizados, y por tanto se usaron para realizar el PCA.

La representación de los análisis del PCA, nos permite visualizar la separación en el eje horizontal (la primera dimensión, PC1) entre las variedades C129 y C033, que germinan más rápido, y la variedad que germina más lenta (C032). Esta PC1 tiene una contribución del 61,12 % (Figura 25c). Las variables que más contribuyen a este PC1 son aquellas relacionadas con los caracteres de cinética de germinación (TX y MGT) y de porcentajes de germinación (GR36). Dichos caracteres se separan a cada lado del eje confirmando la correlación negativa observada previamente en los análisis de correlación. Consecuentemente, las variedades que germinan más rápido (C129 y C033), se sitúan en la gráfica próximas a GR36 y lejos de los TX, indicando un valor alto del primero y bajo de los últimos a lo largo de la germinación. Cabe destacar, la correlación negativa entre de la velocidad de elongación de la raíz (ES) y los diferentes TX, siendo las variedades que germinan más rápido las que muestran un mayor ES. Por tanto, una mayor velocidad de germinación podría estar asociada a una activación más temprana del meristemo radicular y a una mayor velocidad de elongación de la radícula a tiempos tempranos. Por otro lado, la segunda componente (PC2), solo explica un 15,96 % de las diferencias entre variedades y está compuesta por caracteres relacionados con la semilla como el peso de 1000 semillas (TSW), longitud de semilla (Lt0) y volumen de semilla (Vt0) a tiempo 0. Estos caracteres contribuyen en poca medida a explicar la variabilidad observada en el proceso germinativo y además no guardan correlación con los caracteres relacionados con la germinación. Con todo ello, estos resultados sugieren que la variabilidad fenotípica observada durante la germinación en variedades de colza se debe principalmente a la velocidad de germinación de cada variedad más que a las características de la semilla o a los porcentajes finales de germinación.

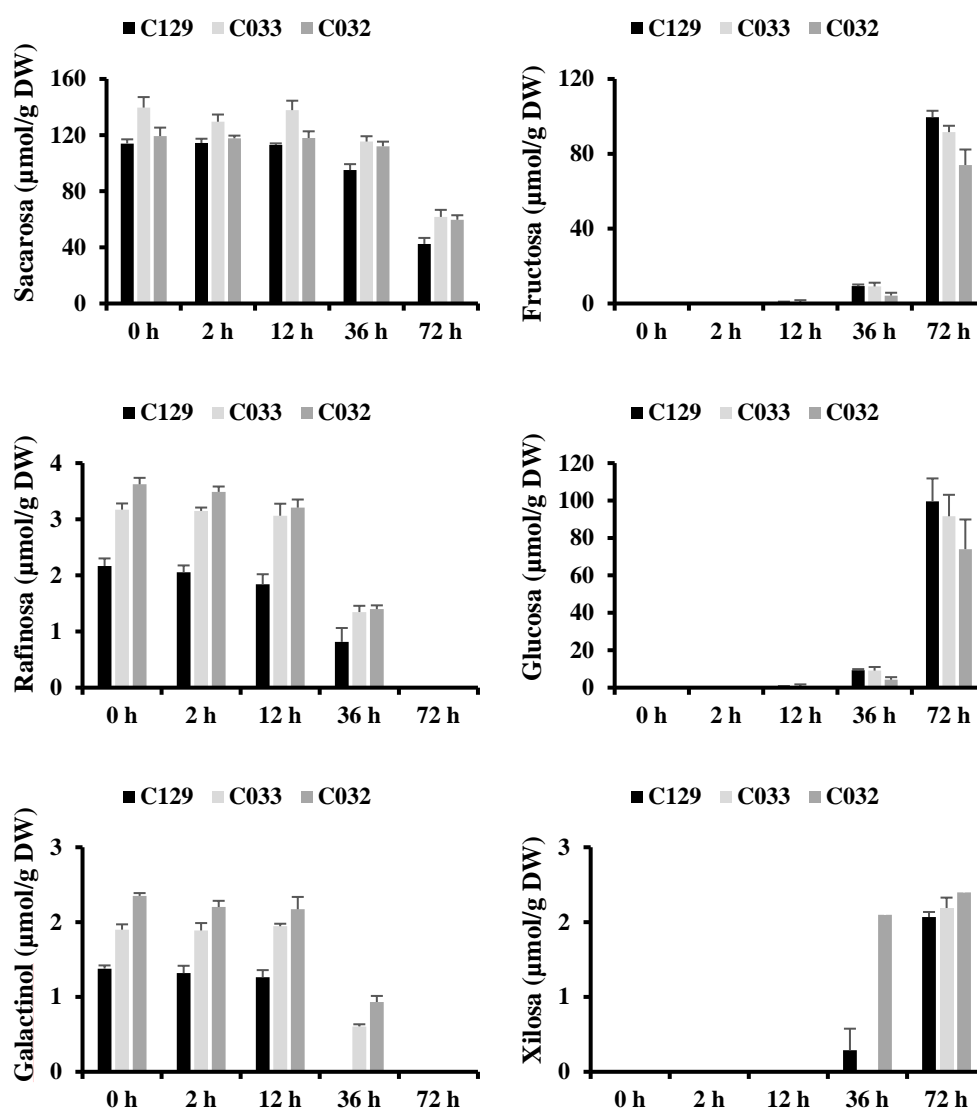
## RESULTADOS



**Figura 25. Las diferencias de germinación entre variedades se deben a diferencias en los caracteres de germinación relacionados con la cinética. (a)** Representación de las dimensiones generadas a partir de la combinación de los datos de la plataforma de fenotipo. El número que se encuentra encima de cada columna indica la contribución de esa dimensión para definir la variabilidad observada entre variables. **(b)** Gráfico de representación de la calidad de cada variable para cada dimensión. Una mayor intensidad y diámetro de los círculos marrones representan una mayor contribución en esta dimensión. Los números asociados a las diferentes intensidades de color indican la calidad de representación, cuanto más cercano a 1, más representan los caracteres a la dimensión dada. **(c)** PCA basado en los caracteres de germinación y semilla, estos caracteres contribuyen de forma diferencial a cada una de las dos dimensiones. Los principales contribuyentes a la variabilidad en la germinación de las 6 variedades (marcadas con puntos negros) son los parámetros cinéticos de germinación de semillas (ES, GR36, MGT y T20-T70, recuadros azules). Todos los caracteres están marcados por una línea azul que los separa en las 2 dimensiones del PCA. Todos los datos se obtuvieron utilizando cuatro réplicas biológicas (25 semillas por réplica; Boter et al., 2019).

## 2.2. Los perfiles metabólicos durante la germinación definen un patrón común de cambio metabólico en *B. napus*

La germinación es un proceso complejo por lo que es necesario su estudio a diferentes niveles. Así, para dilucidar cuales son los procesos biológico más relevantes en dicho proceso decidimos estudiar los perfiles metabólicos, hormonales y transcriptómicos en variedades de colza con distinto comportamiento germinativo. En base a los resultados obtenidos en el apartado anterior decidimos elegir tres de las seis variedades analizadas, estas variedades son, C129 y C033, que tienen un rendimiento germinativo medio-alto, y C032 con un rendimiento mucho menor.

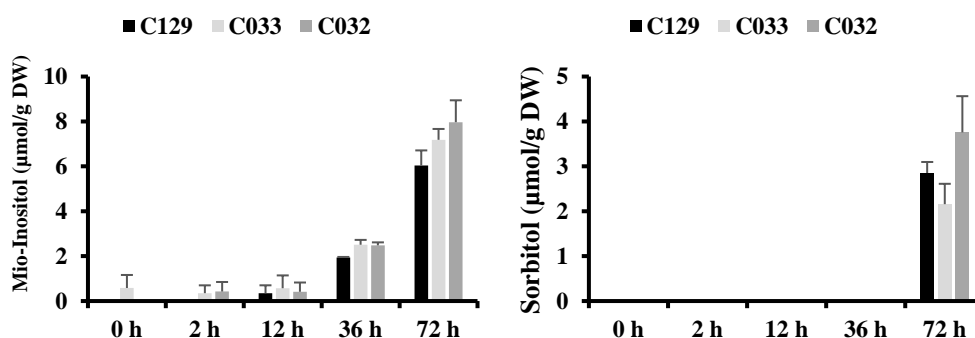


**Figura 26. Los contenidos de carbohidratos varían a lo largo del proceso germinativo.** Los diferentes carbohidratos se acumulan diferencialmente en las 3 variedades, aunque siguen una cinética similar. Por un lado, los contenidos en polisacáridos disminuyen a partir de las 12 h, mientras que los monosacáridos se acumulan a partir de las 36 h. Los gráficos presentan los niveles de sacarosa, rafinosa, galactinol, fructosa, glucosa, y xilosa ( $\mu\text{mol/g}$  peso seco).

## RESULTADOS

Las semillas de *B. napus* sufren un proceso de desecación intenso al final del proceso de maduración, pero necesitan mantener el potencial germinativo a lo largo del tiempo en estas condiciones de sequedad (Roberts, 1973). Para conseguirlo, es necesaria la presencia de mecanismos que mantengan la maquinaria metabólica en un estado de quiescencia capaz de reactivarse al comienzo de la germinación (Rajjou et al., 2012). Los compuestos de reserva son claves para este proceso de reactivación metabólica (Weitbrecht et al., 2011; Nonogaki, 2014; Paszkiewicz et al., 2017). Por ello, decidimos analizar dichos compuestos de reserva, en concreto, los contenidos de azúcares, polialcoholes, compuestos orgánicos y aminoácidos en las semillas de estas variedades a lo largo del proceso de germinación. La cuantificación de estos compuestos fue fruto de una colaboración con los laboratorios de los Drs. Snowden y Nesi, utilizándose 3 réplicas biológicas (50 semillas por réplica) para cada uno de los diferentes puntos de tiempo analizados. Se realizó un análisis de PCA con estos datos, lo que nos permitió identificar que compuestos podrían contribuir más a la variabilidad en la germinación observada entre estas tres variedades. En la Tabla Suplementaria 4, se reúnen los datos de las medidas obtenidas para cada metabolito.

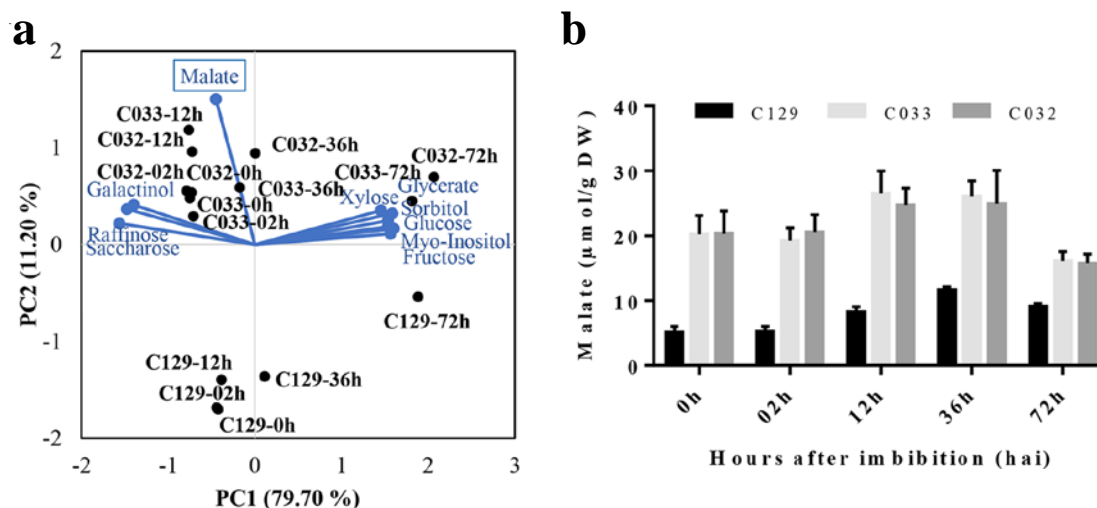
Los principales carbohidratos acumulados en semilla seca y durante las primeras horas de germinación (hasta las 12 h) son la sacarosa, la rafinosa y el galactinol (Figura 26). Estos resultados concuerdan con publicaciones previas en las que el aumento de los niveles de sacarosa durante el desarrollo de los embriones de colza se asocia con la degradación y movilización de las reservas durante el proceso de maduración de la semilla (Hill et al., 2003; Schwender et al., 2003). A partir de las 12 h, los niveles de estos azúcares disminuyen mientras que los monosacáridos como la fructosa, la glucosa y la xilosa, así como, los polialcoholes como el mio-inositol y el sorbitol se empieza n a acumular de forma similar a lo que ocurre durante la germinación en otras especies vegetales (Figuras 26 y 27; Howell et al., 2009; Gu et al., 2016).



**Figura 27. Los contenidos de polialcoholes varían a lo largo del proceso germinativo.** Los polialcoholes se acumulan a partir de las 36 h siguiendo una cinética similar entre variedades. Los gráficos presentan los niveles de mio-inositol y sorbitol ( $\mu\text{mol/g}$  peso seco).

El análisis de estos datos mediante PCA (Figura 28a) nos permitió identificar que la primera dimensión está definida por los niveles de carbohidratos y polialcoholes, encontrándose los oligosacáridos en el extremo opuesto a monosacáridos y polialcoholes. Este resultado concuerda con lo observado en las Figuras 26 y 27 en las que la

acumulación de sacarosa, rafinosa y galactinol sigue una cinética opuesta a las de acumulación de monosacáridos y polialcoholes. La segunda dimensión (11,2 %) está mayoritariamente definida por los niveles de malato que define y separa a la variedad C129 (con un rendimiento germinativo alto) de las otras dos variedades debido a los bajos niveles de malato que presenta en todos los tiempos analizados (Figura 28b). Esta correlación negativa podría deberse a la mayor eficiencia de esta variedad a la hora de movilizar los compuestos de reserva que proveen a la semilla de la suficiente energía para llevar a cabo la germinación, ya que el malato es un intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y del glioxilato (Eastmond and Graham, 2001).

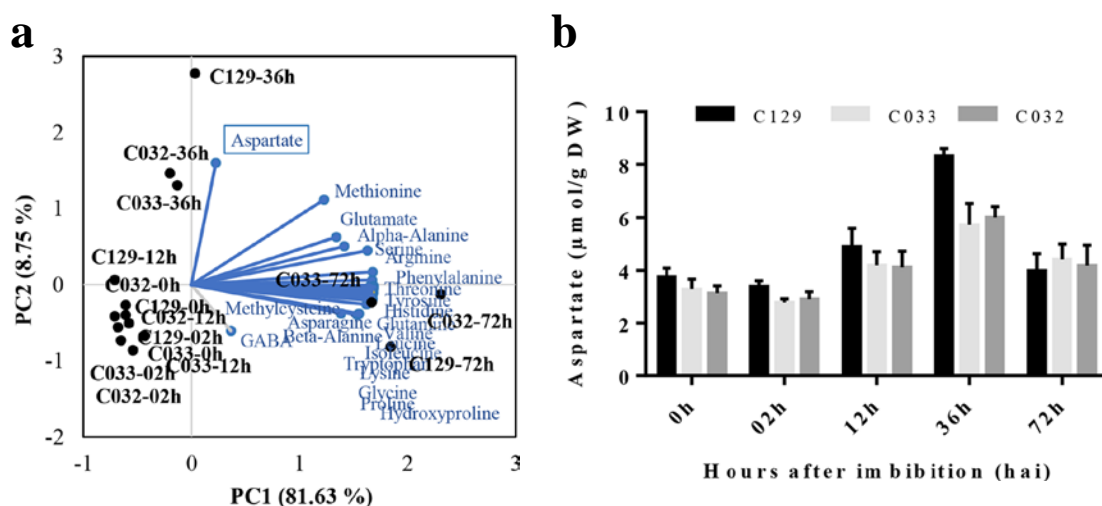


**Figura 28.** Los perfiles metabólicos de las variedades de colza de invierno muestran que los niveles de malato se correlacionan de forma negativa con el rendimiento de la germinación. (a) El PCA de los niveles de azúcares, polialcoholes y compuestos orgánicos a lo largo de la germinación refleja la necesidad de movilizar las reservas para obtener energía. Los niveles de malato (recuadro azul) contribuyen significativamente a la diferencia observada en germinación de la variedad C129. Las variedades están marcadas/señaladas en negro y los metabolitos en azul. (b) La variedad C129 tiene niveles más bajos de malato en comparación con las variedades C032 y C033. En la gráfica se representan los niveles de malato (μmol/g PS) a las 0, 12, 24, 48 y 72 h tras la imbibición de las variedades C129, C032 y C033 (Boter et al., 2019).

Por otro lado, cuando analizamos los niveles de aminoácidos en estas variedades se observó que todos los aminoácidos detectados se acumulan a lo largo del proceso de germinación (Figura 29a) de forma similar a la observada en otras especies (Fait et al., 2006). En el caso de las variedades de colza, cuando realizamos el análisis de PCA con los niveles de aminoácidos detectados a los distintos tiempos durante la germinación, la primera dimensión (81,63 %) está definida por la acumulación de la gran mayoría de aminoácidos sin diferencias significativas entre ellos. La segunda dimensión (8,75 %) está definida principalmente por los niveles de aspartato, y señala a las 36 h como el pico de acumulación de este compuesto en todas las variedades, siendo mayor en la variedad C129 (Figura 29b). El aspartato es uno de los metabolitos necesario para el TCA (Weitbrecht et al., 2011), lo que parece indicar que niveles altos de aspartato podría estar

## RESULTADOS

correlacionados con una mejor eficiencia energética durante la germinación. Así, al igual que con los niveles de malato, nuestros resultados sugieren que para llevar a cabo un proceso germinativo rápido y eficiente sería necesaria una movilización rápida de las sustancias de reserva que garantice el abastecimiento energético de la semilla durante la germinación. Así, las variedades con niveles bajos de malato y altos de aspartato (como C129) presentan una germinación más rápida con respecto a la variedad con niveles más altos. Lo que podría deberse a una utilización del malato para la síntesis de aspartato y la posterior biosíntesis de otros aminoácidos o nucleótidos.

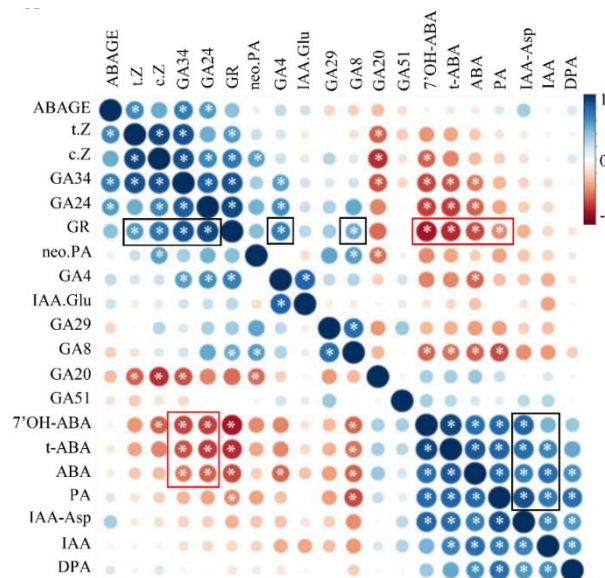


**Figura 29. Los perfiles metabólicos de las variedades de colza de invierno muestran que los niveles de aspartato se correlacionan con el rendimiento de la germinación. (a)** Los niveles de aminoácidos aumentan durante la germinación en todas las accesiones analizadas. El aspartato (caja azul) muestra una acumulación diferencial, especialmente en C129 a las 36 h. Las variedades están marcadas en negro y los aminoácidos en azul. **(b)** C129 tiene niveles más altos de aspartato en comparación con C032 y C033. En la gráfica se representan los niveles de aspartato ( $\mu\text{mol/g DW}$ ) a las 0, 12, 24, 48 y 72 h tras imbibición de las variedades C129, C032 y C033 (Boter et al., 2019).

### 2.3. El balance hormonal entre GAs y ABA determina el rendimiento de la germinación en *B. napus*

Las fitohormonas son claves para la regulación de la germinación así, por ejemplo, las GAs y el ABA son los reguladores principales de este proceso, mientras que otras hormonas, como auxinas o citoquininas no tienen un papel tan relevante (Finkelstein et al., 2008; Han and Yang, 2015; Shu et al., 2016). El ABA es el inhibidor principal del proceso germinativo y está presente durante el desarrollo de la semilla y su maduración, mientras que las GAs son las promotoras de este proceso y se acumulan desde el momento de la imbibición de la semilla (Holdsworth et al., 2008a; Rajjou et al., 2012; Nonogaki, 2014; Vishal and Kumar, 2018).

Para desentrañar el papel y la contribución que tienen las diferentes rutas hormonales en la regulación de la germinación en *Brassica napus* y en la variabilidad en este proceso en las variedades analizadas, se midieron los perfiles hormonales de ABA, auxinas, citoquininas y GAs a diferentes tiempos durante la germinación, de igual manera que con los perfiles metabolómicos, estos datos surgieron de la colaboración con los Drs. Snowden y Nesi, utilizándose 3 réplicas biológicas con 50 semillas cada una para cada punto de tiempo. Entre las formas de hormonas medidas no solo se cuantificaron las biológicamente activas sino también los compuestos precursores, las formas de reserva y los compuestos de degradación (Tabla suplementaria 2). Tras realizar la cuantificación de dichos compuestos, se realizó un análisis de correlación entre los niveles de las diferentes hormonas y el porcentaje de germinación a las 72 h (GR). Se observó que los niveles de GAs (GA4, GA8, GA24, and GA34) y citoquininas (c-Z and t-Z) correlacionan positivamente con GR mientras que los niveles de ABA activa (t-ABA) e inactivas (PA y 7'OH-ABA) correlacionan de manera negativa con GR y con los niveles de GAs (Figura 30). Estos resultados confirman que el papel antagonista de estas dos hormonas descrito para otras especies vegetales se mantiene en *B. napus*.

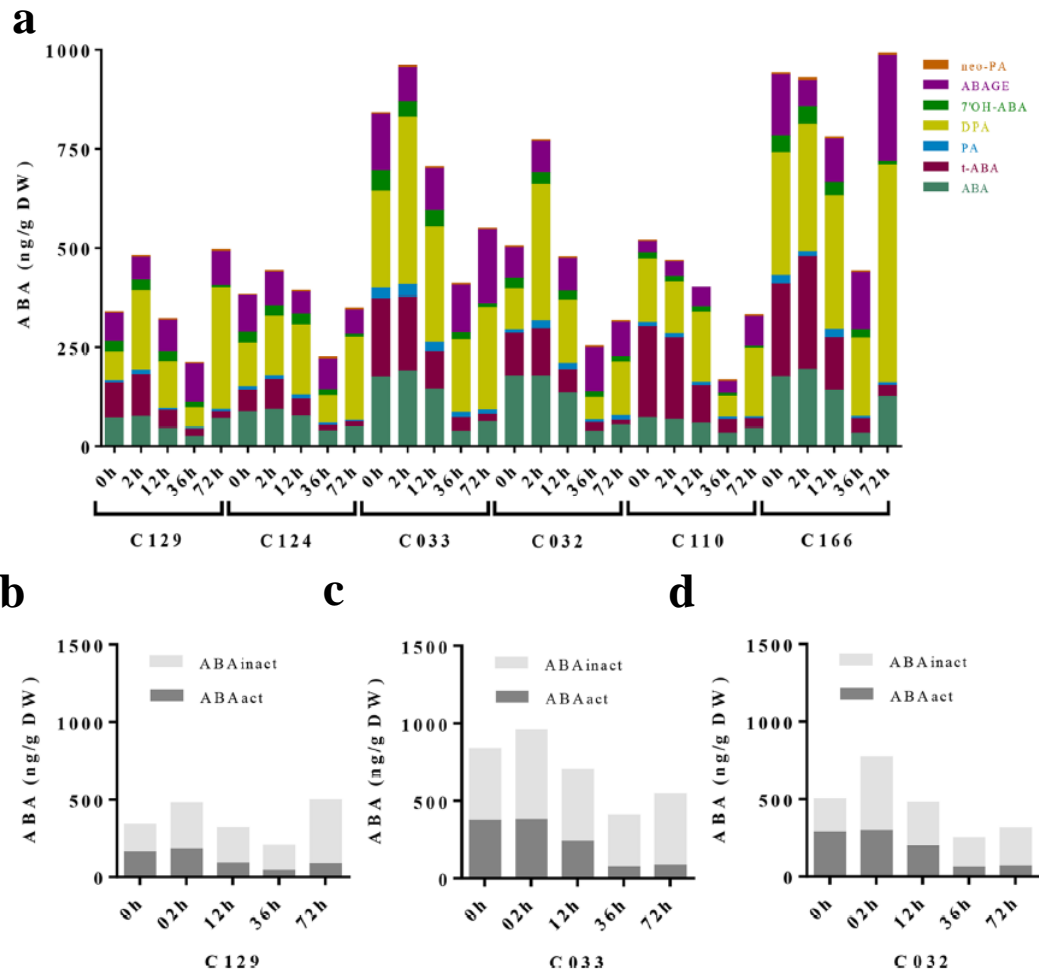


**Figura 30. El porcentaje de germinación correlaciona positivamente con los niveles de giberelinas y negativamente con los niveles de abscísico.** Gráfico de correlación, donde se muestran las interacciones entre los niveles de hormonas y el porcentaje de germinación. En los cuadrados negros del cuarto superior izquierda se observa la correlación positiva entre el porcentaje de germinación y los niveles de GAs y citoquininas. En rojo se muestra la correlación negativa entre la germinación y los niveles de GAs con los niveles de ABA, mientras que el cuadrado negro del cuarto inferior derecha muestra la correlación positiva entre los niveles de auxinas y ABA (Boter et al., 2019).

El análisis de los niveles de acumulación de las distintas hormonas a los diferentes tiempos de germinación también reveló que los niveles de ABA disminuyen desde los primeros tiempos del proceso, alcanzando los niveles más bajos a las 12 y 36 h (Figura 31a). No obstante, los niveles de acumulación de ABA en semilla seca no coincide con

## RESULTADOS

los diferentes grupos de variedades identificados basados en la capacidad germinativa. Las variedades C129, C124 y C110 mostraron en semilla seca y a 2 y 12 h niveles más bajos de esta hormona que el grupo de variedades C032, C033 y C116. Sin embargo, a las 36 h de comenzar la germinación, los niveles de ABA bajaban en todas las variedades. Por otro lado, al comparar los niveles totales de ABA activo e inactivo se observó que las formas inactivas del ABA eran mayores en las variedades C032 y C033 que en la variedad C129 (Figura 31b, c y d).

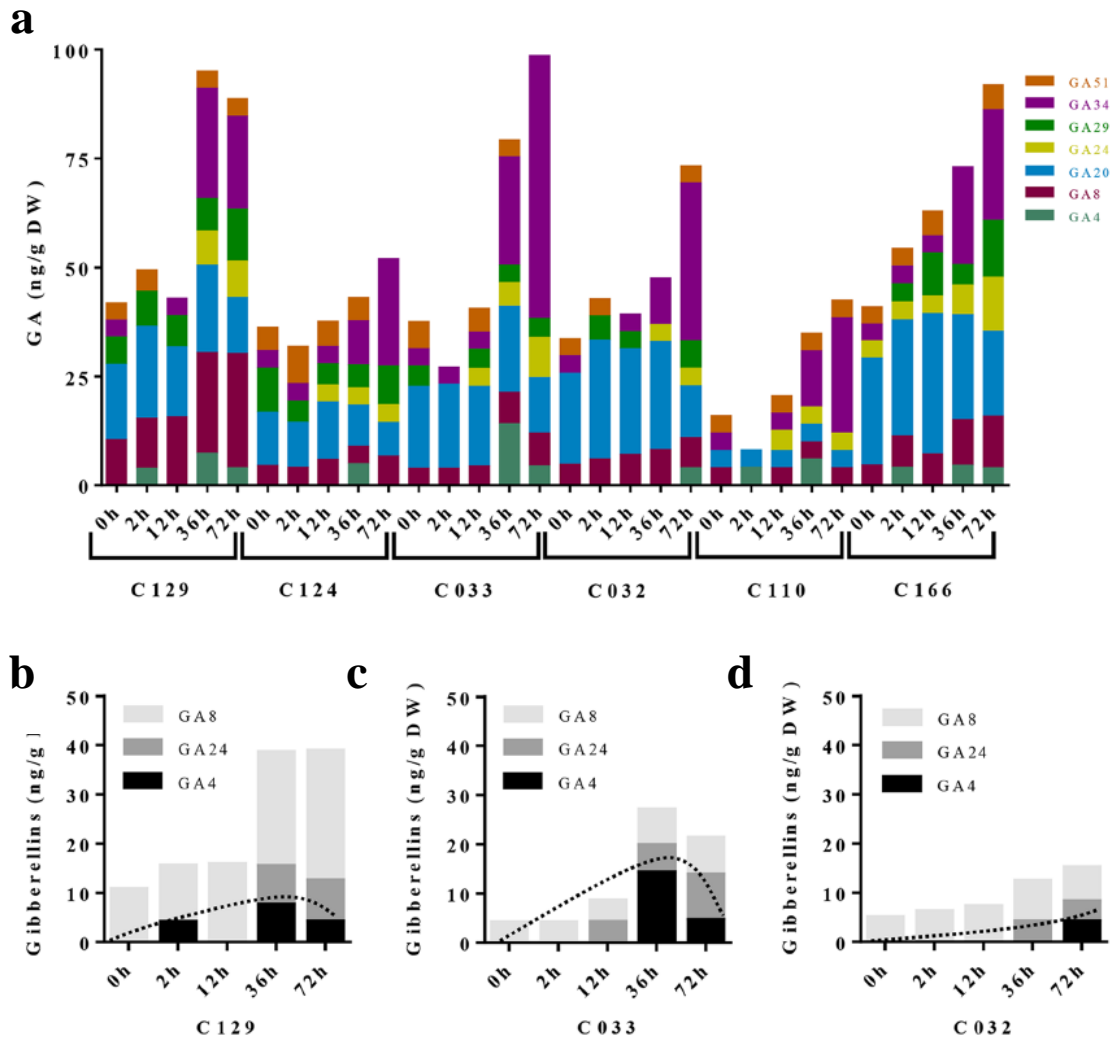


**Figura 31. El perfil de metabolitos de ABA en las variedades de invierno revela la contribución de la vía de ABA a la variabilidad en la dinámica de germinación de las semillas de *B. napus*.** (a) Los niveles de ABA disminuyen progresivamente a lo largo de la germinación en todas las variedades, pero los niveles de ABA en semillas secas no correlacionan con la capacidad germinativa. El histograma de columnas apiladas muestra la acumulación de ABA (ABA, PA, DPA, 7'-OH-ABA, neoPA y ABA-GE) durante la germinación. (b), (c) y (d) Los niveles de ABA activos (ABA + t-ABA) e inactivos (DPA, ABAGE, PA, 7'-OH-ABA y neo-PA) son más altos en C032 y C033 en comparación con C129, lo que correlaciona con sus tasas de germinación más bajas. Los histogramas de columnas apiladas muestran los patrones de acumulación relativa de metabolitos activos e inactivos de ABA en las variedades C129, C033 y C032, respectivamente. Todos los datos se obtuvieron utilizando tres réplicas biológicas (50 semillas por réplica; Boter et al., 2019).

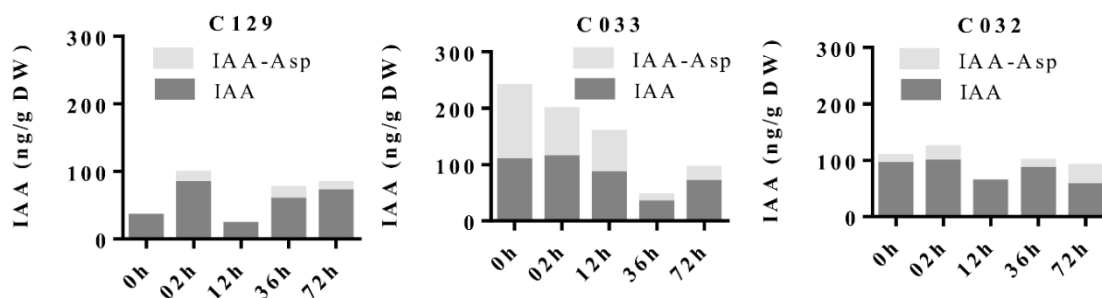
Todos estos resultados indican que los niveles de ABA no parecen ser contribuidores principales a la variabilidad observada en el proceso germinativo, aunque si pudieran estar afectando a la velocidad de germinación.

Por otra parte, cuando se cuantificaron los niveles de GAs y sus metabolitos se observó que los niveles de GAs aumentan a lo largo del proceso germinativo en todas las variedades, alcanzando un pico de acumulación a las 36-72 h, que coincide con los niveles más bajos de ABA (Figura 32a). Al examinar con detalle los niveles de GAs, observamos que la forma activa GA4 y GA24 se acumula antes en las variedades C129 y C033 (12-36 h) comparada con la variedad C032 (Figura 32b, c y d). Además, cabe destacar que GA8, un catabolito de la forma activa GA1, se acumula más en C129 que en C033 y C032. Esto sugeriría que, en colza GA1 podría jugar un papel importante como GA bioactiva junto a GA4, a diferencia de lo que ocurre en *Arabidopsis*, en el que GA4 es la principal GA bioactiva, (Ogawa et al., 2003; Nguyen et al., 2016). Dado que C129 y C033 tienen niveles más altos de GA4 y GA1, los niveles de GAs parecen determinar la germinación diferencial de las variedades de colza.

Por último, también se analizaron los niveles de acumulación de auxinas (IAA) durante la germinación. La cuantificación de los niveles de auxinas en las distintas variedades (Figura 33) no nos permite establecer una correlación significativa entre los niveles de esta hormona y el porcentaje de germinación, pero si se puede establecer una correlación con los niveles de ABA. Se ha descrito previamente que la intercomunicación entre IAA-ABA es importante en la germinación de *B. napus*, y que las auxinas pueden actuar como un potenciador del efecto del ABA (Liu et al., 2013; Thole et al., 2014; Nguyen et al., 2016). Así, los niveles de auxinas son mayores en C033 y C032 comparados con los niveles encontrados en C129 (Figura 33), sugiriendo una contribución de las auxinas en las diferencias de germinación entre variedades. Adicionalmente, la variedad C033 muestra niveles más altos del conjugado IAA-Asp, un intermediario de la degradación de auxinas (Tam et al., 2000). Todos estos resultados parecen indicar que niveles altos de IAA y ABA podrían estar afectando al rendimiento germinativo de las variedades C032 y C033, y por tanto que el balance entre auxinas y ABA contribuye a las diferencias germinativas en *B. napus*. Por último, solo se observa una acumulación significativa de citoquininas a partir de las 72 h, lo que coincide con los máximos niveles de acumulación de GAs, que explicaría la correlación positiva observada en la Figura 30 y la agrupación de estas en el PCA (Figura 34a). Sin embargo, esta acumulación tan tardía de esta hormona parece descartar un papel relevante de la misma en la regulación del proceso germinativo en este cultivo.

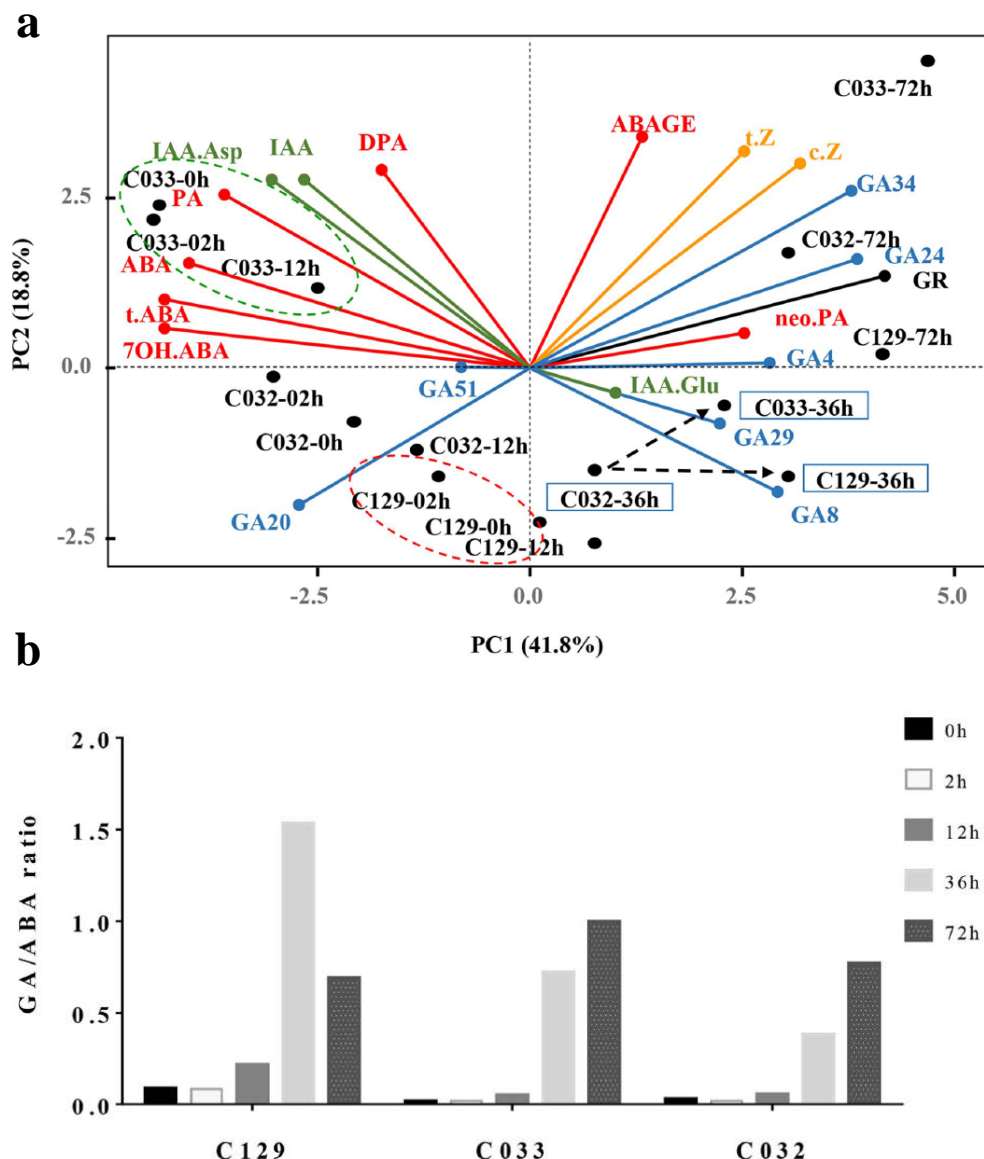


**Figura 32. El perfil de metabolitos de GAs en las variedades de invierno revela la contribución de estas hormonas a la variabilidad en la dinámica de germinación de las semillas de *B. napus*.** (a) Los niveles de todos los metabolitos de GA aumentan diferencialmente durante la germinación. Los histogramas de columnas apiladas muestran la distribución de los metabolitos de GA (GA51, GA34, GA29, GA24, GA20, GA8, GA4) en las distintas variedades durante la germinación. (b), (c) y (d) La acumulación de la giberelina activa GA4 y de GA24 se retrasa notablemente en la variedad C032 de 36 a 72 h en comparación con las variedades C129 y C033. El contenido de GA8 es mayor en la accesión C129 en comparación con C033 y C032, lo que correlaciona con su velocidad de germinación. Los histogramas de columnas apiladas muestran los patrones de acumulación relativa de GA4 (GA activo), GA24 (precursor de GA4) y GA inactivo GA8 en las variedades C129, C033 y C032, respectivamente. Las curvas discontinuas resaltan la dinámica de acumulación de GA4 (GA activo) en cada accesión. Todos los datos se obtuvieron utilizando tres réplicas biológicas (50 semillas por réplica; Boter et al., 2019).



**Figura 33.** El perfil de metabolitos de IAA en las variedades de invierno revela la contribución de estas hormonas a la variabilidad en la dinámica de germinación de las semillas de *B. napus*. Los histogramas de columnas apiladas muestran la distribución de los niveles IAA y de la forma conjugada IAA-Asp, siendo estos valores mayores en las variedades C033 y C032 que en la variedad C129. Todos los datos se obtuvieron utilizando tres réplicas biológicas (50 semillas por réplica; Boter et al., 2019).

Todos estos resultados parecen indicar que serían los balances entre las diferentes hormonas los responsables de las diferencias observadas durante germinación y no los niveles individuales de las mismas. Para demostrar esta hipótesis, realizamos un PCA con los niveles hormonales frente a las variedades a diferentes tiempos. Como se observa en la Figura 34a, el PCA no agrupó en ninguna de las dimensiones a las diferentes variedades, que se distribuyeron en todas las dimensiones del PCA, lo que sugiere que los niveles de hormonas no contribuyen significativamente a explicar las diferencias entre variedades. No obstante, las variedades C129 y C032 se agruparon en los primeros tiempos de la germinación, desde semillas seca hasta 12 h, pero se separaron tras las 36 h. Por su parte, la variedad C033 difiere ligeramente del resto debido a los niveles más altos de IAA descritos previamente. Los contribuyentes principales de la primera dimensión, que explica un 41,8 % de la variabilidad, incluyen las formas activas e inactivas del ABA (t-ABA, 7'OH-AB, PA) así como GA4, GA24 y GA34, encontrándose estas hormonas en extremos opuestos de esta dimensión. Este resultado parece sugerir que el balance entre estas dos hormonas es clave para explicar la variabilidad de la germinación. Para comprobarlo calculamos los ratios GA/ABA para las tres variedades. Como se puede observar en la Figura 30b las variedades que germinan más rápido (C129 y C033) tienen un ratio GA/ABA mayor, mientras que la variedad más lenta, C032, muestra niveles más bajos. Este efecto se puede observar también en el PCA, ya que las variedades C033 y C129 a 36 h se encuentran más alejados del centro para el eje de la primera dimensión lo que refleja un mayor nivel de GAs y menor de ABA. Esta correlación parece confirmar que el balance entre hormonas es el responsable de la variabilidad en la germinación de *B. napus*.



**Figura 34. La relación entre los niveles hormonales de ABA, GA e IAA durante el proceso de germinación contribuyen a las diferencias en los caracteres de germinación observados en las variedades de colza de invierno. (a) PCA basado en perfiles hormonales y tasas de germinación de las 3 variedades. Cada tipo de hormona se muestra en un color: ABA y metabolitos (rojo), GA y metabolitos (azul), auxinas (verde) y citoquininas (naranja). El círculo verde discontinuo indica la agrupación de C033 a tiempos tempranos (0–12 h), que correlaciona con niveles más altos de IAA-Asp. El círculo rojo discontinuo resalta el agrupamiento de C129 a tiempos tempranos (0–12 h), que correlaciona con niveles más bajos de ABA. Las flechas negras discontinuas resaltan el retraso en la acumulación de GA observado en C032 en comparación con C033 y C129. Las variedades se muestran en negro. (b) Dinámica a lo largo de la germinación del balance GA/ABA de las tres variedades estudiadas que muestra que un mayor nivel de este balance se corresponde con mejores tasas de germinación. Todos los datos se obtuvieron utilizando tres réplicas biológicas (50 semillas por réplica; Boter et al., 2019).**

#### 2.4. Las interacciones entre proteínas clave en la señalización e intercomunicación entre ABA/GAs durante la germinación se conservan en *B. napus*

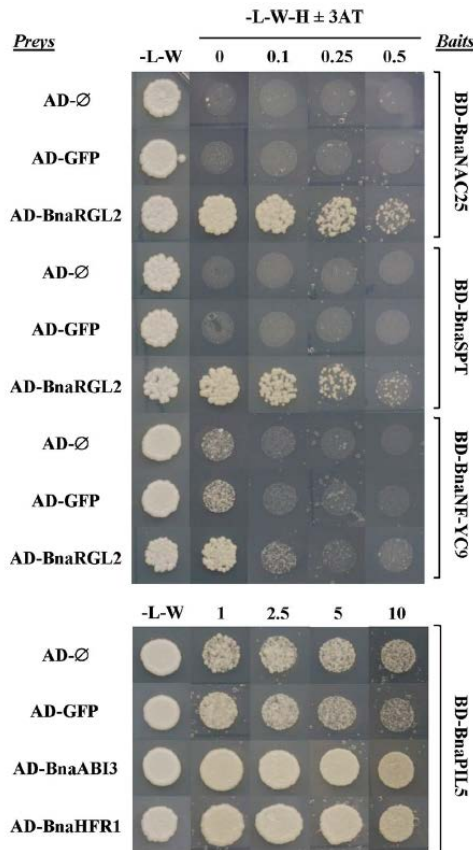
Varias proteínas han mostrado tener un papel clave en la señalización e intercomunicación entre ABA y GAs en *Arabidopsis* y otras especies vegetales. La interacción entre algunos de estos reguladores es esencial para coordinar la respuesta de estas hormonas y permitir la germinación. Entre estas interacciones destacan RGL2, la principal DELLA que controla la germinación (Piskurewicz et al., 2008), con los TFs NF-YC para así promover la transcripción de *ABI5*, un regulador negativo de la germinación (Liu et al., 2016). *PIL5*, un integrador de las señales por luz y hormonales (Oh et al., 2004, 2006, 2009), es un regulador negativo de la germinación dependiente de su interacción con otros TFs. Por ejemplo, su interacción con *ABI3* es necesaria para activar conjuntamente la expresión de *SOM* (Park et al., 2011), un inhibidor de la germinación a través de la regulación de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de ABA y GA (Dong et al., 2008). RGL2, a su vez, es capaz de secuestrar al factor de transcripción *NAC25* para impedir que este active la expresión de *CWRE* y la expansión de las células del endospermo, reprimiendo así la germinación (Sánchez-Montesino et al., 2019). También se ha descrito que *SPT*, otro regulador negativo de la germinación y de la expansión de los cotiledones que integra señales de temperatura, interacciona con RGL2 (Penfield et al., 2005; Gallego-Bartolomé et al., 2010). Por último, *HFR1*, es un regulador positivo de la germinación inducida por luz que interacciona directamente con *PIL5* para secuestrarlo y evitar su acción (Shi et al., 2013). Por ello, analizamos si las interacciones entre varias de estas proteínas reguladoras están conservadas en *B. napus* mediante el sistema Y2H.

Para comprobar si estas interacciones se establecen también en colza, primero identificamos los posibles ortólogos para cada una de las proteínas descritas arriba. En la base de datos del Genoscope (<https://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>, Francia) se introdujeron las secuencias de los genes de interés de *Arabidopsis* para que realizase una búsqueda de las secuencias más similares contra el genoma de *B. napus*. Para confirmar que los posibles ortólogos identificados son los mismos que regulan la germinación en *Arabidopsis* obtuvimos sus perfiles de expresión durante la germinación en *B. napus* a partir de los datos de transcriptómica cedidos por el Dr. Snowdon y los comparamos con los publicados para *Arabidopsis*. Como podemos observar en la Figura Suplementaria 2, las cinéticas de expresión de *BnaRGL2*, *BnaNF-YC9*, *BnaPIL5*, *BnaABI3*, *BnaNAC25*, *BnaSPT* y *BnaHFR1* son similares a las de sus ortólogos en *Arabidopsis*, sugiriendo que los posibles módulos reguladores se encuentran conservados en colza. Por otro lado, mediante análisis *in silico*, previamente habíamos observado que la *BnaEXPA2* muestra una cinética de expresión similar a la de la *AthEXPA2*, lo que sugiere que el complejo RGL2-NAC25 que regula este gen podría existir en *B. napus* (Figura Suplementaria 2).

Una vez identificados los genes de *B. napus* se utilizó el sistema de Y2H (Figura 35) para estudiar sus interacciones. Básicamente, se unió el dominio de activación de GAL4 a uno de los interactores de cada complejo a comprobar (AD-*BnaRGL2*, AD-*BnaABI3*, AD-*BnaHFR1*), mientras que los otros se fusionaron con el dominio de unión a DNA de GAL4 (BD-*BnaNAC25*, BD-*BnaNF-YC9*, BD-*BnaSPT*, BD-*BnaPIL5*). Estas

## RESULTADOS

construcciones se introdujeron en levadura y se utilizaron como cebos y presas para testar cada una de las interacciones comentadas anteriormente (Figura 35). Como se muestra en la Figura 35, todas las combinaciones testadas fueron capaces de crecer en medio selectivo y en presencia de 3-AT en contraste con los controles negativos (AD-Ø, AD-GFP) por lo que pudimos concluir que las interacciones entre los principales TFs con un papel regulador del proceso germinativo identificados en *Arabidopsis* se conservan en *B. napus*. Más aún, nuestros datos hormonales y de interacción entre proteínas parecen indicar que las principales redes reguladoras de la germinación descritas en otras especies, principalmente *Arabidopsis*, también estarían conservadas en *B. napus*.



**Figura 35. Las interacciones proteicas entre reguladores clave de la germinación de semillas se conservan en *B. napus*.** Interacciones entre los TFs de colza seleccionados en Y2H. Los cebos se generaron mediante fusiones traduccionales en N-terminal del dominio de unión a GAL4 (BD) y la CDS de los TFs seleccionados (BD-BnaNAC25, BD-BnaSPT, BD-BnaNF-YC9 y BD-BnaPIL5). Las presas se generaron mediante fusiones traduccionales en N-terminal del dominio de activación (AD) de GAL4 y los CDS de los TFs seleccionados (AD-BnaRGL2, AD-BnaABI3 y AD-BnaHFR1). Como control negativo se utilizó el GAL4-AD vacío y el GAL4-AD fusionado a GFP. Las levaduras haploides que contenían los cebos se cruzaron con cepas que contenían las presas, en las combinaciones indicadas en la figura, para obtener células diploides. Estos diploides se cultivaron en placas (-L-W) y se cribaron en placas (-L-W-H) con concentraciones crecientes de 3AT. Las células que contenían combinaciones de cebos y presas capaces de interactuar pudieron crecer en placas de cribado a concentraciones de 3-AT que bloquearon el crecimiento de los controles negativos (Boter et al., 2019).

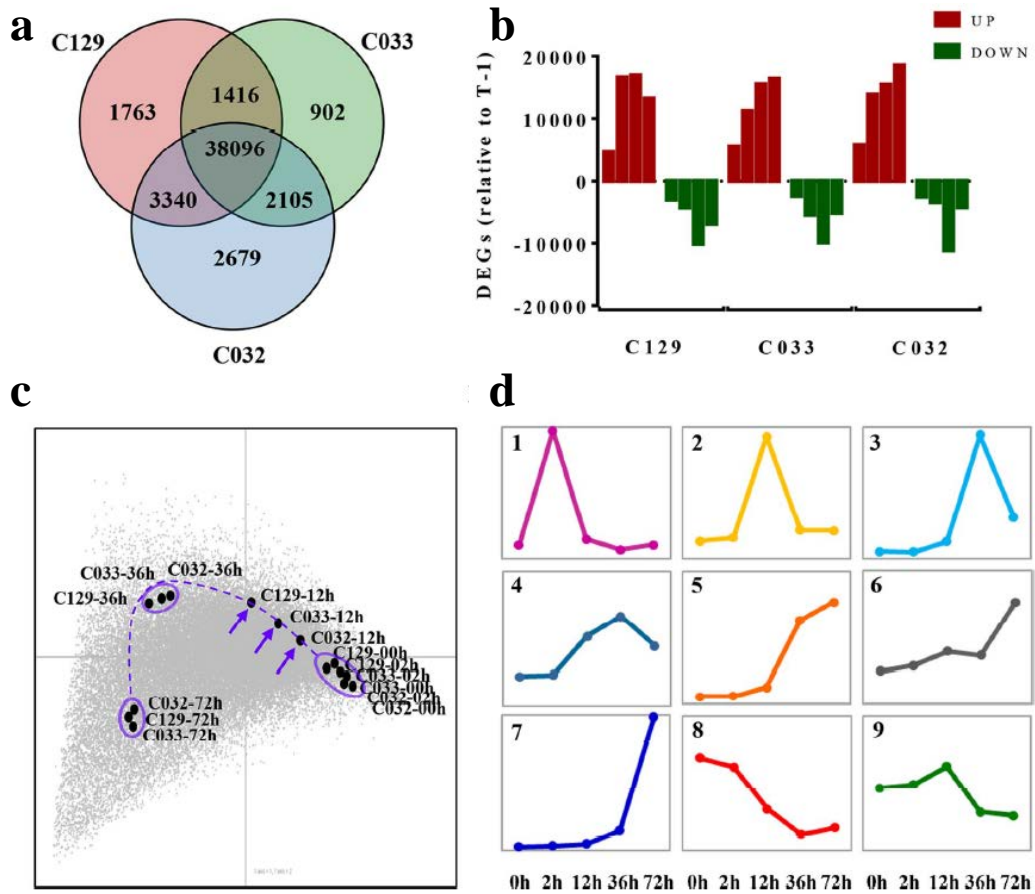
## 2.5. Los principales cambios transcriptómicos se producen en las primeras horas del proceso germinativo

La germinación es un proceso complejo regulado por la interacción de factores a nivel genético, fisiológico, metabólico y hormonal (Bentsink and Koornneef, 2008; Holdsworth et al., 2008b). Para entender las bases genéticas de este proceso decidimos utilizar los datos transcriptómicos a distintos estadios del proceso germinativo de las tres variedades de invierno seleccionadas (C129, C033 y C032) obtenidos en el laboratorio del Dr. Snowdon (Universidad de Giessen, Alemania). Dichos datos (Tabla suplementaria 5) se utilizaron para llevar a cabo análisis comparativos de los perfiles transcriptómicos entre variedades. Con estos análisis pretendemos no solo definir los principales cambios transcriptómicos que tienen lugar durante el proceso germinativo, sino también identificar los genes claves que puedan explicar las diferencias observadas entre variedades. Ya que los tiempos analizados en estos estudios transcripcionales coinciden con los utilizados en los análisis metabólicos y hormonales, nuestro objetivo es poder generar un marco de trabajo integral que incluya los principales procesos que regulan la germinación en *B. napus*.

Los datos transcriptómicos correspondientes al análisis de RNASeq de las tres variedades a 4 tiempos (2, 12, 36 y 72 h) y semilla seca se compararon utilizando el paquete DESeq2 de R. Este análisis bioinformático nos permitió detectar la expresión de 74.019 genes (73,25 % del total de genes de *B. napus*). De estos genes, identificamos 44.615, 46.220 y 42.516 genes diferencialmente expresados (DEGs) en C129, C032 y C033, respectivamente (DEGs,  $-1 > \log_2FC > 1$ ) (Figura 36a). Estos resultados indican que más del 60 % de los genes detectados cambian su expresión a lo largo del proceso de germinación. Además, al comparar los DEGs entre variedades vemos que hasta un 89 % de los mismos se comparten entre 2 o 3 de las variedades (Figura 36a), lo que sugiere que esta reprogramación transcripcional durante la germinación es común a todas las variedades. Cuando realizamos la comparación de los DEGs entre los distintos tiempos (Figura 36b), se observa que en esta ruta transcripcional tan conservada en todas las variedades predominan los genes sobreexpresados sobre los reprimidos, alcanzando el máximo número de genes sobreexpresados entre las 12 y las 36 h en la variedad C129 y a las 72 h en las variedades C032 y C033, mientras que el máximo de genes reprimidos se observa a las 36 h en todas las variedades. Estos resultados indican que la regulación de la germinación se debe principalmente a un gran evento de activación transcripcional de genes y que, posiblemente, las diferencias observadas entre variedades se deban a una activación temprana de algunos grupos específicos de genes. Para probar esta hipótesis, realizamos un análisis de correspondencia entre los DEGs y las variedades de colza a lo largo de la germinación. Cuando proyectamos los resultados de este análisis en un gráfico, observamos que los cambios transcripcionales son similares entre variedades, y que las muestras tienden a agruparse en cada punto de tiempo debido a la similitud de sus perfiles de expresión (Figura 36c). No obstante, a las 12 h se detectaron diferencias transcriptómicas significativas entre las diferentes variedades. En ese momento, las variedades no se agrupan si no que se distribuyen en el gráfico de acuerdo con su velocidad de germinación. Así, la variedad C129 es la más adelantada en la cinética transcripcional (línea púrpura de la Figura 36c), y C032 es la más retrasada, siendo su patrón de expresión a las 12 h más similar al observado en el tiempo anterior (2 h). De

## RESULTADOS

acuerdo con estos resultados, las diferencias transcripcionales de genes claves a tiempos tempranos (12 h) podría ser la causa en las diferencias en la velocidad de germinación observada entre las variedades de colza.

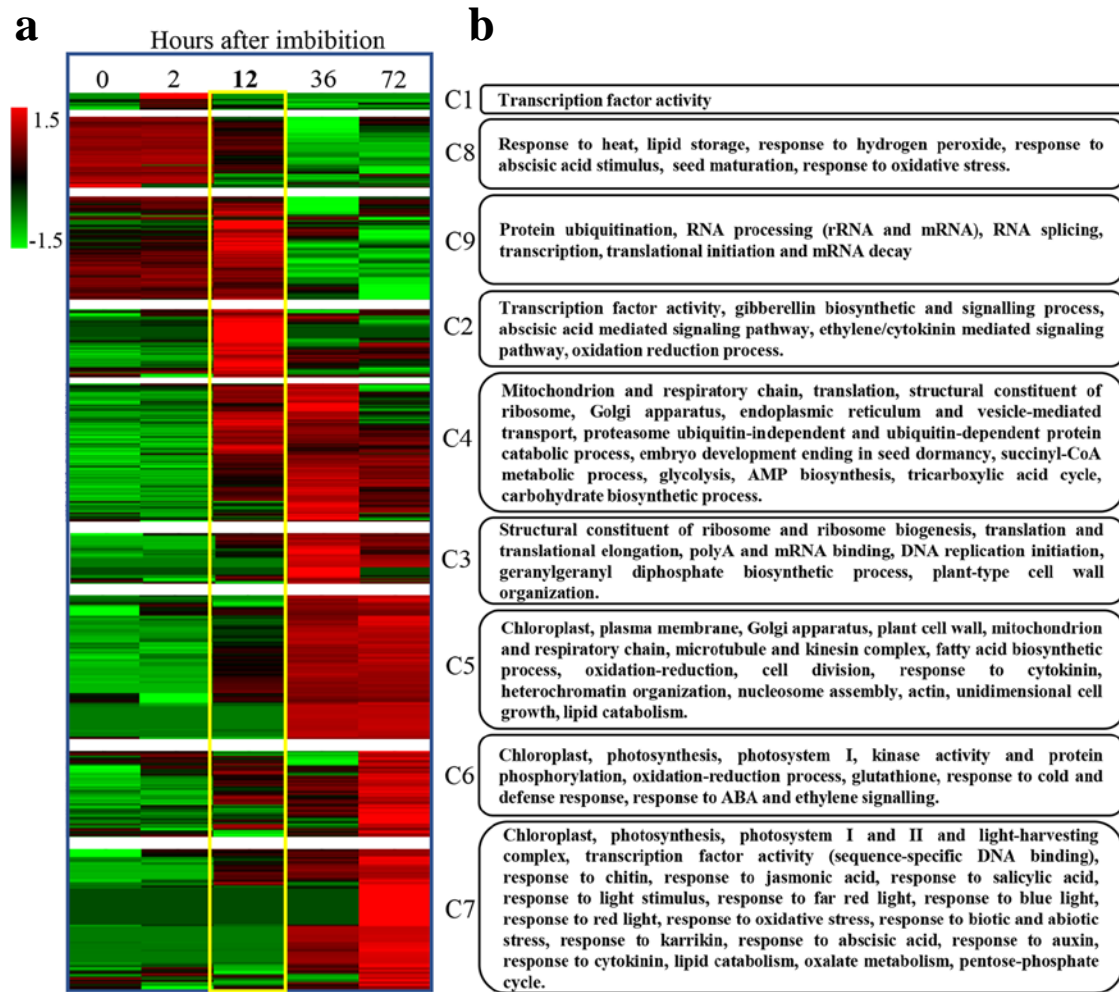


**Figura 36.** La germinación de las variedades de invierno de *B. napus* viene definida por la expresión diferencial de genes y su dinámica transcripcional (a) La comparación de genes expresados diferencialmente (DEGs) en variedades de colza con diferentes cinéticas de germinación mostró una regulación transcripcional común. Diagrama de Venn de genes expresados diferencialmente durante la germinación de semillas de las variedades C129, C032 y C033 de 0 a 72 hai. Comparamos cada punto de tiempo con semilla seca y también con su punto de tiempo anterior y seleccionamos aquellos genes que mostraron un  $-1 > \log_2 FC > 1$  en al menos una de las comparaciones. (b) La comparación de genes inducidos (en rojo) y reprimidos (en verde) entre tiempos sucesivos muestra que existen diferencias en el tiempo de activación del transcriptoma. La gráfica representa el número de DEGs promovidos o reprimidos entre puntos de tiempo sucesivos durante la germinación en variedades de invierno. T-1 representa el punto de tiempo anterior. (c) Análisis de correspondencia entre DEGs y las variedades durante la germinación. La dinámica de los cambios transcripcionales, asociada con la germinación muestra claras diferencias en el estado transcripcional de cada variedad a las 12 h. La nube de puntos grises representa los DEGs ( $-1 > \log_2 FC > 1$ ), a lo largo de la cual se distribuyen las diferentes muestras dependiendo de la cercanía a los genes expresados diferencialmente en ese tiempo.

Así, las muestras que tengan un perfil transcriptómico similar se encontrarán más cerca entre sí. La línea púrpura discontinua marca de derecha a izquierda una trayectoria imaginaria que representa la dinámica de los cambios transcripcionales. Las flechas púrpuras indican el tiempo de germinación en el cual se dan las mayores diferencias entre muestras. **(d)** Agrupación de K-means de genes expresados diferencialmente durante la germinación de la variedad C129, La agrupación de los diferentes patrones de expresión génica define una ola de activación transcripcional antecedida de una represión temprana durante la germinación de *B. napus*. Usamos el algoritmo Fuzzy K-means con índice de disimilitud de coseno ( $1 - \text{coseno de la similitud}$ ), número de iteraciones 10, coeficiente de fuzziness de 1 y método aleatorio de inicialización. Los gráficos muestran cada uno de los nueve grupos obtenidos (paneles 1 a 9). Así, cada uno muestra una dinámica de expresión génica particular representado por la línea de color. El eje x representa el tiempo tras la imbibición (2, 12, 36 y 72 h). Se usaron *pool*es de 30 semillas con tres réplicas biológicas para cada punto de tiempo (Boter et al., 2019).

Así, para encontrar estos genes claves y obtener las dinámicas de expresión asociadas a la germinación de colza, centramos los análisis de expresión en la variedad C129, que mostraba la mayor velocidad de germinación. El primer paso fue agrupar los DEGs dependiendo de su perfil transcripcional mediante un agrupamiento de K-means de los datos de expresión normalizados, que nos permitió identificar 9 grupos asociados a patrones de expresión diferentes (Figura 36d). Los grupos 1, 2 y 3 contienen aquellos genes cuya expresión ocurre a las 2, 12 o 36 horas respectivamente. Los grupos 4, 5 y 6 están compuestos por genes cuya expresión se induce a lo largo del proceso de germinación. El grupo 7, por su parte, se compone de genes con una alta inducción a las 72 h. Finalmente, los grupos 8 y 9 se corresponden con los transcritos reprimidos durante la imbibición (2 h) o más adelante (12 h), respectivamente. El hecho de que 7 de los 9 grupos representen eventos de inducción génica coincide con las observaciones previamente realizadas que apuntan a la activación transcripcional como un proceso de regulación importante durante la germinación (Figura 36b).

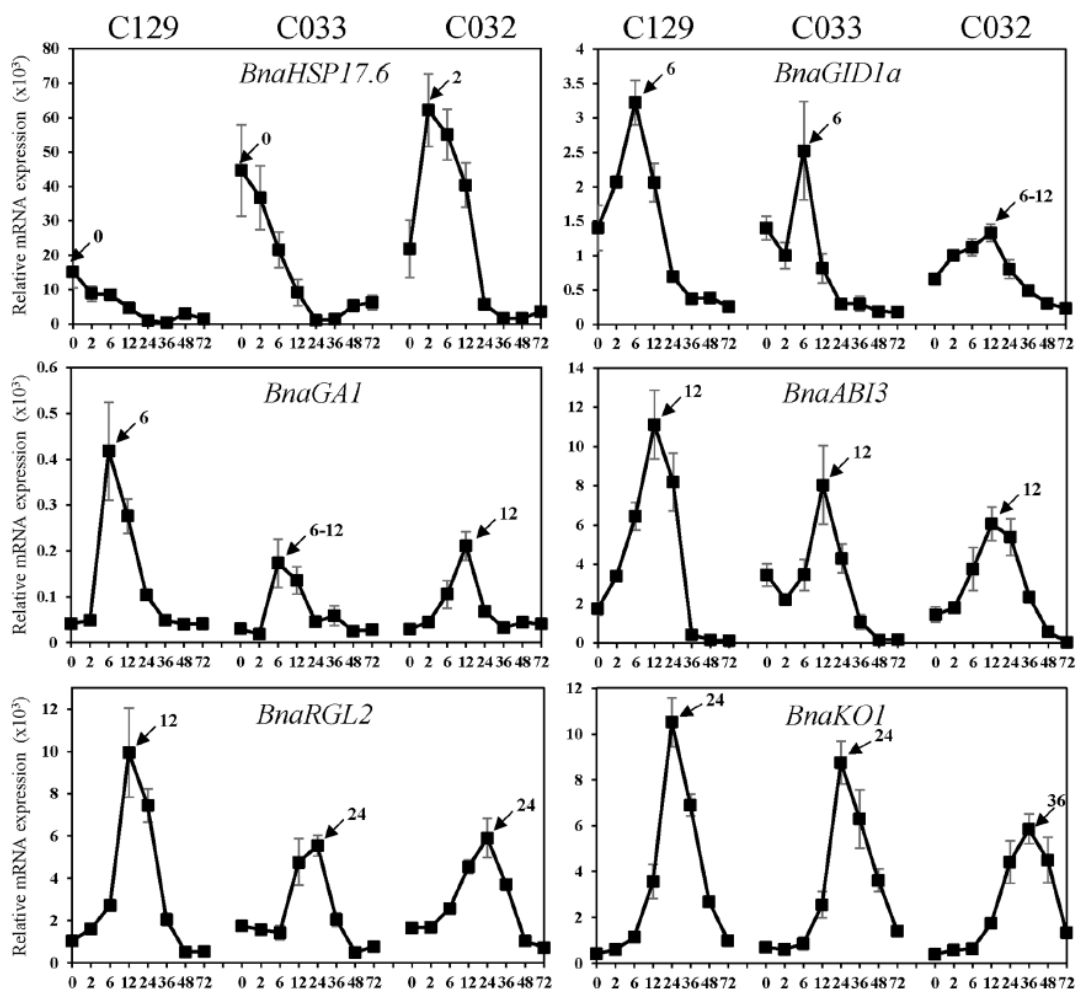
Tras identificar los diferentes tipos de patrones de expresión durante la germinación de colza, realizamos un agrupamiento jerárquico en cada uno de los nueve grupos. Posteriormente, representamos los mapas de intensidad transcripcional generados tras este análisis en un orden cronológico basado en sus patrones de expresión. De tal manera, en la Figura 37a se representa los procesos de activación génica divididos en los 9 grupos. Este análisis de los datos transcriptómicos identifica a las 12 h como el tiempo clave para el cambio en la dinámica de transcripción durante la germinación, no detectándose ninguna alteración transcripcional significativa previa, a excepción de los grupos de represión génica 8 y 9.



**Figura 37. La expresión génica progresiva y la categorización funcional de genes describen un marco transcriptómico para la germinación de semillas en *B. napus*.** (a) Agrupación jerárquica de DEGs categorizados previamente con k-means de la variedad C129 y representación cronológica de los mapas de expresión correspondientes. Los valores de expresión en TPM de los genes incluidos se normalizaron y se transformaron logarítmicamente, por separado. Luego, se realizó un agrupamiento jerárquico utilizando la correlación de Pearson para cada grupo (grupos 1–9). La escala de degradado de verde a rojo representa unidades de expresión relativas para la represión o inducción génica, respectivamente. (b) Enriquecimiento funcional para los genes de *B. napus* incluidos en cada uno de los clusters anteriores. El mapa de expresión representa el número de categorías funcionales significativas (categorías GO) para cada grupo obtenido por SEACOMPARE de AgriGO v1.2 (Du et al., 2010) utilizando los GO de *B. napus* y el valor p correspondiente obtenido con la herramienta de predicción SeqEnrich (Becker et al., 2017). El mapa de expresión de la izquierda es una representación esquemática del número de GO con un valor  $p < 0,001$ . A la derecha, se presenta un resumen de algunas de las funciones más representativas incluidas en cada grupo (Boter et al., 2019).

Para profundizar en los cambios que ocurren a tiempos tempranos de germinación e identificar los procesos biológicos que subyacen a los mismos, llevamos a cabo un análisis de ontología génica de los grupos 8 y 9 (Figura 37b). En este análisis vimos que el grupo 8 se encuentra compuesto principalmente por genes involucrados en el estrés por temperatura y el estrés oxidativo, así como genes relacionados con la dormición de semilla, la respuesta a ABA y el almacenamiento de lípidos. También encontramos homólogos de la DNA ligasa VI de *Arabidopsis*, involucrada en la reparación de las roturas de cadenas dobles o simples, como la *LIG6* (Waterworth et al., 2016), así como homólogos de la L-isoaspartil-O-transferasa, *PIMT*, (Ogé et al., 2008) que se encarga de la reparación de proteínas (Rueda-Romero et al., 2012), y chaperonas como la *BnaHSP17.6* o la *BnaHSP22* (Figura Suplementaria 3). Que estos genes se encuentren altamente expresados en la semilla seca o en semillas recién embebidas concuerda con la necesidad de la presencia de mecanismos de reparación durante el proceso de maduración de la semilla. Así durante este proceso de maduración, el embrión sufre un proceso extremo de desecación en el que se debe garantizar la integridad de las membranas, proteínas y ácidos nucleicos necesarios para el mantenimiento de la viabilidad de la semilla. Curiosamente, un análisis más detallado de la cinética de *BnaHSP17.6* mediante RT-qPCR, mostró que la expresión de este gen variaba entre las 3 variedades estudiadas y que correlacionaba con las diferentes cinéticas de germinación (Figura 38). Finalmente, muchos de los genes que se inducen a través de la señalización por ABA durante la maduración de la semilla y en semillas durmientes están presentes en el grupo 8. Entre ellos se encuentra *ABAI* (Figura suplementaria 3), que cataliza el primer paso en la biosíntesis del ABA, y cuyos mutantes de pérdida de función muestran un aumento en la tasa de germinación (Koornneef et al., 1982; Barrero et al., 2005); *NCED6*, involucrado en la biosíntesis de ABA (Lefebvre et al., 2006); *ABI5* (Figura suplementaria 3), un represor de la germinación capaz de reactivar programas embriogénicos tardíos (Lopez-Molina et al., 2002); y *NF-YC9*, que participa en la señalización del ABA favoreciendo la transcripción de *ABI5* (Liu et al., 2016). Por otro lado, durante la maduración de la semilla, el ABA se acumula con el fin de inhibir aquellos mecanismos que de otra manera serían capaces de activar la germinación de las semillas en desarrollo (viviparidad). Consecuentemente, el grupo 8 parece corresponder con la represión de los genes de biosíntesis y señalización de ABA, los cuales reducen sus niveles durante la germinación para mitigar la inhibición que ejercen del proceso germinativo (Figura 31). Por último, cabe destacar la presencia de genes de la familia de las oleasinas que representan la acumulación de aceites en la semilla durante su maduración. Por lo tanto, el grupo 8 reúne a todos aquellos genes relacionados con procesos de desecación y la dormición que una vez comenzada la germinación son reprimidos para favorecerla.

## RESULTADOS



**Figura 38. Cuantificación de los niveles de expresión de distintos de genes presentes en los clusters de patrones de expresión génica por RT-qPCR.** El RNA se aisló de semillas secas (t = 0) y de semillas a diferentes tiempos tras la imbibición: 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h de las variedades C129, C033 y C032. Los niveles de expresión de los genes se determinaron mediante RT-qPCR, y los niveles de expresión relativos se obtuvieron mediante la normalización con respecto a los niveles de expresión del rRNA Bna18S (ENSRNA049478716-T1). Se muestran los promedios y errores estándar de tres réplicas biológicas. Se usaron tres réplicas biológicas para cada punto de tiempo y accesión (Boter et al., 2019).

El grupo 9 reúne a todos aquellos genes cuya acumulación en semillas secas es alta, pero a diferencia de lo que ocurre con el grupo 8, su expresión sigue aumentando hasta las 12 h, y disminuye a partir de las 36 h coincidiendo con el paso de germinación al establecimiento de plántula. En este grupo se pueden encontrar genes relacionados con el procesamiento de RNAs, iniciación y elongación de la traslación, transcripción, procesamiento y decaimiento de mRNA y modificación (principalmente mono y poliubiquitinación, y defosforilación) y degradación de proteínas. En este grupo encontramos genes involucrados en estos procesos como son *AHG1* (*ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION 1*, Figura suplementaria 3), *DCAF* (*DDB1-CULA*

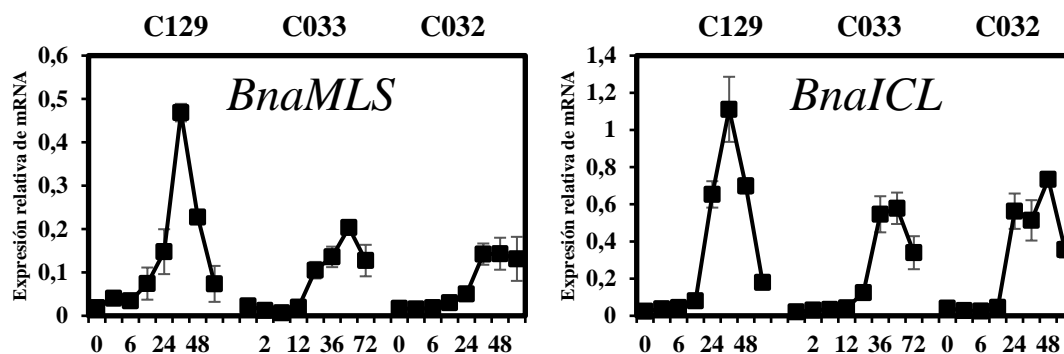
*ASSOCIATED FACTOR 1*), *HUB1* (*HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1*), *PRT6* (*PROTEOLYSIS 6*) y *ATE2* (*ARGININE-TRNA PROTEIN TRANSFERASE 2*), que además son capaces de disminuir la sensibilidad a ABA (Liu et al., 2007; Nishimura et al., 2007; Holman et al., 2009; Seo et al., 2014). Además, el grupo 9 incluye helicasas DEAD-box y factores de iniciación y elongación de la traducción como eIF4E y eIF4G, (Lellis et al., 2010; Dinkova et al., 2011) que se encargarían de la traducción de los mRNAs almacenados en la semilla y que podrían promover el proceso germinativo (Sajeev et al., 2019). También se encuentran genes relacionados con el decaimiento y eliminación del capuchón de los mRNAs como *DCPI* (*DECAPPING 1*) (Basbouss-Serhal et al., 2017). Estos últimos podrían favorecer el proceso de activación de la germinación en las primeras horas de la imbibición mediante la eliminación de mRNAs relacionados con la dormición (Basbouss-Serhal et al., 2017). Por otro lado, cabe destacar la presencia en este grupo de *GID1a*, uno de los receptores principales de GA que activa la ruta de señalización de esta hormona (Hauvermale et al., 2015). Su presencia en este grupo podría traducirse en el aumento de los niveles de este receptor que incrementaría la sensibilidad a GAs coincidiendo con la disminución de la sensibilidad a ABA promoviendo, así, la germinación. Por ello decidimos analizar en detalle los niveles de los transcritos de este gen en nuestras tres variedades. Como se puede observar en la Figura 37, la cinética de *BnaGID1a* difiere significativamente entre las tres variedades siendo la variedad C129 la única variedad en la que hay una inducción clara de este gen tras la imbibición (6 h) para disminuir posteriormente. En las otras dos variedades, el incremento en el número de transcritos fue más tardío y no tan abundante como en el observado en C129, siendo C032 el que muestra el pico de expresión más tardío. Estos resultados sugieren que la variedad C129 podría ser más sensible a la señalización por GAs, lo que podría explicar por qué esta variedad germina más rápido que el resto. Por último, se observó que *PIL5*, un regulador negativo de la germinación (Oh et al., 2004) también se encuentra incluido en este grupo lo que sugiere que la reducción de su expresión a partir de las 12 h podría participar en promover el proceso de germinación (Figura suplementaria 3).

En el resto de grupos, se encuadran todos aquellos procesos de activación transcripcional que ocurren durante la germinación. Así, el grupo 2 se compone de aquellos genes cuya expresión se activa a las 12 h y que corresponde con genes encargados de la señalización y metabolismo de GAs o con genes que participan en la señalización y degradación del ABA. Estos perfiles transcripcionales correlacionan con los resultados obtenidos previamente en el análisis de los perfiles hormonales (Figura 34). Por tanto, una bajada en el balance de ABA/GAs durante la germinación se encontraría precedido por un reajuste transcripcional de los genes encargados del metabolismo y la señalización de estas dos hormonas (12 h). Entre estos genes, analizamos en profundidad los perfiles de expresión de los genes *GAI*, *RGL2* y *ABI3* mediante RT-qPCR. Dado que los tiempos analizados y las muestras utilizadas son diferentes entre el RNA-seq y las de RT-qPCR, los patrones cinéticos no son exactamente los mismos. Nuestra serie temporal es más completa que la del RNA-seq, lo que permitió establecer unos patrones de expresión más precisos. *GAI* es la enzima encargada del primer paso de la biosíntesis de GAs y así las semillas de mutantes *gal* son incapaces de germinar sin la aplicación exógena de esta hormona (Sun and Kamiya, 1994; Ogawa et al., 2003). Cuando analizamos la expresión de este gen en nuestras variedades de colza (Figura 38),

## RESULTADOS

observamos que el pico de máxima expresión de *BnaGAI* es más tardío en la variedad que germina más lento, la variedad C032, lo que sugiere que una germinación más rápida necesitaría de una activación temprana de la biosíntesis de GAs. Por otro lado, *RGL2* y *ABI3* son dos de los principales reguladores negativos de la germinación, y son capaces de responder rápidamente a cambios en los ratios de ABA/GAs (Piskurewicz et al., 2009). Nuestros análisis de RT-qPCR para *BnaRGL2* indican que, tras un incremento inicial de su expresión, como también se ha descrito para su ortólogo en *Arabidopsis* (Piskurewicz et al., 2008), sus niveles de mRNA disminuyen rápidamente. Observamos que en nuestras variedades dicha cinética se manifiesta antes (12 h) en la variedad C129 lo que correspondería con una activación más temprana de la germinación en esta variedad. Por su parte, *BnaABI3* muestra un pico de expresión similar en todas las variedades a las 12 h (Figura 38) lo que parece indicar que este gen no tendría un papel tan destacado en el control de la germinación en *B. napus* como *BnaRGL2*.

Los grupos 3 y 4 incluyen aquellos genes cuya activación transcripcional se produce de manera gradual o transitoria a las 36 h. En el grupo 4 podemos encontrar genes que codifican para componentes de diferentes orgánulos, como la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y las vesículas de transporte; así como genes encargados de la respiración celular, la traducción o los ribosomas. También se pueden encontrar genes que codifican para enzimas clave en la beta-oxidación de ácidos grasos y en el ciclo del glioxilato como la *MLS* (MALATE SYNTHASE) y la *ICL* (ISOCITRATE LYASE) (Figura 35, Comai et al., 1989), en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como la *ACO3* (ACONITASE3) y la *CSY3* (CITRATE SYNTHASE) (Pracharoenwattana et al., 2005; Hooks et al., 2014), y la biosíntesis de carbohidratos y la glicólisis, como la *HXK1* (HEXOKINASE 1) (Aguilera-Alvarado et al., 2019). El pico de expresión tanto de *BnaMLS*, *BnaICL* como de *BnaHXK1* se da de manera anticipada en la variedad C129 con respecto a las variedades C033 y C032 (Figura 39 y Figura suplementaria 3). Este resultado sugiere que las principales vías metabólicas empiezan a ser funcionales a partir de las 36 h, movilizandando las reservas de las semillas para suministrar la energía necesaria al embrión durante el proceso de germinación y el establecimiento de la plántula. El grupo 3 reúne genes relacionados con los componentes y la biogénesis de ribosomas, así como de unión a mRNA y procesos de traducción. Esto sugiere que, una vez activado el proceso de germinación, se aumenta la transcripción de mRNA y la síntesis de proteínas. En este grupo también encontramos genes de la biosíntesis y de respuesta a GAs muy relevantes, como la ent-kaureno sintasa (*KOI*), requerida para la biosíntesis de GAs (Nambara et al., 1991; Rademacher, 2020), o como la *CPI*, la *EXPA2* y la *EXPA8* (Figura suplementaria 3; Ogawa et al., 2003; Rombolá-Caldentey et al., 2014; Sánchez-Montesino et al., 2019). Dado que *KOI* es un marcador muy útil para estimar los niveles de GAs *in planta*, decidimos analizar mediante RT-qPCR los niveles de este gen en nuestras tres variedades. Así observamos que los niveles de expresión de este gen empiezan a aumentar a partir de las 12 h y alcanzan un nivel máximo a las 24 h en la variedad C129 y C033, pero a las 36 h en la variedad C032 (Figura 37). Este patrón coincide con las cinéticas de germinación que observamos en estas tres variedades (Figura 23), así como con los niveles de acumulación de la GA bioactiva GA4 (Figura 32). La reducción rápida de transcritos tras el pico de expresión máxima parece indicar que, de forma similar a lo que se ocurre en *Arabidopsis*, la expresión de este gen se encuentra regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa.



**Figura 39. Cuantificación por RT-qPCR de los patrones de expresión de los genes *BnaMLS* y *BnaICL*.** El RNA se aisló de semillas secas ( $t = 0$ ) y de semillas a diferentes tiempos tras la imbibición: 2, 6, 12, 24, 36, 48, 72 h de las variedades C129, C033 y C032. Los niveles de expresión de los genes se determinaron mediante RT-qPCR, y los niveles de expresión relativos se obtuvieron mediante la normalización con respecto a los niveles de expresión del rRNA Bna18S (ENSRNA049478716-T1). Se muestran los promedios y errores estándar de tres réplicas biológicas. Se usaron tres réplicas biológicas para cada punto de tiempo y accesión.

El grupo 5 que reúne aquellos genes cuya expresión se induce a las 36 h y sus niveles se mantienen hasta las 72 h, destacan genes relacionados con la organización y síntesis de la pared celular, como *XTH9* (*XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 9*) (Figura suplementaria 3; Shin et al., 2006; Sánchez-Montesino et al., 2019), la biosíntesis de ácidos grasos, como *FDH/KCS10* (*FIDDLEHEAD*) (Figura suplementaria 3; Yephremov et al., 1999; Rombolá-Caldentey et al., 2014), y la organización de la heterocromatina y el ensamblaje del nucleosoma, principalmente genes relacionados con histona 2. Además, en este *cluster* encontramos un enriquecimiento en genes relacionados con la división y el ciclo celular, la síntesis de microtúbulos y la citocinesis. Por ejemplo, *TCPI4* (*TEOSINTE BRANCHED, CYCLOIDEA AND PCF 14*), un factor de transcripción que regula la germinación mediante su papel en la ruta de acción de giberelinas y en la expresión de las ciclinas, se encuentra en este grupo (Figura suplementaria 3; Tatematsu et al., 2008; Resentini et al., 2015). En ese contexto, se ha descrito anteriormente que una vez que la semilla ha madurado y se ha secado, el proceso de división celular se mantiene silenciado incluso en los primeros momentos de la germinación, y no se reactiva hasta que no se produce la elongación de la radícula necesaria para el establecimiento de la plántula (Vázquez-Ramos and Sánchez, 2003; Barrôco et al., 2005). Por lo tanto, el hecho de que los genes relacionados con el ciclo y la división celular, así como aquellos relacionados con la remodelación de la pared celular se encuentren en este grupo parece sugerir que el paso de la germinación al establecimiento de plántula se produce alrededor de las 36 h tras la imbibición de las semillas y coincidente con el máximo de expresión de este grupo.

Por último, los grupos 6 y 7 incluyen los genes que presentan un pico de expresión a las 72 h, aunque con dinámicas distintas, activándose el grupo 7 de forma muy rápida a este tiempo. En ambos grupos podemos encontrar genes relacionados con la fotosíntesis,

## RESULTADOS

como genes de los fotosistemas I y II, genes relacionados con la respuesta a procesos de estrés biótico y abiótico, así como genes relacionados con la percepción de la luz y señalización hormonal, principalmente ABA, auxinas, etileno y citoquininas. Todos estos resultados sugieren que alrededor de las 72 h las plántulas empiezan el proceso de programación fotosintético completando finalmente el proceso de germinación para dar lugar a una plántula autosuficiente.

En resumen, todos estos resultados nos han permitido definir a nivel transcripcional los cambios que sufren las semillas de *B. napus* durante el proceso de germinación. De forma simplificada, estos cambios comenzarían con un silenciamiento de aquellos genes relacionados con la maduración de la semilla y la dormición, seguido de la activación de la maquinaria necesaria para la progresión del proceso germinativo y subsecuente activación de aquellos procesos relacionados con el establecimiento de la plántula adulta. Los genes asociados a estos procesos podrían ser utilizados como marcadores genéticos del proceso de germinación en esta especie, así como posibles dianas para la mejora del rendimiento germinativo en estos cultivos.

# DISCUSIÓN

---



#### **4. La velocidad de germinación es un carácter clave en la variabilidad de la germinación de *B. napus***

La germinación es uno de los principales componentes del vigor de la semilla, estando relacionado directamente con la supervivencia de la planta y la productividad de los cultivos. El análisis de distintos caracteres germinativos en un panel de seis variedades de *B. napus* con diferencias en el proceso de la germinación nos ha ayudado a determinar que la velocidad de este proceso es la causante mayoritaria de la variabilidad observada entre estas variedades.

Así, aunque las seis variedades sean similares entre sí en términos de viabilidad, entendida como el potencial germinativo de la semilla o el porcentaje de germinación final, obtuvimos diferencias en los valores de T50 que alcanzaban hasta las 15 h entre la variedad más rápida (C129) y la más lenta (C032, Figura 23). De igual manera se observó que la diferencia en el porcentaje de germinación a tiempo medio del experimento (GR36) era de un 30 % entre estas dos variedades lo que de nuevo indicaba que la velocidad de este proceso es la causante mayoritaria de la variabilidad observada. Aunque la viabilidad de la semilla es un aspecto clave del que depende el establecimiento y la supervivencia de las plántulas, nuestros resultados apuntan a que en *B. napus* una alta viabilidad no correlaciona necesariamente con una velocidad de germinación mayor (Figura 25). Además, nuestros resultados han mostrado que la germinación de *B. napus* ocurre de manera más veloz que en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, lo que concuerda con estudios previos en estas especies (Li et al., 2005; Hatzig et al., 2015; Kubala et al., 2015; Wang et al., 2016b; Gu et al., 2019; Luo et al., 2019). Esta aceleración de la germinación podría reflejar la presión selectiva realizada por la agricultura en este cultivo para disminuir el tiempo de establecimiento de la plántula, aumentando así los índices de supervivencia y rendimiento frente a condiciones ambientales cambiantes y potencialmente desfavorables. Por tanto, es un carácter que podría ayudar a estimar la capacidad de este cultivo para establecerse en condiciones adversas. En la actualidad, los agricultores necesitan semillas vigorosas que aseguren que sus cultivos puedan establecerse y desarrollarse sin problemas bajo condiciones climáticas que serán poco favorables (Finch-Savage and Bassel, 2016).

## 5. La reactivación del metabolismo en *B. napus* es similar a otras especies, regulando el proceso de germinación.

La formación de reservas durante la maduración de la semilla y su posterior movilización durante la germinación es clave para suministrar al embrión la energía y materia prima necesaria para apoyar el crecimiento de la plántula (Weitbrecht et al., 2011; Nonogaki, 2014; Paszkiewicz et al., 2017). Los datos obtenidos tras los análisis metabolómicos a lo largo del proceso de germinación de *B. napus* concuerdan con lo observado en otras especies, donde al comienzo de la germinación se acumulan compuestos relacionados con el metabolismo de la pared celular (mio-inositol y galactinol; Howell et al., 2009; Gu et al., 2016). Posteriormente, en los últimos momentos de la germinación, se produce una acumulación de azúcares simples (fructosa, glucosa y maltosa) y de carbohidratos relacionados con la reactivación del metabolismo (rafinosa, sorbitol y xilosa, Figura 26). Los perfiles metabólicos observados en colza indicarían la necesidad de reactivar el metabolismo para obtener la energía necesaria para llevar a cabo la germinación.

Durante la germinación, los lípidos almacenados en formas de triacilglicerol se convierten en sacarosa para ser usada como fuente de energía (Penfield et al., 2004). En nuestros análisis hemos podido observar que los niveles de sacarosa se elevan en los primeros momentos, para más adelante decaer coincidiendo con la acumulación de la glucosa y la fructosa. Así, los lípidos suponen una manera eficiente de acumular los esqueletos de carbono necesarios para la obtención de energía mediante la maquinaria metabólica (la glicólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y el transporte mitocondrial de electrones) a partir de los azúcares producidos por el ciclo del glioxilato. El malato, un metabolito importante que da lugar al oxalacetato y está implicado en la gluconeogénesis, se produce a partir de este ciclo del glioxilato, que se da en los glioxisomas, y del ciclo de Krebs en las mitocondrias (Eastmond and Graham, 2001). Sorprendentemente, en nuestros análisis, la variedad que muestra una mayor velocidad de germinación (C129) muestra unos niveles bajos de malato en todos los tiempos analizados (Figura 28). Este resultado podría indicar que C129 es capaz de utilizar el malato de manera más rápida y eficiente que el resto de variedades, mostrando por tanto menos niveles de este metabolito. Así, un metabolismo más rápido y eficiente aumentaría la cantidad de energía generada para la germinación, provocando la aceleración observada en esta variedad. El malato, que forma parte del TCA, puede desviarse mediante el oxalacetato hacia la síntesis del aspartato lo que coincidiría con el pico de acumulación de aspartato a las 36 h en la variedad C129, pero no en las otras variedades (C033 y C032). En plantas, la vía de la familia del aspartato es una ruta metabólica a partir de la cual se sintetizan algunos de los aminoácidos esenciales como la lisina, treonina, metionina e isoleucina (Jander and Joshi, 2009; Galili, 2011), que son metabolitos donantes para el ciclo del TCA (Weitbrecht et al., 2011). Por lo tanto, los niveles más elevados de aspartato en la variedad C129 (Figura 29) podrían reflejar, una mayor cantidad de carbono disponible para la germinación y una mayor facilidad para la obtención de energía, lo que concuerda con los datos de acumulación de azúcares mencionados anteriormente. Por lo general los niveles de aminoácidos son muy similares a los observado en la planta modelo *Arabidopsis* (Fait et al., 2006).

Todos estos resultados sugieren que los procesos metabólicos que se suceden durante la germinación de *B. napus* son semejantes a los que se dan en otras especies. Empezando por una movilización de las sustancias de reserva y un debilitamiento de las paredes celulares. Los compuestos resultantes de las sustancias de reserva se utilizan para la reactivación de la maquinaria celular encargada de obtener energía y metabolitos necesarios para el desarrollo del embrión y el establecimiento de la plántula. Además, tras las comparaciones entre nuestras 3 variedades, hemos visto que las diferencias en la reactivación del metabolismo se relacionan con la variabilidad de la germinación. Adicionalmente, nuestros resultados indican que el malato y el aspartato podrían ser buenos marcadores para la monitorización de la capacidad germinativa de las semillas de colza y además ser dianas de mejora de la germinación en este cultivo.

## **6. El balance entre ABA y GAs es determinante en el desarrollo de la germinación de *B. napus***

Las hormonas juegan un papel clave en el proceso de germinación integrando las señales internas y externas mediante la regulación de la expresión génica. Tanto en *Arabidopsis* como en especies de cultivo se ha observado que el ABA se acumula durante el desarrollo del embrión y el secado de la semilla, pero que sus niveles descienden enormemente una vez que las semillas han comenzado la germinación entre las 6-24 h (Ali-Rachedi et al., 2004; Ye et al., 2012). Aunque los niveles de ABA en semilla seca variaban entre las variedades, observamos que existe un patrón común de disminución de ABA durante la germinación (Figura 31). Además, la variedad C129 presentaba los niveles más bajos de esta hormona en semilla seca y en los primeros momentos de la germinación, lo que sugería que la mayor velocidad de germinación de esta variedad puede deberse a niveles más bajos de esta hormona. No obstante, en el análisis de PCA en el que se combina la cinética de germinación de las variedades con sus respectivos niveles hormonales (Figura 34a), los niveles de ABA no parecen ser un contribuidor principal en la variabilidad observada entre las variedades de *B. napus*. Consistente con esta conclusión, los niveles de RNA de genes claves en el metabolismo y señalización del ABA como *ABA1* y *ABI5* (Figura suplementaria 3) son similares entre las diferentes variedades para cada tiempo de germinación, y a su vez, son parecidos a los observados en los genes ortólogos de *Arabidopsis*. Aunque no hemos determinado que los niveles de ABA expliquen la variabilidad observada de la germinación, nuestros datos sugieren que es el balance ABA/GAs (Figura 34b) así como la sensibilidad a cada una de las dos hormonas lo que parece tener un papel principal en el control de la germinación (Finch-Savage and Footitt, 2017).

Por lo general, las GAs bioactivas se acumulan en el embrión durante la germinación momentos antes de la protrusión de la radícula (Ogawa et al., 2003; Kucera et al., 2005). En nuestros análisis fuimos capaces de detectar una de las formas bioactivas de las GAs, la GA<sub>4</sub>, en las tres variedades, aunque el perfil de acumulación de esta hormona estaba más retrasado en la variedad más lenta, C032, lo que explicaría el retraso germinativo de esta variedad y reflejaría la importancia del papel de esta hormona en el proceso de germinación en esta especie (Figura 32). Por otro lado, al analizar la cinética de los

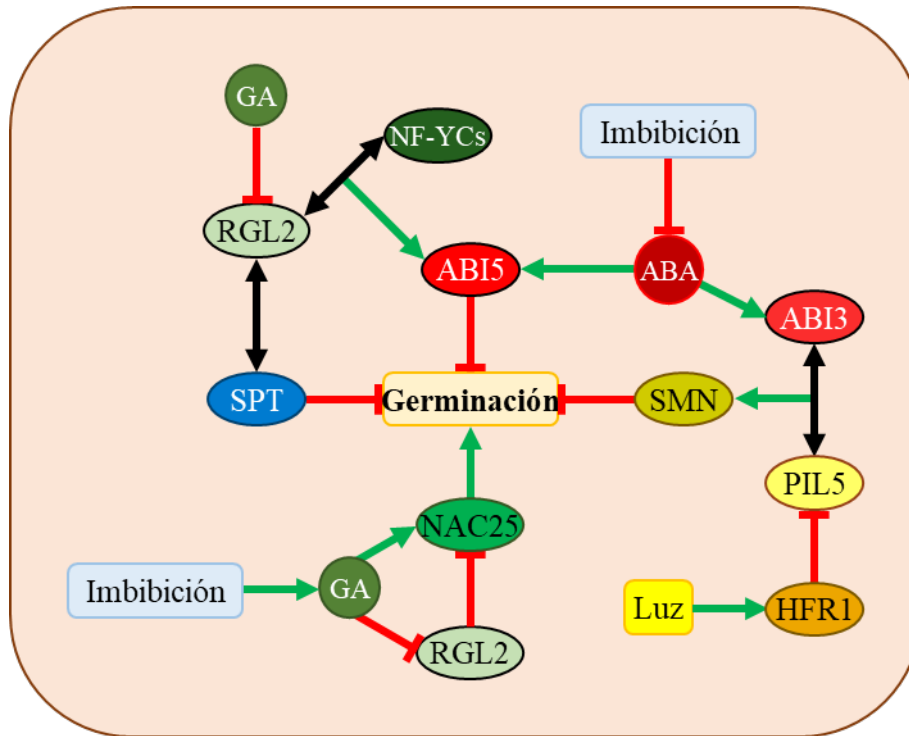
## DISCUSIÓN

mRNA de *BnaGAI* y *BnaKOI* (Figura 38), dos genes que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de GAs, observamos que su expresión en C032 está retrasada con respecto a las variedades C129 y C033. Mas aún, C129 tiene niveles bajos de ABA y medios de GAs, C033 tiene niveles medios de ABA, pero altos de GAs y C032 niveles altos de ABA y una acumulación retrasada y baja de GAs. Por lo tanto, parece que el balance ABA/GAs podría explicar las diferencias observadas en germinación. Como ya se ha mencionado, la germinación no solo está controlada por el balance ABA/GAs, sino que también la sensibilidad a estas hormonas juega un papel en la regulación de este proceso (Nakajima et al., 2006). En *Arabidopsis*, los principales receptores de GAs durante la germinación son *GID1a* y *GID1c* (Cao et al., 2006; Griffiths et al., 2006; Voegelé et al., 2011; Hauvermale et al., 2015). En nuestras variedades observamos un aumento de los niveles de transcritos de *BnaGID1a* (Figura 38) en la variedad C129, y una caída en la acumulación de estos transcritos previa a la acumulación de GA<sub>4</sub> lo que señalaría a *BnaGID1a* como el principal receptor de GAs durante la germinación de *B. napus*. En conclusión, proponemos que el balance ABA/GAs y la sensibilidad a esta última hormona son claves para explicar la variabilidad observada en la velocidad de germinación en las seis variedades de invierno de *B. napus*. Sorprendentemente, al analizar las GAs presentes en nuestras muestras, observamos que el contenido de GA<sub>8</sub> era más alto en la variedad C129 que en C033 y C032 (Figura 32). La GA<sub>8</sub> es un catabolito inactivo fruto de la 13-hidroxilación de la GA<sub>1</sub> bioactiva (Hedden and Phillips, 2000; Sun, 2008). Este resultado sugiere que, aunque no detectemos GA<sub>1</sub> en nuestras muestras, podría tener un papel relevante en los primeros momentos de la germinación de *B. napus* junto con la forma GA<sub>4</sub>. En otras especies, en general, GA<sub>4</sub> es mucho más abundante que GA<sub>1</sub> y es la forma bioactiva más importante (Talon et al., 1990; Derkx et al., 1994; Hedden and Kamiya, 1997; Ogawa et al., 2003; Yamauchi et al., 2004).

Durante la germinación, las auxinas se han descrito como promotoras del ABA (Liu et al., 2007; Nguyen et al., 2016). En ese contexto, hemos observado que las variedades C032 y C033 acumulan mayores niveles de la auxina más relevante, el ácido indolacético, en los primeros tiempos de la germinación y, por lo tanto, podrían actuar retrasando la germinación en estas variedades. Adicionalmente, en la variedad C033 encontramos niveles más altos de la auxina inactiva IAA-Asp, sugiriendo que esta variedad podría superar el efecto inhibitorio de esta hormona activando las vías de degradación del ácido indolacético (Ljung, 2013).

## **7. Los cambios transcripcionales a las 12h son cruciales en el desarrollo de la germinación en *B. napus***

Los análisis transcriptómicos nos ayudan a analizar los procesos biológicos que subyacen a cualquier proceso del desarrollo, así como los principales genes y rutas moleculares que lo regulan. Por ello, obtuvimos los análisis de los perfiles transcriptómicos de las distintas variedades con un comportamiento germinativo diferencial. Los análisis de correspondencia entre los DEGs y las diferentes variedades a lo largo de la germinación nos permitieron comprobar que los cambios transcripcionales a lo largo del proceso de germinación son muy similares entre las variedades estudiadas (89 %, Figura 36a). De hecho, la mayoría de las cinéticas de RNAs de genes involucrados en el metabolismo o señalización del ABA y las GAs, analizadas tanto por RNASeq como por RT-qPCR, presentan patrones similares entre las variedades. Así mismo, las interacciones proteína-proteína claves en el control de su señalización y de la integración de señales ambientales durante la germinación descubiertas en otras especies se mantienen conservadas entre las proteínas ortólogas de *B. napus* (Figura 35; Gallego-Bartolomé et al., 2010; Park et al., 2011; Liu et al., 2016; Xu et al., 2017; Sánchez-Montesino et al., 2019). En conjunto, estos resultados sugieren que hay un grupo de mecanismos moleculares básicos controlando la germinación que no solo se mantienen entre todas las variedades, sino que, además, son similares a los observados en otras especies. Dichos mecanismos se resumen en la Figura 80.



**Figura 80. Mecanismos moleculares básicos posiblemente involucrados en la germinación de *B. napus*.** En esta tesis hemos comprobado que ciertos mecanismos claves de la regulación de la germinación, relacionados con la señalización por ABA o GAs, existentes en otras especies se mantienen en *B. napus*. Las líneas rojas indican inactivación, las flechas verdes indican activación y las flechas negras ambidireccionales interacción.

No obstante, hemos observado que existen diferencias en los niveles transcripcionales a las 12 h, que se corresponde al tiempo en el que las variedades C129, C033 y C032 no se agrupan en el análisis de correspondencia (Figura 36c). Cuando analizamos este comportamiento en detalle encontramos que en ese tiempo se inducen varios genes cuya dinámica de expresión entre variedades podrían explicar las diferencias en la velocidad de germinación. En general, en la variedad C129 estas diferencias se relacionan con una activación temprana de redes génicas previamente asociadas con la germinación, especialmente las relacionadas con la biosíntesis o señalización del ABA y las GAs (Figura 36d, 37 y 38), como *ABI3*, *GAI*, *KO1*, *RGL2* o *SOM*. Además, algunos de estos genes podrían contribuir directamente a las diferencias observadas en alguno de los caracteres de la semilla o la germinación. Por ejemplo, *BnaTPC1* y *BnaGDSL1* son genes asociados previamente a la germinación (Figura suplementaria 3; Hatzig et al., 2018; Ding et al., 2019) que muestran una cinética de expresión diferencial entre nuestras variedades. *BnaGDSL1* se induce fuertemente durante la germinación y es similar a *BnaLIP1*, cuyo ortólogo en *Arabidopsis* es un marcador de la germinación inducido por GAs en la epidermis del embrión, afectando positivamente a este proceso (Rombolá-Caldentey et al., 2014). La germinación requiere de la señalización de las GAs en la epidermis, proceso mediado por las proteínas DELLAs y HD-ZIP IV, que controlan la expresión de los genes encargados del control del crecimiento del eje embrionario (Rombolá-Caldentey et al., 2014). Uno de estos genes es la *EXPA8*, una importante

enzima de remodelación de pared durante el crecimiento en la que convergen diferentes vías de señalización (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Stavang et al., 2009; Bai et al., 2012; Gallego-Bartolomé et al., 2012; Park et al., 2013). Este gen se expresa más en la variedad C129 que en las variedades C032 y C033 (Figura suplementaria 3), lo que sugiere que una mayor velocidad de germinación podría estar mediada por un mecanismo que implique la activación de las rutas de la remodelación de la pared dependiente de GAs. Por otro lado, en los análisis de los caracteres de germinación entre variedades observamos una correlación positiva entre la velocidad de elongación de la raíz y los parámetros de velocidad de germinación (Figura 24). Como la elongación de la raíz depende entre otros procesos celulares, de la expansión celular y está regulada por GAs, es posible que este proceso pueda explicar las diferencias en las cinéticas de germinación (Gallego-Bartolomé et al., 2012; Locascio et al., 2013; Bassel et al., 2014; Stamm et al., 2017; Sánchez-Montesino et al., 2019).

En conclusión, estos resultados junto con los análisis fenotípicos, metabólicos y hormonales proporcionan un marco integral para el estudio de la regulación de la germinación en *B. napus*. Este marco nos permitirá identificar tanto genes como procesos moleculares reguladores que puedan ser dianas para la mejora de la germinación en este cultivo. En ese contexto, hemos identificado varios posibles candidatos que están directamente relacionados con el desempeño de la germinación de colza en nuestros estudios: desde metabolitos como el aspartato y el malato, o el balance de hormonas como el ABA/GAs o IAA/IAA-Asp, a genes reguladores clave como *BnaGAI*, *BnaKO1*, *BnaGID1a* o *BnaEXPA8*. Finalmente, este análisis detallado de la germinación será la base que nos permita identificar los cambios mayoritarios que se producen en la germinación en respuesta a estreses ambientales, en concreto, al aumento de temperatura.



# CONCLUSIONES

---



- 3) La variabilidad observada en la germinación de variedades de invierno y primavera de *B. napus* viene dada por la velocidad de germinación.
- 4) El metabolismo de las semillas durante la germinación de *B. napus* es similar al descrito en otras especies. El malato y el aspartato podrían ser buenos marcadores para monitorizar la capacidad germinativa de semillas de esta especie.
- 5) Al igual que en otras especies, el balance ABA/GAs gobierna el proceso de germinación en *B. napus*. Adicionalmente, niveles más bajos de auxinas correlacionan con un mejor rendimiento germinativo.
- 6) El principal cambio en la dinámica transcripcional de la germinación de *B. napus* se da a las 12 h. En este punto se silencian genes relacionados con la maduración y la dormición, mientras que se activan genes promotores de la germinación y de la reactivación metabólica.



# BIBLIOGRAFÍA

---



- Abeles, F. B. (1986). Role of Ethylene in *Lactuca sativa* cv ;Grand Rapids' Seed Germination. *Plant Physiol* 81, 780–787. doi: 10.1104/PP.81.3.780.
- Aguilera-Alvarado, G. P., Guevara-García, Á. A., Estrada-Antolín, S. A., and Sánchez-Nieto, S. (2019). Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination. *BMC Plant Biol* 19. doi: 10.1186/S12870-018-1605-X.
- Aksouh, N. M., Jacobs, B. C., Stoddard, F. L., and Mailer, R. J. (2001). Response of canola to different heat stresses. *Aust J Agric Res* 52, 817–824. doi: 10.1071/AR00120.
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M. A., and García-Martínez, J. L. (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol* 134, 1050–1057. doi: 10.1104/PP.103.035451.
- Albrecht, V., Ingenfeld, A., and Apel, K. (2006). Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant Mol Biol* 60, 507–518. doi: 10.1007/S11103-005-4921-0.
- Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M. H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., et al. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219, 479–488. doi: 10.1007/S00425-004-1251-4.
- Angadi, S. v., Cutforth, H. W., Miller, P. R., McConkey, B. G., Entz, M. H., Brandt, S. A., et al. (2000). Response of three brassica species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian Journal of Plant Science* 80, 693–701. doi: 10.4141/P99-152.
- Angelovici, R., Fait, A., Fernie, A. R., and Galili, G. (2011). A seed high-lysine trait is negatively associated with the TCA cycle and slows down *Arabidopsis* seed germination. *New Phytol* 189, 148–159. doi: 10.1111/J.1469-8137.2010.03478.X.
- Arana, M. v., Sánchez-Lamas, M., Strasser, B., Ibarra, S. E., Cerdán, P. D., Botto, J. F., et al. (2014). Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 37, 2014–2023. doi: 10.1111/PCE.12286.
- Arc, E., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., Lounifi, I., Job, D., et al. (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: How quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. *Proteomics* 11, 1606–1618. doi: 10.1002/PMIC.201000641.
- Awan, S., Footitt, S., and Finch-Savage, W. E. (2018). Interaction of maternal environment and allelic differences in seed vigour genes determines seed performance in *Brassica oleracea*. *The Plant Journal* 94, 1098–1108. doi: 10.1111/TPJ.13922.
- Bai, M. Y., Fan, M., Oh, E., and Wang, Z. Y. (2012). A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 4917–4929. doi: 10.1105/TPC.112.105163.
- Bailly, C., Bouteau, H. E. M., and Corbineau, F. (2008). [Seed dormancy alleviation and oxidative signaling]. *J Soc Biol* 202, 241–248. doi: 10.1051/JBIO:2008025.
- Bair, N. B., Meyer, S. E., and Allen, P. S. (2006). A hydrothermal after-ripening time model for seed dormancy loss in *Bromus tectorum* L. *Seed Sci Res* 16, 17–28. doi: 10.1079/SSR2005237.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., and Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15. doi: 10.1186/1471-2105-15-293.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barrero, J. M., Piqueras, P., González-Guzmán, M., Serrano, R., Rodríguez, P. L., Ponce, M. R., et al. (2005). A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* 56, 2071–2083. doi: 10.1093/JXB/ERI206.
- Barrôco, R. M., van Poucke, K., Bergervoet, J. H. W., de Veylder, L., Groot, S. P. C., Inzé, D., et al. (2005). The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol* 137, 127–140. doi: 10.1104/PP.104.049361.
- Basbous-Serhal, I., Pateyron, S., Cochet, F., Leymarie, J., and Bailly, C. (2017). 5' to 3' mRNA Decay Contributes to the Regulation of Arabidopsis Seed Germination by Dormancy. *Plant Physiol* 173, 1709–1723. doi: 10.1104/PP.16.01933.
- Basnet, R. K., Duwal, A., Tiwari, D. N., Xiao, D., Monakhos, S., Bucher, J., et al. (2015). Quantitative Trait Locus Analysis of Seed Germination and Seedling Vigor in *Brassica rapa* Reveals QTL Hotspots and Epistatic Interactions. *Front Plant Sci* 6. doi: 10.3389/FPLS.2015.01032.
- Bassel, G. W., Glaab, E., Marquez, J., Holdsworth, M. J., and Bacardit, J. (2011). Functional network construction in *Arabidopsis* using rule-based machine learning on large-scale data sets. *Plant Cell* 23, 3101–3116. doi: 10.1105/TPC.111.088153.
- Bassel, G. W., Stamm, P., Mosca, G., de Reuille, P. B., Gibbs, D. J., Winter, R., et al. (2014). Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the *Arabidopsis* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8685–8690. doi: 10.1073/PNAS.1404616111.
- Baud, S., Boutin, J. P., Miquel, M., Lepiniec, L., and Rochat, C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 151–160. doi: 10.1016/S0981-9428(01)01350-X.
- Bazin, J., Batlla, D., Dussert, S., El-Maarouf-Bouteau, H., and Bailly, C. (2011). Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. *J Exp Bot* 62, 627–640. doi: 10.1093/JXB/ERQ314.
- Becker, M. G., Walker, P. L., Pulgar-Vidal, N. C., and Belmonte, M. F. (2017). SeqEnrich: A tool to predict transcription factor networks from co-expressed *Arabidopsis* and *Brassica napus* gene sets. *PLoS One* 12. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0178256.
- Belin, C., Megies, C., Hauserová, E., and Lopez-Molina, L. (2009). Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* 21, 2253–2268. doi: 10.1105/TPC.109.067702.
- Benamar, A., Rolletschek, H., Borisjuk, L., Avelange-Macherel, M. H., Curien, G., Mostefai, H. A., et al. (2008). Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1268–1275. doi: 10.1016/J.BBABIO.2008.06.002.
- Bentsink, L., Jowett, J., Hanhart, C. J., and Koornneef, M. (2006). Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17042–17047. doi: 10.1073/PNAS.0607877103.
- Bentsink, L., and Koornneef, M. (2008). Seed dormancy and germination. *Arabidopsis Book* 6, e0119. doi: 10.1199/TAB.0119.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G. L., Aoyama, N., Chung, Y. Y., Still, D. W., and Jones, R. L. (2007). The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 143, 1173–1188. doi: 10.1104/PP.106.093435.

- Betty, M., and Finch-Savage, W. E. (1996). Respiratory enzyme activities during germination in Brassica seed lots of differing vigour. *Seed Sci Res* 6, 165–174. doi: 10.1017/S0960258500003226.
- Betty, M., Finch-Savage, W. E., King, G. J., and Lynn, J. R. (2000). Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in Brassica oleracea. *New Phytologist* 148, 277–286. doi: 10.1046/J.1469-8137.2000.00760.X.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., and Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* 9781461446934, 1–392. doi: 10.1007/978-1-4614-4693-4/COVER.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218, 683–692. doi: 10.1007/S00425-004-1203-Z.
- Bonilla, I., El-Hamdaoui, A., and Bolaños, L. (2004). Boron and calcium increase *Pisum sativum* seed germination and seedling development under salt stress. *Plant and Soil* 267:1 267, 97–107. doi: 10.1007/S11104-005-4689-7.
- Borghetti, F., Noda, F. N., and de Sá, C. M. (2002). Possible involvement of proteasome activity in ethylene-induced germination of dormant sunflower embryos. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14, 125–131. doi: 10.1590/S1677-04202002000200007.
- Boter, M., Calleja-Cabrera, J., Carrera-Castaño, G., Wagner, G., Hatzig, S. V., Snowdon, R. J., et al. (2019). An Integrative Approach to Analyze Seed Germination in Brassica napus. *Front Plant Sci* 10, 1342. doi: 10.3389/FPLS.2019.01342/BIBTEX.
- Botha, F. C., Potgieter, G. P., and Botha, A. M. (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation* 1992 11:3 11, 211–224. doi: 10.1007/BF00024560.
- Bove, J., Lucas, P., Godin, B., Ogé, L., Jullien, M., and Grappin, P. (2005). Gene expression analysis by cDNA-AFLP highlights a set of new signaling networks and translational control during seed dormancy breaking in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 57, 593–612. doi: 10.1007/S11103-005-0953-8.
- Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D., and McCourt, P. (2003). The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *Plant J* 34, 67–75. doi: 10.1046/J.1365-313X.2003.01707.X.
- Bray, C. M., and West, C. E. (2005). DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytologist* 168, 511–528. doi: 10.1111/J.1469-8137.2005.01548.X.
- Cadman, C. S. C., Toorop, P. E., Hilhorst, H. W. M., and Finch-Savage, W. E. (2006). Gene expression profiles of Arabidopsis Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J* 46, 805–822. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.02738.X.
- Calleja-Cabrera, J., Boter, M., Oñate-Sánchez, L., and Pernas, M. (2020). Root Growth Adaptation to Climate Change in Crops. *Front Plant Sci* 11. doi: 10.3389/FPLS.2020.00544.

## BIBLIOGRAFÍA

- Camut, L., Regnault, T., Sirlin-Josserand, M., Sakvarelidze-Achard, L., Carrera, E., Zumsteg, J., et al. (2019). Root-derived GA12 contributes to temperature-induced shoot growth in Arabidopsis. *Nat Plants* 5, 1216–1221. doi: 10.1038/S41477-019-0568-8.
- Cao, D., Cheng, H., Wu, W., Soo, H. M., and Peng, J. (2006). Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142, 509–525. doi: 10.1104/PP.106.082289.
- Cao, D., Hussain, A., Cheng, H., and Peng, J. (2005). Loss of function of four DELLA genes leads to light- and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta* 223, 105–113. doi: 10.1007/S00425-005-0057-3.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F. L., et al. (2008). Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *Plant J* 53, 214–224. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03331.X.
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Peer, W., Schmuths, H., Footitt, S., et al. (2007). Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiol* 143, 1669–1679. doi: 10.1104/PP.107.096057.
- Carrera-Castaño, G., Calleja-Cabrera, J., Pernas, M., Gómez, L., and Oñate-Sánchez, L. (2020). An updated overview on the regulation of seed germination. *Plants* 9, 1–42. doi: 10.3390/plants9060703.
- Carrillo-Barral, N., Matilla, A. J., Rodríguez-Gacio, M. del C., and Iglesias-Fernández, R. (2017). Mannans and endo- $\beta$ -mannanase transcripts are located in different seed compartments during Brassicaceae germination. *Planta* 247:3 247, 649–661. doi: 10.1007/S00425-017-2815-4.
- Castrillo, G., Turck, F., Leveugle, M., Lecharny, A., Carbonero, P., Coupland, G., et al. (2011). Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0021524.
- Cavell, A. C., Lydiate, D. J., Parkin, I., Dean, C., and Trick, M. (1998). Collinearity between a 30-centimorgan segment of Arabidopsis thaliana chromosome 4 and duplicated regions within the Brassica napus genome. *Genome* 41, 62–69. doi: 10.1139/G97-097.
- Chahtane, H., Füller, T. N., Allard, P. M., Marcourt, L., Queiroz, E. F., Shanmugabalaji, V., et al. (2018). The plant pathogen Pseudomonas aeruginosa triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in Arabidopsis. *Elife* 7. doi: 10.7554/ELIFE.37082.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A. P., Tang, H., Wang, X., et al. (2014). Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic Brassica napus oilseed genome. *Science* 345, 950–953. doi: 10.1126/SCIENCE.1253435.
- Chandler, P. M., and Harding, C. A. (2013). ‘Overgrowth’ mutants in barley and wheat: new alleles and phenotypes of the ‘Green Revolution’ Della gene. *J Exp Bot* 64, 1603. doi: 10.1093/JXB/ERT022.
- Chandler, P. M., Marion-Poll, A., Ellis, M., and Gubler, F. (2002). Mutants at the Slender1 Locus of Barley cv Himalaya. Molecular and Physiological Characterization. *Plant Physiol* 129, 181. doi: 10.1104/PP.010917.
- Chauhan, H., Khurana, N., Nijhavan, A., Khurana, J. P., and Khurana, P. (2012). The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination

- and imparts tolerance to heat stress. *Plant Cell Environ* 35, 1912–1931. doi: 10.1111/J.1365-3040.2012.02525.X.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J. P., Erhardt, M., et al. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 1849–1860. doi: 10.1105/TPC.111.085233.
- Chen, B. X., Peng, Y. X., Gao, J. D., Zhang, Q., Liu, Q. J., Fu, H., et al. (2019b). Coumarin-Induced Delay of Rice Seed Germination Is Mediated by Suppression of Abscisic Acid Catabolism and Reactive Oxygen Species Production. *Front Plant Sci* 10. doi: 10.3389/FPLS.2019.00828.
- Chen, J., Tang, L., Shi, P., Yang, B., Sun, T., Cao, W., et al. (2017). Effects of short-term high temperature on grain quality and starch granules of rice (*Oryza sativa* L.) at post-anthesis stage. *Protoplasma* 254, 935–943. doi: 10.1007/S00709-016-1002-Y.
- Chen, W., and Singh, K. B. (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the Arabidopsis GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* 19, 667–677. doi: 10.1046/J.1365-313X.1999.00560.X.
- Chen, X., Shi, L., Chen, Y., Zhu, L., Zhang, D., Xiao, S., et al. (2019a). Arabidopsis HSP70-16 is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures. *Plant Cell Environ* 42, 1190–1204. doi: 10.1111/PCE.13480.
- Chen, X., Yoong, F. Y., O'Neill, C. M., and Penfield, S. (2021). Temperature during seed maturation controls seed vigour through ABA breakdown in the endosperm and causes a passive effect on DOG1 mRNA levels during entry into quiescence. *New Phytol* 232, 1311–1322. doi: 10.1111/NPH.17646.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D. E., Cao, D., et al. (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* 131, 1055–1064. doi: 10.1242/DEV.00992.
- Chia, T. Y. P., Pike, M. J., and Rawsthorne, S. (2005). Storage oil breakdown during embryo development of *Brassica napus* (L.). *J Exp Bot* 56, 1285–1296. doi: 10.1093/JXB/ERI129.
- Chiang, G. C. K., Bartsch, M., Barua, D., Nakabayashi, K., Debieu, M., Kronholm, I., et al. (2011). DOG1 expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in Arabidopsis thaliana. *Mol Ecol* 20, 3336–3349. doi: 10.1111/J.1365-294X.2011.05181.X.
- Chiang, G. C. K., Barua, D., Kramera, E. M., Amasino, R. M., and Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11661–11666. doi: 10.1073/PNAS.0901367106.
- Chibani, K., Ali-Rachedi, S., Job, C., Job, D., Jullien, M., and Grappin, P. (2006). Proteomic analysis of seed dormancy in Arabidopsis. *Plant Physiol* 142, 1493–1510. doi: 10.1104/PP.106.087452.
- Chiu, R. S., Nahal, H., Provart, N. J., and Gazzarrini, S. (2012). The role of the Arabidopsis FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature. *BMC Plant Biol* 12. doi: 10.1186/1471-2229-12-15.
- Chiwocha, S. D. S., Cutler, A. J., Abrams, S. R., Ambrose, S. J., Yang, J., Ross, A. R. S., et al. (2005). The *etr1-2* mutation in Arabidopsis thaliana affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant J* 42, 35–48. doi: 10.1111/J.1365-313X.2005.02359.X.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chu, V. T., Gottardo, R., Raftery, A. E., Bumgarner, R. E., and Yeung, K. Y. (2008). MeV+R: using MeV as a graphical user interface for Bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biol* 9. doi: 10.1186/GB-2008-9-7-R118.
- Chung, Y., and Choe, S. (2013). The Regulation of Brassinosteroid Biosynthesis in Arabidopsis. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.797856> 32, 396–410. doi: 10.1080/07352689.2013.797856.
- Cifuentes-Esquivel, N., Bou-Torrent, J., Galstyan, A., Gallemí, M., Sessa, G., Salla Martret, M., et al. (2013). The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in Arabidopsis seedlings. *Plant J* 75, 989–1002. doi: 10.1111/TPJ.12264.
- Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R. A. (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* 25, 413–427. doi: 10.1007/BF00043870.
- Claeys, H., de Bodt, S., and Inzé, D. (2014). Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci* 19, 231–239. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2013.10.001.
- Clarkson, D. T. (1984). Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. *Plant Cell Environ* 7, 449–456. doi: 10.1111/J.1365-3040.1984.TB01435.X.
- Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23, 1219–1230. doi: 10.1105/TPC.111.084475.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., and Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *J Exp Biol* 217, 67–75. doi: 10.1242/JEB.089938.
- Comai, L., Dietrich, R. A., Maslyar, D. J., Baden, C. S., and Harada, J. J. (1989). Coordinate expression of transcriptionally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in Brassica napus L. *Plant Cell* 1, 293–300. doi: 10.1105/TPC.1.3.293.
- Corbineau, F., Bianco, J., Garelo, G., and Côme, D. (2002). Breakage of Pseudotsuga menziesii seed dormancy by cold treatment as related to changes in seed ABA sensitivity and ABA levels. *Physiol Plant* 114, 313–319. doi: 10.1034/J.1399-3054.2002.1140218.X.
- Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C., and El-Maarouf-Bouteau, H. (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Sci* 5. doi: 10.3389/FPLS.2014.00539.
- Curtis, M. D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133, 462–469. doi: 10.1104/PP.103.027979.
- Dai Vu, L., Xu, X., Gevaert, K., and de Smet, I. (2019). Developmental Plasticity at High Temperature. *Plant Physiol* 181, 399–411. doi: 10.1104/PP.19.00652.
- Das, S. S., Karmakar, P., Nandi, A. K., and Sanan-Mishra, N. (2015). Small RNA mediated regulation of seed germination. *Front Plant Sci* 6. doi: 10.3389/FPLS.2015.00828.
- Davière, J. M., and Achard, P. (2016). A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. *Mol Plant* 9, 10–20. doi: 10.1016/J.MOLP.2015.09.011.
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 1–15. doi: 10.1007/978-1-4020-2686-7\_1/COVER.

- de Lucas, M., Davière, J. M., Rodríguez-Falcón, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J. M., Lorrain, S., et al. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480–484. doi: 10.1038/NATURE06520.
- de Lucas, M., and Prat, S. (2014). PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as integrators of light and hormonal signals. *New Phytol* 202, 1126–1141. doi: 10.1111/NPH.12725.
- Decaestecker, W., Buono, R. A., Pfeiffer, M. L., Vangheluwe, N., Jourquin, J., Karimi, M., et al. (2019). CRISPR-TSKO: A Technique for Efficient Mutagenesis in Specific Cell Types, Tissues, or Organs in Arabidopsis. *Plant Cell* 31, 2868–2887. doi: 10.1105/TPC.19.00454.
- Dechaine, J. M., Gardner, G., and Weinig, C. (2009). Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation. *Plant Cell Environ* 32, 1297–1309. doi: 10.1111/J.1365-3040.2009.01998.X.
- Dekkers, B. J. W., He, H., Hanson, J., Willems, L. A. J., Jamar, D. C. L., Cueff, G., et al. (2016). The Arabidopsis DELAY OF GERMINATION 1 gene affects ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) expression and genetically interacts with ABI3 during Arabidopsis seed development. *Plant J* 85, 451–465. doi: 10.1111/TPJ.13118.
- Dekkers, B. J. W., Pearce, S., van Bolderen-Veldkamp, R. P., Marshall, A., Widera, P., Gilbert, J., et al. (2013). Transcriptional dynamics of two seed compartments with opposing roles in Arabidopsis seed germination. *Plant Physiol* 163, 205–215. doi: 10.1104/PP.113.223511.
- Demilly, D., Ducournau, S., Wagner, M. H., and Dürr, C. (2014). Digital imaging of seed germination. *Plant Image Analysis: Fundamentals and Applications*, 147–166. doi: 10.1201/B17441-8/STERILE-DYNAMIC-MEASUREMENT-VITRO-NITROGEN-USE-EFFICIENCY-PLANTLETS-YANYOU-WUAND-KAIYAN-ZHANG.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36. doi: 10.1093/NAR/GKN180.
- Derkx, M. P. M., Vermeer, E., and Karssen, C. M. (1994). Gibberellins in seeds of Arabidopsis thaliana: biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. *Plant Growth Regulation* 1994 15:3 15, 223–234. doi: 10.1007/BF00029895.
- di Ruocco, G., di Mambro, R., and Ioio, R. dello (2018). Building the differences: a case for the ground tissue patterning in plants. *Proceedings of the Royal Society B* 285. doi: 10.1098/RSPB.2018.1746.
- Dill, A., Jung, H. S., and Sun, T. P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14162–14167. doi: 10.1073/PNAS.251534098.
- Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M., and Sun, T. P. (2004). The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392–1405. doi: 10.1105/TPC.020958.
- Ding, L. N., Guo, X. J., Li, M., Fu, Z. L., Yan, S. Z., Zhu, K. M., et al. (2019). Improving seed germination and oil contents by regulating the GDSL transcriptional level in Brassica napus. *Plant Cell Rep* 38, 243–253. doi: 10.1007/S00299-018-2365-7.

## BIBLIOGRAFÍA

- Dinkova, T. D., Márquez-Velázquez, N. A., Aguilar, R., Lázaro-Mixteco, P. E., and Jiménez, E. S. de (2011). Tight translational control by the initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E is required for maize seed germination. *Seed Sci Res* 21, 85–93. doi: 10.1017/S0960258511000043.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS635.
- Dodd, A. N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61, 593–620. doi: 10.1146/ANNUREV-ARPLANT-070109-104628.
- Domergue, J. B., Abadie, C., Limami, A., Way, D., and Tcherkez, G. (2019). Seed quality and carbon primary metabolism. *Plant Cell Environ* 42, 2776–2788. doi: 10.1111/PCE.13618.
- Dong, H. K., Yamaguchi, S., Lim, S., Oh, E., Park, J., Hanada, A., et al. (2008). SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in Arabidopsis, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell* 20, 1260–1277. doi: 10.1105/TPC.108.058859.
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C. R., et al. (2005). ENVIRONMENTAL AND GENETIC INFLUENCES ON THE GERMINATION OF ARABIDOPSIS THALIANA IN THE FIELD. <https://doi.org/10.1554/04-419> 59, 740–757. doi: 10.1554/04-419.
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127–6145. doi: 10.1093/NAR/16.13.6127.
- Driedonks, N., Rieu, I., and Vriezen, W. H. (2016). Breeding for plant heat tolerance at vegetative and reproductive stages. *Plant Reprod* 29, 67–79. doi: 10.1007/S00497-016-0275-9.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res* 38. doi: 10.1093/NAR/GKQ310.
- Ducournau, S., Feutry, A., Plainchault, P., Revollon, P., Vigouroux, B., and Wagner, M. H. (2004). An image acquisition system for automated monitoring of the germination rate of sunflower seeds. *Comput Electron Agric* 44, 189–202. doi: 10.1016/J.COMPAG.2004.04.005.
- Ducournau, S., Feutry, A., Plainchault, P., Revollon, P., Vigouroux, B., and Wagner, M. H. (2005). Using computer vision to monitor germination time course of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Seed Science and Technology* 33, 329–340. doi: 10.15258/SST.2005.33.2.06.
- Eastmond, P. J., and Graham, I. A. (2001). Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci* 6, 72–78. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01835-5.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19, 1349. doi: 10.1093/NAR/19.6.1349.
- Ellis, C., and Turner, J. G. (2002). A conditionally fertile coi1 allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in Arabidopsis thaliana seeds and young seedlings. *Planta* 215, 549–556. doi: 10.1007/S00425-002-0787-4.
- El-Maarouf-Bouteau, H., Meimoun, P., Job, C., Job, D., and Bailly, C. (2013). Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 4. doi: 10.3389/FPLS.2013.00077.
- Endo, A., Tatematsu, K., Hanada, K., Duermeyer, L., Okamoto, M., Yonekura-Sakakibara, K., et al. (2012). Tissue-specific transcriptome analysis reveals cell wall metabolism, flavonol biosynthesis

- and defense responses are activated in the endosperm of germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol* 53, 16–27. doi: 10.1093/PCP/PCR171.
- Engler, C., and Marillonnet, S. (2014). Golden Gate cloning. *Methods Mol Biol* 1116, 119–131. doi: 10.1007/978-1-62703-764-8\_9.
- Espinosa-Ruiz, A., Martínez, C., de Lucas, M., Fàbregas, N., Bosch, N., Caño-Delgado, A. I., et al. (2017). TOPLESS mediates brassinosteroid control of shoot boundaries and root meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 144, 1619–1628. doi: 10.1242/DEV.143214.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., et al. (2017). Crop Production under Drought and Heat Stress: Plant Responses and Management Options. *Front Plant Sci* 8. doi: 10.3389/FPLS.2017.01147.
- Fait, A., Angelovici, R., Less, H., Ohad, I., Urbanczyk-Wochniak, E., Fernie, A. R., et al. (2006). *Arabidopsis* Seed Development and Germination Is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches. *Plant Physiol* 142, 839. doi: 10.1104/PP.106.086694.
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451, 475–479. doi: 10.1038/NATURE06448.
- Fernández-Arbaizar, A., Regalado, J. J., and Lorenzo, O. (2012). Isolation and characterization of novel mutant loci suppressing the ABA hypersensitivity of the *Arabidopsis* coronatine insensitive 1-16 (*coi1-16*) mutant during germination and seedling growth. *Plant Cell Physiol* 53, 53–63. doi: 10.1093/PCP/PCR174.
- Fernández-Pascual, E., Carta, A., Mondoni, A., Cavieres, L. A., Rosbakh, S., Venn, S., et al. (2021). The seed germination spectrum of alpine plants: a global meta-analysis. *New Phytologist* 229, 3573–3586. doi: 10.1111/NPH.17086.
- Fields, S., and Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245–246. doi: 10.1038/340245A0.
- Finch-Savage, W. E. (2020). Influence of Seed Quality on Crop Establishment, Growth, and Yield. *Seed Quality*, 361–384. doi: 10.1201/9781003075226-11.
- Finch-Savage, W. E., and Bassel, G. W. (2016). Seed vigour and crop establishment: extending performance beyond adaptation. *J Exp Bot* 67, 567–591. doi: 10.1093/JXB/ERV490.
- Finch-Savage, W. E., Cadman, C. S. C., Toorop, P. E., Lynn, J. R., and Hilhorst, H. W. M. (2007). Seed dormancy release in *Arabidopsis Cvi* by dry after-ripening, low temperature, nitrate and light shows common quantitative patterns of gene expression directed by environmentally specific sensing. *Plant J* 51, 60–78. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03118.X.
- Finch-Savage, W. E., and Footitt, S. (2017). Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. *J Exp Bot* 68, 843–856. doi: 10.1093/JXB/ERW477.
- Finch-Savage, W. E., and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171, 501–523. doi: 10.1111/J.1469-8137.2006.01787.X.
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* 11, e0166. doi: 10.1199/TAB.0166.

## BIBLIOGRAFÍA

- Finkelstein, R. R. (1994). Maternal Effects Govern Variable Dominance of Two Abscisic Acid Response Mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105, 1203–1208. doi: 10.1104/PP.105.4.1203.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. L., and Rock, C. D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl. doi: 10.1105/TPC.010441.
- Finkelstein, R. R., and Lynch, T. J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12, 599–609. doi: 10.1105/TPC.12.4.599.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C. (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 59, 387–415. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092740.
- Foolad, M. R., Lin, G. Y., and Chen, F. Q. (1999). Comparison of QTLs for seed germination under non-stress, cold stress and salt stress in tomato. *Plant Breeding* 118, 167–173. doi: 10.1046/J.1439-0523.1999.118002167.X.
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W., et al. (2014). *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol* 24, 1939–1944. doi: 10.1016/J.CUB.2014.07.019.
- Frey, A., Audran, C., Marin, E., Sotta, B., and Marion-Poll, A. (1999). Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Mol Biol* 39, 1267–1274. doi: 10.1023/A:1006145025631.
- Friedrichsen, D. M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J. N., Alonso, J., Ecker, J. R., et al. (2002). Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* 162, 1445. doi: 10.1093/GENETICS/162.3.1445.
- Froman, B. E., Edwards, P. C., Bursch, A. G., and Dehesh, K. (2000). *ACX3*, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 123, 733–741. doi: 10.1104/PP.123.2.733.
- Fu, Q., Wang, B. C., Jin, X., Li, H. B., Han, P., Wei, K. H., et al. (2005). Proteomic analysis and extensive protein identification from dry, germinating *Arabidopsis* seeds and young seedlings. *J Biochem Mol Biol* 38, 650–660. doi: 10.5483/BMBREP.2005.38.6.650.
- Fu, X., Richards, D. E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N. P. (2004). The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCF<sup>SLY1</sup> E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* 16, 1406–1418. doi: 10.1105/TPC.021386.
- Fujioka, S., Sakurai, A., Fujioka, S., and Saku, A. (1997). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids.
- Fukazawa, J., Ito, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y. (2015). Binding of *GID1* to DELLAs promotes dissociation of *GAF1* from DELLA in GA dependent manner. *Plant Signal Behav* 10. doi: 10.1080/15592324.2015.1052923.
- Fukazawa, J., Mori, M., Watanabe, S., Miyamoto, C., Ito, T., and Takahashi, Y. (2017). DELLA-GAF1 Complex Is a Main Component in Gibberellin Feedback Regulation of GA20 Oxidase 2. *Plant Physiol* 175, 1395–1406. doi: 10.1104/PP.17.00282.
- Galili, G. (2011). The aspartate-family pathway of plants: linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. *Plant Signal Behav* 6, 192–195. doi: 10.4161/PSB.6.2.14425.

- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., et al. (2001). Proteomic analysis of arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiol* 126, 835–848. doi: 10.1104/PP.126.2.835.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., et al. (2002). Proteomics of Arabidopsis seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol* 129, 823–837. doi: 10.1104/PP.002816.
- Gallardo, M., del Mar Delgado, M., Sánchez-Calle, I. M., and Matilla, A. J. (1991). Ethylene Production and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Conjugation in Thermoinhibited *Cicer arietinum* L. Seeds. *Plant Physiol* 97, 122–127. doi: 10.1104/PP.97.1.122.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S. G., et al. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13446–13451. doi: 10.1073/PNAS.1119992109/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Gallego-Bartolomé, J., Minguet, E. G., Marín, J. A., Prat, S., Blázquez, M. A., and Alabadí, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in Arabidopsis. *Mol Biol Evol* 27, 1247–1256. doi: 10.1093/MOLBEV/MSQ012.
- Gao, Q., and Zhang, L. (2008). Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of Arabidopsis thaliana. *J Plant Physiol* 165, 138–148. doi: 10.1016/J.JPLPH.2007.04.002.
- Gendreau, E., Romaniello, S., Barad, S., Leymarie, J., Benech-Arnold, R., and Corbineau, F. (2008). Regulation of cell cycle activity in the embryo of barley seeds during germination as related to grain hydration. *J Exp Bot* 59, 203–212. doi: 10.1093/JXB/ERM296.
- Ghassemi-Golezani K., Bakhshy J., Raey Y., Hossainzadeh-Mahootchy A. (2010a): Seed vigour and field performance of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 38, 146–150.
- Ghassemi-Golezani, K., Khomari, S., Dalil, B., Hosseinzadeh-Mahootchy, A., and Chadordooz-Jeddi, A. (2010b). Effects of seed aging on field performance of winter oilseed rape. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8, 175–178.
- Gibbs, D. J., MdIsa, N., Movahedi, M., Lozano-Juste, J., Mendiondo, G. M., Berckhan, S., et al. (2014). Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors. *Mol Cell* 53, 369–379. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2013.12.020.
- Giraudat, J., Hauge, B. M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., and Goodman, H. M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4, 1251–1261. doi: 10.1105/TPC.4.10.1251.
- Goding, C. R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14, 1712–1728. doi: 10.1101/GAD.14.14.1712.
- Goldberg, R. B., de Paiva, G., and Yadegari, R. (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266, 605–614. doi: 10.1126/SCIENCE.266.5185.605.
- Gomez, M. D., Ventimilla, D., Sacristan, R., and Perez-Amador, M. A. (2016). Gibberellins Regulate Ovule Integument Development by Interfering with the Transcription Factor ATS. *Plant Physiol* 172, 2403. doi: 10.1104/PP.16.01231.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gou, X., Yin, H., He, K., Du, J., Yi, J., Xu, S., et al. (2012). Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling. *PLoS Genet* 8. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1002452.
- Graeber, K., Linkies, A., Steinbrecher, T., Mummenhoff, K., Tarkowská, D., Turečková, V., et al. (2014). Delay of germination 1 mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature- and gibberellin-dependent control of seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111. doi: 10.1073/PNAS.1403851111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.1403851111.SAPP.PDF.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z. L., Powers, S. J., et al. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 3399–3414. doi: 10.1105/TPC.106.047415.
- Groot, S. P. C., and Karssen, C. M. (1987). Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171, 525–531. doi: 10.1007/BF00392302.
- Gu, J., Chao, H., Gan, L., Guo, L., Zhang, K., Li, Y., et al. (2016). Proteomic Dissection of Seed Germination and Seedling Establishment in Brassica napus. *Front Plant Sci* 7. doi: 10.3389/FPLS.2016.01482.
- Gu, J., Hou, D., Li, Y., Chao, H., Zhang, K., Wang, H., et al. (2019). Integration of proteomic and genomic approaches to dissect seed germination vigor in *Brassica napus* seeds differing in oil content. *BMC Plant Biol* 19. doi: 10.1186/S12870-018-1624-7.
- Hakoshima, T. (2018). Structural basis of the specific interactions of GRAS family proteins. *FEBS Lett* 592, 489–501. doi: 10.1002/1873-3468.12987.
- Han, C., and Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics* 15, 1671–1679. doi: 10.1002/PMIC.201400375.
- Hands, P., Rabiger, D. S., and Koltunow, A. (2016). Mechanisms of endosperm initiation. *Plant Reprod* 29, 215–225. doi: 10.1007/S00497-016-0290-X.
- Hao, Y., Zong, X., Ren, P., Qian, Y., and Fu, A. (2021). Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transcription Factors Regulate a Wide Range of Functions in Arabidopsis. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/IJMS22137152.
- Harholt, J., Suttangkakul, A., and Scheller, H. V. (2010). Focus Issue on Plant Cell Walls: Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiol* 153, 384. doi: 10.1104/PP.110.156588.
- Hartweck, L. M., and Olszewski, N. E. (2006). Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell* 18, 278–282. doi: 10.1105/TPC.105.039958.
- Hashimoto, K., and Panchenko, A. R. (2010). Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20352–20357. doi: 10.1073/PNAS.1012999107/SUPPL\_FILE/PNAS.1012999107\_SI.PDF.
- Hatzig, S., Breuer, F., Nesi, N., Ducournau, S., Wagner, M. H., Leckband, G., et al. (2018). Hidden Effects of Seed Quality Breeding on Germination in Oilseed Rape ( *Brassica napus* L.). *Front Plant Sci* 9. doi: 10.3389/FPLS.2018.00419.
- Hatzig, S. v., Frisch, M., Breuer, F., Nesi, N., Ducournau, S., Wagner, M. H., et al. (2015). Genome-wide association mapping unravels the genetic control of seed germination and vigor in Brassica napus. *Front Plant Sci* 6, 221. doi: 10.3389/FPLS.2015.00221/ABSTRACT.

- Haughn, G., and Chaudhury, A. (2005). Genetic analysis of seed coat development in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 10, 472–477. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2005.08.005.
- Hauvermale, A. L., Tuttle, K. M., Takebayashi, Y., Seo, M., and Steber, C. M. (2015). Loss of Arabidopsis thaliana Seed Dormancy is Associated with Increased Accumulation of the GID1 GA Hormone Receptors. *Plant Cell Physiol* 56, 1773–1785. doi: 10.1093/PCP/PCV084.
- He, J., Duan, Y., Hua, D., Fan, G., Wang, L., Liu, Y., et al. (2012). DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in Arabidopsis mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell* 24, 1815–1833. doi: 10.1105/TPC.112.098707.
- He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S. L., Gendron, N., Sun, C. Q., et al. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307, 1634–1638. doi: 10.1126/SCIENCE.1107580.
- Hedden, P., and Kamiya, Y. (1997). GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 431–460. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.48.1.431.
- Hedden, P., and Phillips, A. L. (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5, 523–530. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01790-8.
- Hedden, P., and Sponsel, V. (2015). A Century of Gibberellin Research. *J Plant Growth Regul* 34, 740–760. doi: 10.1007/S00344-015-9546-1.
- Hedden, P., and Thomas, S. G. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J* 444, 11–25. doi: 10.1042/BJ20120245.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P. C. (2003). The Basic Helix–Loop–Helix Transcription Factor Family in Plants: A Genome-Wide Study of Protein Structure and Functional Diversity. *Mol Biol Evol* 20, 735–747. doi: 10.1093/MOLBEV/MSG088.
- Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., et al. (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods* 1. doi: 10.1186/1746-4811-1-13.
- Helliwell, C. A., Poole, A., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (1999). Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 119, 507–510. doi: 10.1104/PP.119.2.507.
- Hennig, L., Stoddart, W. M., Dieterle, M., Whitlam, G. C., and Schäfer, E. (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of arabidopsis. *Plant Physiol* 128, 194–200. doi: 10.1104/PP.010559.
- Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 110–182. doi: 10.1016/S0065-230X(08)60353-X.
- Hepler, P. K., and Wayne, R. O. (1985). CALCIUM AND PLANT DEVELOPMENT. *Ann. Rev. Plant Physiol* 36, 397–439. Available at: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org) [Accessed November 4, 2022].
- Hernández-García, J., Sun, R., Serrano-Mislata, A., Inoue, K., Vargas-Chávez, C., Esteve-Bruna, D., et al. (2021). Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *Curr Biol* 31, 3678–3686.e11. doi: 10.1016/J.CUB.2021.06.010.

## BIBLIOGRAFÍA

- Heschel, M. S., Selby, J., Butler, C., Whitelam, G. C., Sharrock, R. A., and Donohue, K. (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytologist* 174, 735–741. doi: 10.1111/J.1469-8137.2007.02044.X.
- Hill, L. M., Morley-Smith, E. R., and Rawsthorne, S. (2003). Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiol* 131, 228–236. doi: 10.1104/PP.010868.
- Hirano, K., Asano, K., Tsuji, H., Kawamura, M., Mori, H., Kitano, H., et al. (2010). Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *Plant Cell* 22, 2680–2696. doi: 10.1105/TPC.110.075549.
- Holdsworth, M. J., Bentsink, L., and Soppe, W. J. J. (2008a). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179, 33–54. doi: 10.1111/J.1469-8137.2008.02437.X.
- Holdsworth, M. J., Finch-Savage, W. E., Grappin, P., and Job, D. (2008b). Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. *Trends Plant Sci* 13, 7–13. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2007.11.002.
- Holman, T. J., Jones, P. D., Russell, L., Medhurst, A., Tomas, S. U., Talloji, P., et al. (2009). The N-end rule pathway promotes seed germination and establishment through removal of ABA sensitivity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4549–4554. doi: 10.1073/PNAS.0810280106.
- Hooks, M. A., Allwood, J. W., Harrison, J. K. D., Kopka, J., Erban, A., Goodacre, R., et al. (2014). Selective induction and subcellular distribution of ACONITASE 3 reveal the importance of cytosolic citrate metabolism during lipid mobilization in Arabidopsis. *Biochem J* 463, 309–317. doi: 10.1042/BJ20140430.
- Hou, X., Lee, L. Y. C., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19, 884–894. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2010.10.024.
- Howell, K. A., Narsai, R., Carroll, A., Ivanova, A., Lohse, M., Usadel, B., et al. (2009). Mapping metabolic and transcript temporal switches during germination in rice highlights specific transcription factors and the role of RNA instability in the germination process. *Plant Physiol* 149, 961–980. doi: 10.1104/PP.108.129874.
- Hsuan, T. P., Jhuang, P. R., Wu, W. C., and Lur, H. S. (2019). Thermotolerance evaluation of Taiwan Japonica type rice cultivars at the seedling stage. *Bot Stud* 60. doi: 10.1186/S40529-019-0277-7.
- Hsuieh, Y. L., and Lou, C. H. (1947). Effects of 2,4-D on Seed Germination and Respiration. *Science* 105, 283–285. doi: 10.1126/SCIENCE.105.2724.283.
- Hu, Y., and Yu, D. (2014). BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in arabidopsis. *Plant Cell* 26, 4394–4408. doi: 10.1105/tpc.114.130849.
- Huang, Z., Footitt, S., Tang, A., and Finch-Savage, W. E. (2018a). Predicted global warming scenarios impact on the mother plant to alter seed dormancy and germination behaviour in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 41, 187–197. doi: 10.1111/PCE.13082.
- Huang, Z., Footitt, S., Tang, A., and Finch-Savage, W. E. (2018b). Predicted global warming scenarios impact on the mother plant to alter seed dormancy and germination behaviour in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 41, 187–197. doi: 10.1111/PCE.13082.
- Hussain, A., and Peng, J. (2003). DELLA Proteins and GA Signalling in Arabidopsis. *J Plant Growth Regul* 22, 134–140. doi: 10.1007/S00344-003-0028-5.

- Ibañez, C., Delker, C., Martinez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., et al. (2018). Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology* 28, 303-310.e3. doi: 10.1016/j.cub.2017.11.077.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., et al. (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* 13, 999–1010. doi: 10.1105/TPC.13.5.999.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Jacobsen, S. E., Binkowski, K. A., and Olszewski, N. E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9292–9296. doi: 10.1073/PNAS.93.17.9292.
- Jacobsen, S. E., and Olszewski, N. E. (1993). Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5, 887–896. doi: 10.1105/TPC.5.8.887.
- Jacobsen, J. v., Barrero, J. M., Hughes, T., Julkowska, M., Taylor, J. M., Xu, Q., et al. (2013). Roles for blue light, jasmonate and nitric oxide in the regulation of dormancy and germination in wheat grain (*Triticum aestivum* L.). *Planta* 238, 121–138. doi: 10.1007/S00425-013-1878-0.
- Jagadish, S. V. K., Murty, M. V. R., and Quick, W. P. (2015). Rice responses to rising temperatures--challenges, perspectives and future directions. *Plant Cell Environ* 38, 1686–1698. doi: 10.1111/PCE.12430.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z. L., Meyerowitz, E. M., et al. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* 25, 232–237. doi: 10.1101/GAD.2001911.
- Jander, G., and Joshi, V. (2009). Aspartate-Derived Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 7, e0121. doi: 10.1199/TAB.0121.
- Job, C., Rajjou, L., Lovigny, Y., Belghazi, M., and Job, D. (2005). Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 138, 790–802. doi: 10.1104/PP.105.062778.
- Kami, C., Hersch, M., Trevisan, M., Genoud, T., Hiltbrunner, A., Bergmann, S., et al. (2012). Nuclear phytochrome A signaling promotes phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 566–576. doi: 10.1105/TPC.111.095083.
- Kaushik, J. K., and Bhat, R. (2003). Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. *J Biol Chem* 278, 26458–26465. doi: 10.1074/JBC.M300815200.
- Kendall, S. L., Hellwege, A., Marriot, P., Whalley, C., Graham, I. A., and Penfield, S. (2011). Induction of dormancy in *Arabidopsis* summer annuals requires parallel regulation of DOG1 and hormone metabolism by low temperature and CBF transcription factors. *Plant Cell* 23, 2568–2580. doi: 10.1105/TPC.111.087643.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., and de Groot, A. (2000). Twenty years of brassinosteroids: Steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot* 86, 441–447. doi: 10.1006/anbo.2000.1227.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kim, T. W., Guan, S., Burlingame, A. L., and Wang, Z. Y. (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell* 43, 561–571. doi: 10.1016/J.MOLCEL.2011.05.037.
- Kim, T. W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J. X., et al. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 11, 1254–1260. doi: 10.1038/NCB1970.
- Kim, T. W., and Wang, Z. Y. (2010a). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61, 681–704. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.043008.092057.
- Kim, T. W., and Wang, Z. Y. (2010b). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61, 681–704. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.043008.092057.
- Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., et al. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433, 167–171. doi: 10.1038/NATURE03227.
- Koh, J. C. O., Barbulescu, D. M., Norton, S., Redden, B., Salisbury, P. A., Kaur, S., et al. (2017). A multiplex PCR for rapid identification of Brassica species in the triangle of U. *Plant Methods* 13. doi: 10.1186/S13007-017-0200-8.
- Kong, D., Ju, C., Parihar, A., Kim, S., Cho, D., and Kwak, J. M. (2015). Arabidopsis glutamate receptor homolog3.5 modulates cytosolic Ca<sup>2+</sup> level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. *Plant Physiol* 167, 1630–1642. doi: 10.1104/PP.114.251298.
- Koornneef, M., Bentsink, L., and Hilhorst, H. (2002). Seed dormancy and germination. *Curr Opin Plant Biol* 5, 33–36. doi: 10.1016/S1369-5266(01)00219-9.
- Koornneef, M., Jorna, M. L., Brinkhorst-van der Swan, D. L. C., and Karssen, C. M. (1982). The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor Appl Genet* 61, 385–393. doi: 10.1007/BF00272861.
- Koornneef, M., Reuling, G., and Karssen, C. M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 61, 377–383. doi: 10.1111/J.1399-3054.1984.TB06343.X.
- Koornneef, M., and van der Veen, J. H. (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theor Appl Genet* 58, 257–263. doi: 10.1007/BF00265176.
- Krishnamurthy, P., Muthusamy, M., Kim, J. A., Jeong, M. J., and Lee, S. I. (2019). Brassica rapa expansin-like B1 gene (BrEXLB1) regulate growth and development in transgenic *Arabidopsis* and elicits response to abiotic stresses. *J Plant Biochem Biotechnol* 28, 437–446. doi: 10.1007/S13562-019-00496-1/FIGURES/5.
- Kubala, S., Garnczarska, M., Wojtyła, Ł., Clippe, A., Kosmala, A., Zmieńko, A., et al. (2015). Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. *Plant Sci* 231, 94–113. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2014.11.008.
- Kucera, B., Cohn, M. A., and Leubner-Metzger, G. (2005). Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15, 281–307. doi: 10.1079/SSR2005218.

- Kudla, J., Batistič, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22, 541–563. doi: 10.1105/TPC.109.072686.
- Kushiro, T., Okamoto, M., Nakabayashi, K., Yamagishi, K., Kitamura, S., Asami, T., et al. (2004). The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J* 23, 1647–1656. doi: 10.1038/SJ.EMBOJ.7600121.
- Lamichaney, A., Parihar, A. K., Hazra, K. K., Dixit, G. P., Katiyar, P. K., Singh, D., et al. (2021). Untangling the Influence of Heat Stress on Crop Phenology, Seed Set, Seed Weight, and Germination in Field Pea (*Pisum sativum* L.). *Front Plant Sci* 12. doi: 10.3389/FPLS.2021.635868/FULL.
- Lamport, D. T. A., Varnai, P., and Seal, C. E. (2014). Back to the future with the AGP-Ca<sup>2+</sup> flux capacitor. *Ann Bot* 114, 1069–1085. doi: 10.1093/AOB/MCU161.
- Le, B. H., Cheng, C., Bui, A. Q., Wagmaister, J. A., Henry, K. F., Pelletier, J., et al. (2010). Global analysis of gene activity during Arabidopsis seed development and identification of seed-specific transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8063–8070. doi: 10.1073/PNAS.1003530107.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* 25, 1–18. doi: 10.18637/JSS.V025.I01.
- Lee, K. P., Piskurewicz, U., Turečková, V., Strnad, M., and Lopez-Molina, L. (2010). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19108–19113. doi: 10.1073/PNAS.1012896107.
- Lee, S., Cheng, H., King, K. E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., et al. (2002). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* 16, 646–658. doi: 10.1101/GAD.969002.
- Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., et al. (2006). Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. *Plant J* 45, 309–319. doi: 10.1111/J.1365-313X.2005.02622.X.
- Lellis, A. D., Allen, M. L., Aertker, A. W., Tran, J. K., Hillis, D. M., Harbin, C. R., et al. (2010). Deletion of the eIFiso4G subunit of the Arabidopsis eIFiso4F translation initiation complex impairs health and viability. *Plant Mol Biol* 74, 249–263. doi: 10.1007/S11103-010-9670-Z.
- Leubner-Metzger, G. (2001). Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. *Planta* 213, 758–763. doi: 10.1007/s004250100542.
- Leubner-Metzger, G. (2002). Seed after-ripening and over-expression of class I beta-1,3-glucanase confer maternal effects on tobacco testa rupture and dormancy release. *Planta* 215, 959–968. doi: 10.1007/S00425-002-0837-Y.
- Leubner-Metzger, G. (2005). beta-1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *Plant J* 41, 133–145. doi: 10.1111/J.1365-313X.2004.02284.X.
- Leymarie, J., Bruneaux, E., Gibot-Leclerc, S., and Corbineau, F. (2007). Identification of transcripts potentially involved in barley seed germination and dormancy using cDNA-AFLP. *J Exp Bot* 58, 425–437. doi: 10.1093/JXB/ERL211.

## BIBLIOGRAFÍA

- Li, D., Li, Y., Qian, J., Liu, X., Xu, H., Zhang, G., et al. (2021). Comparative Transcriptome Analysis Revealed Candidate Genes Potentially Related to Desiccation Sensitivity of Recalcitrant *Quercus variabilis* Seeds. *Front Plant Sci* 12. doi: 10.3389/FPLS.2021.717563.
- Li, F., Wu, X., Tsang, E., and Cutler, A. J. (2005). Transcriptional profiling of imbibed *Brassica napus* seed. *Genomics* 86, 718–730. doi: 10.1016/J.YGENO.2005.07.006.
- Li, H., Li, X., Wang, G., Zhang, J., and Wang, G. (2022). Analysis of gene expression in early seed germination of rice: landscape and genetic regulation. *BMC Plant Biol* 22. doi: 10.1186/S12870-022-03458-3.
- Li, J., and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929–938. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80357-8.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., and Walker, J. C. (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 213–222. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00812-7.
- Li, Q. F., Lu, J., Yu, J. W., Zhang, C. Q., He, J. X., and Liu, Q. Q. (2018a). The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1861, 561–571. doi: 10.1016/J.BBAGRM.2018.04.003.
- Li, Q. F., Wang, C., Jiang, L., Li, S., Sun, S. S. M., and He, J. X. (2012). An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in Arabidopsis. *Sci Signal* 5. doi: 10.1126/SCISIGNAL.2002908.
- Li, R., Jia, Y., Yu, L., Yang, W., Chen, Z., Chen, H., et al. (2018b). Nitric oxide promotes light-initiated seed germination by repressing PIF1 expression and stabilizing HFR1. *Plant Physiol Biochem* 123, 204–212. doi: 10.1016/J.PLAPHY.2017.11.012.
- Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., and Ohlrogge, J. (2006). Oil content of Arabidopsis seeds: the influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* 67, 904–915. doi: 10.1016/J.PHYTOCHEM.2006.02.015.
- Lim, S., Park, J., Lee, N., Jeong, J., Toh, S., Watanabe, A., et al. (2013). ABA-insensitive3, ABA-insensitive5, and DELLAs Interact to activate the expression of SOMNUS and other high-temperature-inducible genes in imbibed seeds in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4863–4878. doi: 10.1105/TPC.113.118604.
- Linkies, A., and Leubner-Metzger, G. (2011). Beyond gibberellins and abscisic acid: how ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Reports* 2011 31:2 31, 253–270. doi: 10.1007/S00299-011-1180-1.
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C. S. C., et al. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 21, 3803–3822. doi: 10.1105/TPC.109.070201.
- Lippmann, R., Babben, S., Menger, A., Delker, C., and Quint, M. (2019). Development of Wild and Cultivated Plants under Global Warming Conditions. *Current Biology* 29, R1326–R1338. doi: 10.1016/J.CUB.2019.10.016.
- Liu, J., and Zhu, J. K. (1997). An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14960–14964. doi: 10.1073/PNAS.94.26.14960.

- Liu, P. P., Montgomery, T. A., Fahlgren, N., Kasschau, K. D., Nonogaki, H., and Carrington, J. C. (2007). Repression of AUXIN RESPONSE FACTOR10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J* 52, 133–146. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03218.X.
- Liu, X., Hu, P., Huang, M., Tang, Y., Li, Y., Li, L., et al. (2016). The NF-YC-RGL2 module integrates GA and ABA signalling to regulate seed germination in Arabidopsis. *Nat Commun* 7. doi: 10.1038/NCOMMS12768.
- Liu, X., Zhang, H., Zhao, Y., Feng, Z., Li, Q., Yang, H. Q., et al. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15485–15490. doi: 10.1073/PNAS.1304651110.
- Liu, Y., and El-Kassaby, Y. A. (2017). Regulatory crosstalk between microRNAs and hormone signalling cascades controls the variation on seed dormancy phenotype at Arabidopsis thaliana seed set. *Plant Cell Rep* 36, 705–717. doi: 10.1007/S00299-017-2111-6.
- Liu, Y., and Zhang, J. (2009). Rapid accumulation of NO regulates ABA catabolism and seed dormancy during imbibition in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* 4, 905–907. doi: 10.4161/PSB.4.9.9532.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943–950. doi: 10.1242/DEV.086363.
- Locascio, A., Blázquez, M. A., and Alabadí, D. (2013). Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin-DELLA interaction. *Current Biology* 23, 804–809. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.053.
- Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., and Varotto, S. (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in Arabidopsis and maize: a focus on auxin. *Front Plant Sci* 5. doi: 10.3389/FPLS.2014.00412.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., and Chua, N. H. (2001). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4782–4787. doi: 10.1073/PNAS.081594298.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D. T., Chait, B. T., and Chua, N. H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J* 32, 317–328. doi: 10.1046/J.1365-313X.2002.01430.X.
- Lor, V. S., and Olszewski, N. E. (2015). GA signalling and cross-talk with other signalling pathways. *Essays Biochem* 58, 49–60. doi: 10.1042/BSE0580049.
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15. doi: 10.1186/S13059-014-0550-8.
- Lu, K., Wei, L., Li, X., Wang, Y., Wu, J., Liu, M., et al. (2019). Whole-genome resequencing reveals Brassica napus origin and genetic loci involved in its improvement. *Nat Commun* 10. doi: 10.1038/S41467-019-09134-9.
- Luo, T., Xian, M., Zhang, C., Zhang, C., Hu, L., and Xu, Z. (2019). Associating transcriptional regulation for rapid germination of rapeseed (*Brassica napus* L.) under low temperature stress through weighted gene co-expression network analysis. *Sci Rep* 9. doi: 10.1038/S41598-018-37099-0.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., et al. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064–1068. doi: 10.1126/SCIENCE.1172408.

## BIBLIOGRAFÍA

- Malabarba, J., Windels, D., Xu, W., and Verdier, J. (2021). Regulation of DNA (de)Methylation Positively Impacts Seed Germination during Seed Development under Heat Stress. *Genes (Basel)* 12. doi: 10.3390/GENES12030457.
- Malinovsky, F. G., Batoux, M., Schwessinger, B., Youn, J. H., Stransfeld, L., Win, J., et al. (2014). Antagonistic Regulation of Growth and Immunity by the Arabidopsis Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor HOMOLOG OF BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION2 INTERACTING WITH INCREASED LEAF INCLINATION1 BINDING bHLH1. *Plant Physiol* 164, 1443. doi: 10.1104/PP.113.234625.
- Marín-de la Rosa, N., Pfeiffer, A., Hill, K., Locascio, A., Bhalerao, R. P., Miskolczi, P., et al. (2015). Genome Wide Binding Site Analysis Reveals Transcriptional Coactivation of Cytokinin-Responsive Genes by DELLA Proteins. *PLoS Genet* 11. doi: 10.1371/JOURNAL.PGEN.1005337.
- Martel, C., Blair, L. K., and Donohue, K. (2018). PHYD prevents secondary dormancy establishment of seeds exposed to high temperature and is associated with lower PIL5 accumulation. *J Exp Bot* 69, 3157–3169. doi: 10.1093/JXB/ERY140.
- Martínez, C., Espinosa-Ruíz, A., Lucas, M., Bernardo-García, S., Franco-Zorrilla, J. M., and Prat, S. (2018). PIF 4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *EMBO J* 37. doi: 10.15252/embj.201899552.
- Martínez-Andújar, C., Ordiz, M. I., Huang, Z., Nonogaki, M., Beachy, R. N., and Nonogaki, H. (2011). Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in Arabidopsis thaliana seeds enhances seed dormancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17225–17229. doi: 10.1073/PNAS.1112151108.
- Martins, S., Montiel-Jorda, A., Cayrel, A., Huguet, S., Roux, C. P. le, Ljung, K., et al. (2017). Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat Commun* 8. doi: 10.1038/s41467-017-00355-4.
- Masubelele, N. H., Dewitte, W., Menges, M., Maughan, S., Collins, C., Huntley, R., et al. (2005). D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15694–15699. doi: 10.1073/PNAS.0507581102.
- Matakiadis, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J. P., et al. (2009). The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol* 149, 949–960. doi: 10.1104/PP.108.126938.
- Matar, S., Kumar, A., Holtgräwe, D., Weisshaar, B., and Melzer, S. (2021). The transition to flowering in winter rapeseed during vernalization. *Plant Cell Environ* 44, 506–518. doi: 10.1111/PCE.13946.
- McAinsh, M. R., and Pittman, J. K. (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol* 181, 275–294. doi: 10.1111/J.1469-8137.2008.02682.X.
- McGinnis, K. M., Thomas, S. G., Soule, J. D., Strader, L. C., Zale, J. M., Sun, T. P., et al. (2003). The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15, 1120–1130. doi: 10.1105/TPC.010827.
- Melan, M. A., Dong, X., Endara, M. E., Davis, K. R., Ausubel, F. M., and Peterman, T. K. (1993). An Arabidopsis thaliana lipoyxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 101, 441–450. doi: 10.1104/PP.101.2.441.

- Millar, A. A., Jacobsen, J. v., Ross, J. J., Helliwell, C. A., Poole, A. T., Scofield, G., et al. (2006). Seed dormancy and ABA metabolism in Arabidopsis and barley: the role of ABA 8'-hydroxylase. *Plant J* 45, 942–954. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.02659.X.
- Miller, S., Lesk, A. M., Janin, J., and Chothia, C. (1987). The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature* 328, 834–836. doi: 10.1038/328834A0.
- Miransari, M., and Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environ Exp Bot* 99, 110–121. doi: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2013.11.005.
- Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., et al. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *Plant J* 45, 804–818. doi: 10.1111/J.1365-313X.2005.02642.X.
- Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K. P., and Good, A. G. (2007). Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 49, 1108–1121. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.03023.X.
- Miyazono, K. I., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H. J., Asano, A., et al. (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* 462, 609–614. doi: 10.1038/NATURE08583.
- Mondo, V. H. V., Cicero S. M., Dourado-Neto D., Pupim T. L., Dias, M. A. N. (2013): Seed vigour and initial growth of corn crop. *Journal of Seed Science* 35, 64–69.
- Mondoni, A., Rossi, G., Orsenigo, S., and Probert, R. J. (2012). Climate warming could shift the timing of seed germination in alpine plants. *Ann Bot* 110, 155. doi: 10.1093/AOB/MCS097.
- Mora-García, S., Vert, G., Yin, Y., Caño-Delgado, A., Cheong, H., and Chory, J. (2004). Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes Dev* 18, 448–460. doi: 10.1101/GAD.1174204.
- Moreno, J. E., Moreno-Piovanio, G., and Chan, R. L. (2018). The antagonistic basic helix-loop-helix partners BEE and IBH1 contribute to control plant tolerance to abiotic stress. *Plant Science* 271, 143–150. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2018.03.024.
- Morita, S., Wada, H., and Matsue, Y. (2016). Countermeasures for heat damage in rice grain quality under climate change. *Plant Prod Sci* 19, 1–11. doi: 10.1080/1343943X.2015.1128114.
- Morrison, M. J., and Stewart, D. W. (2002). Heat Stress during Flowering in Summer Brassica. *Crop Sci* 42, 797–803. doi: 10.2135/CROPSCI2002.7970.
- Müller, K., Job, C., Belghazi, M., Job, D., and Leubner-Metzger, G. (2010). Proteomics reveal tissue-specific features of the cress (*Lepidium sativum* L.) endosperm cap proteome and its hormone-induced changes during seed germination. *Proteomics* 10, 406–416. doi: 10.1002/PMIC.200900548.
- Murase, K., Hirano, Y., Sun, T. P., and Hakoshima, T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456, 459–463. doi: 10.1038/NATURE07519.
- Muthusamy, M., Kim, J. Y., Yoon, E. K., Kim, J. A., and Lee, S. I. (2020). BrEXLB1, a Brassica rapa Expansin-Like B1 Gene Is Associated with Root Development, Drought Stress Response, and Seed Germination. *Genes (Basel)* 11. doi: 10.3390/GENES11040404.
- Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jap. J. Bot.* 7, 389–452.

## BIBLIOGRAFÍA

- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshihara, T., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant J* 41, 697–709. doi: 10.1111/J.1365-313X.2005.02337.X.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y. C., Park, S. H., Ueguchi-Tanaka, M., et al. (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 46, 880–889. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.02748.X.
- Nam, K. H., and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 203–212. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00814-0.
- Nambara, E., Akazawa, T., and McCourt, P. (1991). Effects of the Gibberellin Biosynthetic Inhibitor Uniconazol on Mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 97, 736. doi: 10.1104/PP.97.2.736.
- Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., and Kamiya, Y. (2010). Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci Res* 20, 55–67. doi: 10.1017/S0960258510000012.
- Newton, R. J., Hay, F. R., and Ellis, R. H. (2020). Temporal patterns of seed germination in early spring-flowering temperate woodland geophytes are modified by warming. *Ann Bot* 125, 1013–1023. doi: 10.1093/AOB/MCAA025.
- Nguyen, T. C. T., Obermeier, C., Friedt, W., Abrams, S. R., and Snowdon, R. J. (2016). Disruption of Germination and Seedling Development in *Brassica napus* by Mutations Causing Severe Seed Hormonal Imbalance. *Front Plant Sci* 7, 322. doi: 10.3389/FPLS.2016.00322.
- Nieuwland, J., Stamm, P., Wen, B., Randall, R. S., Murray, J. A. H., and Bassel, G. W. (2016). Re-induction of the cell cycle in the *Arabidopsis* post-embryonic root meristem is ABA-insensitive, GA-dependent and repressed by KRP6. *Sci Rep* 6. doi: 10.1038/SREP23586.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R., and Nešković, M. (2006). Effects of Cytokinins on In Vitro Seed Germination and Early Seedling Morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 25:3 25, 187–194. doi: 10.1007/S00344-005-0129-4.
- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., et al. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science* 326, 1373–1379. doi: 10.1126/SCIENCE.1181829.
- Nishimura, N., Yoshida, T., Kitahata, N., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2007). ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. *Plant J* 50, 935–949. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03107.X.
- Nolan, T. M., Vukasinović, N., Liu, D., Russinova, E., and Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. in *Plant Cell (American Society of Plant Biologists)*, 298–318. doi: 10.1105/tpc.19.00335.
- Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front Plant Sci* 5, 233. doi: 10.3389/FPLS.2014.00233/BIBTEX.
- Nonogaki, H. (2017). Seed Biology Updates - Highlights and New Discoveries in Seed Dormancy and Germination Research. *Front Plant Sci* 8. doi: 10.3389/FPLS.2017.00524.
- Nonogaki, H. (2019). Seed germination and dormancy: The classic story, new puzzles, and evolution. *J Integr Plant Biol* 61, 541–563. doi: 10.1111/JIPB.12762.

- Nonogaki, H., Bassel, G. W., and Bewley, J. D. (2010). Germination—Still a mystery. *Plant Science* 179, 574–581. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2010.02.010.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* 15, 1591–1604. doi: 10.1105/TPC.011650.
- Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., and Sano, H. (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* 245, 21–29. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00018-4.
- Ogé, L., Bourdais, G., Bove, J., BorisCollet, Godin, B., Granier, F., et al. (2008). Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase 1 is involved in both seed longevity and germination vigor in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 3022–3037. doi: 10.1105/TPC.108.058479.
- Oh, E., Kang, H., Yamaguchi, S., Park, J., Lee, D., Kamiya, Y., et al. (2009). Genome-wide analysis of genes targeted by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3-LIKE5 during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 403–419. doi: 10.1105/TPC.108.064691.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J. il, Kang, C., and Choi, G. (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16, 3045–3058. doi: 10.1105/TPC.104.025163.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., et al. (2007). PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 19, 1192–1208. doi: 10.1105/TPC.107.050153.
- Oh, E., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W. il, and Choi, G. (2006). Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *Plant J* 47, 124–139. doi: 10.1111/J.1365-313X.2006.02773.X.
- Okamoto, M., Kuwahara, A., Seo, M., Kushiro, T., Asami, T., Hirai, N., et al. (2006). CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141, 97–107. doi: 10.1104/PP.106.079475.
- Olszewski, N., Sun, T. P., and Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 Suppl. doi: 10.1105/TPC.010476.
- Oñate-Sánchez, L., and Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for Arabidopsis thaliana, including seeds and siliques. *BMC Res Notes* 1. doi: 10.1186/1756-0500-1-93.
- Oracz, K., Bouteau, H. E. M., Farrant, J. M., Cooper, K., Belghazi, M., Job, C., et al. (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J* 50, 452–465. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03063.X.
- Oracz, K., Voegelé, A., Tarkowská, D., Jacquemoud, D., Tureková, V., Urbanová, T., et al. (2012). Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol* 53, 81–95. doi: 10.1093/PCP/PCR124.
- Park, J., Lee, N., Kim, W., Lim, S., and Choi, G. (2011). ABI3 and PIL5 collaboratively activate the expression of SOMNUS by directly binding to its promoter in imbibed Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 23, 1404–1415. doi: 10.1105/TPC.110.080721.

## BIBLIOGRAFÍA

- Park, J., Nguyen, K. T., Park, E., Jeon, J. S., and Choi, G. (2013). DELLA proteins and their interacting RING Finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 927–943. doi: 10.1105/TPC.112.108951.
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., et al. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324, 1068–1071. doi: 10.1126/SCIENCE.1173041.
- Paszkwicz, G., Gualberto, J. M., Benamar, A., Macherel, D., and Logan, D. C. (2017). Arabidopsis Seed Mitochondria Are Bioenergetically Active Immediately upon Imbibition and Specialize via Biogenesis in Preparation for Autotrophic Growth. *Plant Cell* 29, 109–128. doi: 10.1105/TPC.16.00700.
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology* 27, R874–R878. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.050.
- Penfield, S., Gilday, A. D., Halliday, K. J., and Graham, I. A. (2006a). DELLA-mediated cotyledon expansion breaks coat-imposed seed dormancy. *Curr Biol* 16, 2366–2370. doi: 10.1016/J.CUB.2006.10.057.
- Penfield, S., Josse, E. M., Kannangara, R., Gilday, A. D., Halliday, K. J., and Graham, I. A. (2005). Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr Biol* 15, 1998–2006. doi: 10.1016/J.CUB.2005.11.010.
- Penfield, S., Li, Y., Gilday, A. D., Graham, S., and Graham, I. A. (2006b). Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell* 18, 1887–1899. doi: 10.1105/TPC.106.041277.
- Penfield, S., Rylott, E. L., Gilday, A. D., Graham, S., Larson, T. R., and Graham, I. A. (2004). Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell* 16, 2705–2718. doi: 10.1105/TPC.104.024711.
- Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., et al. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11, 3194. doi: 10.1101/GAD.11.23.3194.
- Peng, J., Richards, D. E., Moritz, T., Caño-Delgado, A., and Harberd, N. P. (1999). Extragenic suppressors of the Arabidopsis gai mutation alter the dose-response relationship of diverse gibberellin responses. *Plant Physiol* 119, 1199–1207. doi: 10.1104/PP.119.4.1199.
- Peng, P., Yan, Z., Zhu, Y., and Li, J. (2008). Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Mol Plant* 1, 338–346. doi: 10.1093/MP/SSN001.
- Perl, M. (1986). ATP synthesis and utilization in the early stage of seed germination in relation to seed dormancy and quality. *Physiol Plant* 66, 177–182. doi: 10.1111/J.1399-3054.1986.TB01253.X.
- Perry, D. A. (1978). PROBLEMS OF THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF VIGOUR TESTS TO VEGETABLE SEEDS. *Acta Horti*, 141–146. doi: 10.17660/ACTAHORTIC.1978.83.18.
- Piskurewicz, U., Jikumaru, Y., Kinoshita, N., Nambara, E., Kamiya, Y., and Lopez-Molina, L. (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by

- stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20, 2729–2745. doi: 10.1105/TPC.108.061515.
- Piskurewicz, U., and Lopez-Molina, L. (2009). The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant Signal Behav* 4, 63–65. doi: 10.4161/PSB.4.1.7331.
- Piskurewicz, U., Turečková, V., Lacombe, E., and Lopez-Molina, L. (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO J* 28, 2259–2271. doi: 10.1038/EMBOJ.2009.170.
- Powell, A. A., and Matthews, S. (1979). The Influence of Testa Condition on the Imbibition and Vigour of Pea Seeds. *J Exp Bot* 30, 193–197. doi: 10.1093/JXB/30.1.193.
- Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E., and Smith, S. M. (2005). Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell* 17, 2037–2048. doi: 10.1105/TPC.105.031856.
- Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., et al. (2009). Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of Arabidopsis thaliana seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol* 50, 1786–1800. doi: 10.1093/PCP/PCP121.
- Putri, G. H., Anders, S., Pyl, P. T., Pimanda, J. E., and Zanini, F. (2022). Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0. *Bioinformatics* 38, 2943–2945. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTAC166.
- Pysh, L. D., Wysocka-Diller, J. W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P. N. (1999). The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18, 111–119. doi: 10.1046/J.1365-313X.1999.00431.X.
- Qaseem, M. F., Qureshi, R., and Shaheen, H. (2019). Effects of Pre-Anthesis Drought, Heat and Their Combination on the Growth, Yield and Physiology of diverse Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes Varying in Sensitivity to Heat and drought stress. *Sci Rep* 9. doi: 10.1038/s41598-019-43477-z.
- Qian, W., Sass, O., Meng, J., Li, M., Frauen, M., and Jung, C. (2007). Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.): I. Crosses between spring and Chinese semi-winter lines. *Theoretical and Applied Genetics* 2007 115:1 115, 27–34. doi: 10.1007/S00122-007-0537-X.
- Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 85–93. doi: 10.1038/NRM728.
- Quint, M., Delker, C., Franklin, K. A., Wigge, P. A., Halliday, K. J., and van Zanten, M. (2016). Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nat Plants* 2. doi: 10.1038/NPLANTS.2015.190.
- Rademacher, W. (2020). Gibberellins: Metabolic Pathways and Inhibitors of Biosynthesis. *Target Sites of Herbicide Action*, 127–145. doi: 10.1201/9781003068280-7.
- Rahman, M., and McClean, P. (2013). Genetic Analysis on Flowering Time and Root System in *Brassica napus* L. *Crop Sci* 53, 141–147. doi: 10.2135/CROPSCI2012.02.0095.
- Rajjou, L., Duval, M., Gallardo, K., Catusse, J., Bally, J., Job, C., et al. (2012). Seed germination and vigor. *Annu Rev Plant Biol* 63, 507–533. doi: 10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042811-105550.

## BIBLIOGRAFÍA

- Rajjou, L., Gallardo, K., Debeaujon, I., Vandekerckhove, J., Job, C., and Job, D. (2004). The effect of alpha-amanitin on the Arabidopsis seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNAs during germination. *Plant Physiol* 134, 1598–1613. doi: 10.1104/PP.103.036293.
- Ravanel, S., Block, M. A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rébeillé, F., et al. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* 279, 22548–22557. doi: 10.1074/JBC.M313250200.
- Ravindran, P., Verma, V., Stamm, P., and Kumar, P. P. (2017). A Novel RGL2-DOF6 Complex Contributes to Primary Seed Dormancy in Arabidopsis thaliana by Regulating a GATA Transcription Factor. *Mol Plant* 10, 1307–1320. doi: 10.1016/J.MOLP.2017.09.004.
- Raz, V., Bergervoet, J. H. W., and Koornneef, M. (2001). Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* 128, 243–252. doi: 10.1242/DEV.128.2.243.
- Regnault, T., Davière, J.-M., Wild, M., Sakvarelidze-Achard, L., Heintz, D., Carrera Bergua, E., et al. (2015). The gibberellin precursor GA12 acts as a long-distance growth signal in Arabidopsis. *Nat Plants* 1. doi: 10.1038/NPLANTS.2015.73.
- Resentini, F., Felipo-Benavent, A., Colombo, L., Blázquez, M. A., Alabadí, D., and Masiero, S. (2015). TCP14 and TCP15 mediate the promotion of seed germination by gibberellins in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* 8, 482–485. doi: 10.1016/J.MOLP.2014.11.018.
- Reynolds, T., and Thompson, P. A. (1971). Characterisation of the High Temperature Inhibition of Germination of Lettuce (*Lactuca sativa*). *Physiol Plant* 24, 544–547. doi: 10.1111/J.1399-3054.1971.TB03532.X.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., and Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18, 40–54. doi: 10.1105/TPC.105.037796.
- Rizza, A., Walia, A., Lanquar, V., Frommer, W. B., and Jones, A. M. (2017). In vivo gibberellin gradients visualized in rapidly elongating tissues. *Nat Plants* 3, 803–813. doi: 10.1038/S41477-017-0021-9.
- Roberts, E. H. (1973). Predicting the storage life of seed. *Seed. Sci. Technol.* 1, 499–514.
- Rocha, M., Licausi, F., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Sodek, L., Fernie, A. R., et al. (2010). Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 152, 1501–1513. doi: 10.1104/PP.109.150045.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., and Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 837–858. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.56.032604.144208.
- Rombolá-Caldentey, B., Rueda-Romero, P., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., and Oñate-Sánchez, L. (2014). Arabidopsis DELLA and two HD-ZIP transcription factors regulate GA signaling in the epidermis through the L1 box cis-element. *Plant Cell* 26, 2905–2919. doi: 10.1105/TPC.114.127647.
- Romeiro Motta, M., Zhao, X., Pastuglia, M., Belcram, K., Roodbarkelari, F., Komaki, M., et al. (2022). B1-type cyclins control microtubule organization during cell division in Arabidopsis. *EMBO Rep* 23. doi: 10.15252/EMBR.202153995.

- Rueda-Romero, P., Barrero-Sicilia, C., Gómez-Cadenas, A., Carbonero, P., and Oñate-Sánchez, L. (2012). *Arabidopsis thaliana* DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14. *J Exp Bot* 63, 1937–1949. doi: 10.1093/JXB/ERR388.
- Ryu, H., Cho, H., Bae, W., and Hwang, I. (2014). Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nat Commun* 5. doi: 10.1038/ncomms5138.
- Saito, S., Hirai, N., Matsumoto, C., Ohigashi, H., Ohta, D., Sakata, K., et al. (2004). *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiol* 134, 1439–1449. doi: 10.1104/PP.103.037614.
- Sajeev, N., Bai, B., and Bentsink, L. (2019). Seeds: A Unique System to Study Translational Regulation. *Trends Plant Sci* 24, 487–495. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2019.03.011.
- Sakai, Y., Suriyasak, C., Inoue, M., Hamaoka, N., and Ishibashi, Y. (2022). Heat stress during grain filling regulates seed germination through alterations of DNA methylation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Molecular Biology* 2022, 1–8. doi: 10.1007/S11103-022-01278-5.
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., et al. (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science* 320, 1464. doi: 10.1126/SCIENCE.1153600.
- Sami, F., Faizan, M., Faraz, A., Siddiqui, H., Yusuf, M., and Hayat, S. (2018). Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide* 73, 22–38. doi: 10.1016/J.NIOX.2017.12.005.
- Sánchez-Montesino, R., Bouza-Morcillo, L., Marquez, J., Ghita, M., Duran-Nebreda, S., Gómez, L., et al. (2019). A Regulatory Module Controlling GA-Mediated Endosperm Cell Expansion Is Critical for Seed Germination in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 12, 71–85. doi: 10.1016/J.MOLP.2018.10.009.
- Sánchez-Montesino, R., and Oñate-Sánchez, L. (2017). Yeast One- and Two-Hybrid High-Throughput Screenings Using Arrayed Libraries. *Methods Mol Biol* 1629, 47–65. doi: 10.1007/978-1-4939-7125-1\_5.
- Sánchez-Montesino, R., and Oñate-Sánchez, L. (2018). Screening Arrayed Libraries with DNA and Protein Baits to Identify Interacting Proteins. *Methods Mol Biol* 1794, 131–149. doi: 10.1007/978-1-4939-7871-7\_9.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467. doi: 10.1073/PNAS.74.12.5463.
- Sano, N., Rajjou, L., and North, H. M. (2020). Lost in Translation: Physiological Roles of Stored mRNAs in Seed Germination. *Plants* 9. doi: 10.3390/PLANTS9030347.
- Sano, N., Rajjou, L., North, H. M., Debeaujon, I., Marion-Poll, A., and Seo, M. (2016). Staying alive: Molecular aspects of seed longevity. *Plant Cell Physiol* 57, 660–674. doi: 10.1093/pcp/pcv186.
- Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., et al. (2015). Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *J Exp Bot* 66, 2857–2868. doi: 10.1093/JXB/ERV213.
- Sasaki, A., Itoh, H., Gomi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Ishiyama, K., Kobayashi, M., et al. (2003). Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299, 1896–1898. doi: 10.1126/SCIENCE.1081077.

## BIBLIOGRAFÍA

- Schopfer, P. (2006). Biomechanics of plant growth. *Am J Bot* 93, 1415–1425. doi: 10.3732/AJB.93.10.1415.
- Schwender, J., Ohlrogge, J. B., and Shachar-Hill, Y. (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentosephosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J Biol Chem* 278, 29442–29453. doi: 10.1074/JBC.M303432200.
- Seo, K. I., Lee, J. H., Nezames, C. D., Zhong, S., Song, E., Byun, M. O., et al. (2014). ABD1 is an Arabidopsis DCAF substrate receptor for CUL4-DDB1-based E3 ligases that acts as a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 26, 695–711. doi: 10.1105/TPC.113.119974.
- Seo, M., Kanno, Y., Frey, A., North, H. M., and Marion-Poll, A. (2016). Dissection of Arabidopsis NCED9 promoter regulatory regions reveals a role for ABA synthesized in embryos in the regulation of GA-dependent seed germination. *Plant Sci* 246, 91–97. doi: 10.1016/J.PLANTSCI.2016.02.013.
- Seo, M., and Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7, 41–48. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02187-2.
- She, J., Han, Z., Kim, T. W., Wang, J., Cheng, W., Chang, J., et al. (2011). Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* 474, 472–477. doi: 10.1038/NATURE10178.
- Shen-Miller, J., Schopf, J. W., Harbottle, G., Cao, R. J., Ouyang, S., Zhou, K. S., et al. (2002). Long-living lotus: germination and soil {gamma}-irradiation of centuries-old fruits, and cultivation, growth, and phenotypic abnormalities of offspring. *Am J Bot* 89, 236–247. doi: 10.3732/AJB.89.2.236.
- Shi, H., Zhong, S., Mo, X., Liu, N., Nezames, C. D., and Deng, X. W. (2013). HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 3770–3784. doi: 10.1105/TPC.113.117424.
- Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., et al. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456, 520–523. doi: 10.1038/NATURE07546.
- Shin, Y. K., Yum, H., Kim, E. S., Cho, H., Gothandam, K. M., Hyun, J., et al. (2006). BcXTH1, a *Brassica campestris* homologue of Arabidopsis XTH9, is associated with cell expansion. *Planta* 224, 32–41. doi: 10.1007/S00425-005-0189-5.
- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., and He, Z. H. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Mol Plant* 9, 34–45. doi: 10.1016/J.MOLP.2015.08.010.
- Shu, K., Meng, Y. J., Shuai, H. W., Liu, W. G., Du, J. B., Liu, J., et al. (2015). Dormancy and germination: How does the crop seed decide? *Plant Biol (Stuttg)* 17, 1104–1112. doi: 10.1111/PLB.12356.
- Silva-Correia, J., Freitas, S., Tavares, R. M., Lino-Neto, T., and Azevedo, H. (2014). Phenotypic analysis of the Arabidopsis heat stress response during germination and early seedling development. *Plant Methods* 10, 7. doi: 10.1186/1746-4811-10-7.
- Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., and Sun, T. P. (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* 10, 155–169. doi: 10.1105/TPC.10.2.155.
- Silverstone, A. L., Jung, H.-S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y., and Sun, T. (2001). Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1555–1566. doi: 10.1105/TPC.010047.

- Silverstone, A. L., Mak, P. Y. A., Martínez, E. C., and Sun, T. P. (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 146, 1087–1099. doi: 10.1093/GENETICS/146.3.1087.
- Silverstone, A. L., Tseng, T. S., Swain, S. M., Dill, A., Sun, Y. J., Olszewski, N. E., et al. (2007). Functional analysis of SPINDLY in gibberellin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143, 987–1000. doi: 10.1104/PP.106.091025.
- Sjöström, E. (1981). *Wood chemistry : fundamentals and applications*. 223.
- Sliwiska, E., Bassel, G. W., and Bewley, J. D. (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *J Exp Bot* 60, 3587–3594. doi: 10.1093/JXB/ERP203.
- Smiri, M., Chaoui, A., and el Ferjani, E. (2009). Respiratory metabolism in the embryonic axis of germinating pea seed exposed to cadmium. *J Plant Physiol* 166, 259–269. doi: 10.1016/J.JPLPH.2008.05.006.
- Smolikova, G., Strygina, K., Krylova, E., Leonova, T., Frolov, A., Khlestkina, E., et al. (2021). Transition from Seeds to Seedlings: Hormonal and Epigenetic Aspects. *Plants (Basel)* 10. doi: 10.3390/PLANTS10091884.
- Soeda, Y., Konings, M. C. J. M., Vorst, O., van Houwelingen, A. M. M. L., Stoop, G. M., Maliepaard, C. A., et al. (2005). Gene Expression Programs during Brassica oleracea Seed Maturation, Osmopriming, and Germination Are Indicators of Progression of the Germination Process and the Stress Tolerance Level. *Plant Physiol* 137, 354. doi: 10.1104/PP.104.051664.
- Song, P., Jia, Q., Xiao, X., Tang, Y., Liu, C., Li, W., et al. (2021). HSP70-3 Interacts with Phospholipase D $\delta$  and Participates in Heat Stress Defense. *Plant Physiol* 185, 1148–1165. doi: 10.1093/PLPHYS/KIAA083.
- Spoelstra, P., Joosen, R. V. L., Plas, L. H. W. van der, and Hilhorst, H. W. M. (2002). The distribution of ATP within tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) embryos correlates with germination whereas total ATP concentration does not. *Seed Sci Res* 12, 231–238. doi: 10.1079/SSR2002114.
- Stamm, P., Ravindran, P., Mohanty, B., Tan, E. L., Yu, H., and Kumar, P. P. (2012). Insights into the molecular mechanism of RGL2-mediated inhibition of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 12. doi: 10.1186/1471-2229-12-179.
- Stamm, P., Topham, A. T., Mukhtar, N. K., Jackson, M. D. B., Tomé, D. F. A., Beynon, J. L., et al. (2017). The Transcription Factor ATHB5 Affects GA-Mediated Plasticity in Hypocotyl Cell Growth during Seed Germination. *Plant Physiol* 173, 907. doi: 10.1104/PP.16.01099.
- Stavang, J. A., Gallego-Bartolomé, J., Gómez, M. D., Yoshida, S., Asami, T., Olsen, J. E., et al. (2009). Hormonal regulation of temperature-induced growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 60, 589–601. doi: 10.1111/J.1365-313X.2009.03983.X.
- Steber, C. M., Ariizumi, T., Hauvermale, A. L., Nelson, S. K., Hanada, A., and Yamaguchi, S. (2013). Lifting della repression of *Arabidopsis* seed germination by nonproteolytic gibberellin signaling. *Plant Physiol* 162, 2125–2139. doi: 10.1104/PP.113.219451.
- Steber, C. M., and McCourt, P. (2001). A Role for Brassinosteroids in Germination in *Arabidopsis* 1. Available at: <https://academic.oup.com/plphys/article/125/2/763/6099781>.
- Steinbrecher, T., and Leubner-Metzger, G. (2017). The biomechanics of seed germination. *J Exp Bot* 68, 765–783. doi: 10.1093/JXB/ERW428.

## BIBLIOGRAFÍA

- Strasser, B., Sánchez-Lamas, M., Yanovsky, M. J., Casal, J. J., and Cerdán, P. D. (2010). Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4776–4781. doi: 10.1073/PNAS.0910446107.
- Sun, F., Fan, G., Hu, Q., Zhou, Y., Guan, M., Tong, C., et al. (2017). The high-quality genome of Brassica napus cultivar ‘ZS11’ reveals the introgression history in semi-winter morphotype. *The Plant Journal* 92, 452–468. doi: 10.1111/TPJ.13669.
- Sun, T. (2008). Gibberellin Metabolism, Perception and Signaling Pathways in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* 6, e0103. doi: 10.1199/TAB.0103.
- Sun, T. P. (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol* 21. doi: 10.1016/J.CUB.2011.02.036.
- Sun, T. P., and Kamiya, Y. (1994). The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 6, 1509–1518. doi: 10.1105/TPC.6.10.1509.
- Sun, Y., Fan, X. Y., Cao, D. M., Tang, W., He, K., Zhu, J. Y., et al. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* 19, 765–777. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2010.10.010.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., and Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 6. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0021800.
- Talon, M., Koornneef, M., and Zeevaart, J. A. D. (1990). Endogenous gibberellins in Arabidopsis thaliana and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf ga4 and ga5 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7983–7987. doi: 10.1073/PNAS.87.20.7983.
- Tam, Y. Y., Epstein, E., and Normanly, J. (2000). Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol* 123, 589–595. doi: 10.1104/PP.123.2.589.
- Tang, W., Kim, T. W., Osés-Prieto, J. A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., et al. (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. *Science* 321, 557–560. doi: 10.1126/SCIENCE.1156973.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Osés-Prieto, J. A., et al. (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* 13, 124–131. doi: 10.1038/NCB2151.
- Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2008). Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 53, 42–52. doi: 10.1111/J.1365-313X.2007.03308.X.
- TeKrony, D. M., and Egli, D. B. (1991). Relationship of Seed Vigor to Crop Yield: A Review. *Crop Sci* 31, 816–822. doi: 10.2135/CROPSCI1991.0011183X003100030054X.
- Telfer, A., Bollman, K. M., and Poethig, R. S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in Arabidopsis thaliana. *Development* 124, 645–654. doi: 10.1242/DEV.124.3.645.
- Thole, J. M., Beisner, E. R., Liu, J., Venkova, S. v., and Strader, L. C. (2014). Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in Arabidopsis thaliana. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 4, 1259–1274. doi: 10.1534/G3.114.011080/-/DC1/TABLES3.PDF.
- Thomas, S. G., Blázquez, M. A., and Alabadí, D. (2016). DELLA Proteins: Master Regulators of Gibberellin-Responsive Growth and Development. *Annual Plant Reviews: The Gibberellins* 49, 189–228. doi: 10.1002/9781119210436.CH7.

- Thompson, A. J., Jackson, A. C., Symonds, R. C., Mulholland, B. J., Dadswell, A. R., Blake, P. S., et al. (2000). Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes overproduction of abscisic acid. *Plant J* 23, 363–374. doi: 10.1046/J.1365-313X.2000.00789.X.
- Tognacca, R. S., and Botto, J. F. (2021). Post-transcriptional regulation of seed dormancy and germination: Current understanding and future directions. *Plant Commun* 2. doi: 10.1016/J.XPLC.2021.100169.
- Toh, S., Imamura, A., Watanabe, A., Nakabayashi, K., Okamoto, M., Jikumaru, Y., et al. (2008). High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in Arabidopsis seeds. *Plant Physiol* 146, 1368–1385. doi: 10.1104/PP.107.113738.
- Toh, S., Kamiya, Y., Kawakami, N., Nambara, E., McCourt, P., and Tsuchiya, Y. (2012). Thermoinhibition uncovers a role for strigolactones in Arabidopsis seed germination. *Plant Cell Physiol* 53, 107–117. doi: 10.1093/PCP/PCR176.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P. H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15, 1749–1770. doi: 10.1105/TPC.013839.
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., et al. (2008). High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 1494. doi: 10.1105/TPC.107.056069.
- Tyler, L., Thomas, S. G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J. M., Ecker, J. R., et al. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 135, 1008–1019. doi: 10.1104/PP.104.039578.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., et al. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693–698. doi: 10.1038/NATURE04028.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., et al. (2007). Molecular Interactions of a Soluble Gibberellin Receptor, GID1, with a Rice DELLA Protein, SLR1, and Gibberellin. *Plant Cell* 19, 2140–2155. doi: 10.1105/TPC.106.043729.
- Vaistij, F. E., Barros-Galvão, T., Cole, A. F., Gilday, A. D., He, Z., Li, Y., et al. (2018). MOTHER-OF-FT-AND-TFL1 represses seed germination under far-red light by modulating phytohormone responses in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 8442–8447. doi: 10.1073/PNAS.1806460115/-/DCSUPPLEMENTAL.
- Vaistij, F. E., Gan, Y., Penfield, S., Gilday, A. D., Dave, A., He, Z., et al. (2013). Differential control of seed primary dormancy in Arabidopsis ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 10866–10871. doi: 10.1073/PNAS.1301647110.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005–1016. doi: 10.1016/J.CELL.2009.03.001.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2013). Calcium: The Missing Link in Auxin Action. *Plants (Basel)* 2, 650–675. doi: 10.3390/PLANTS2040650.
- Vázquez-Ramos, J. M., and Sánchez, M. de la P. (2003). The cell cycle and seed germination. *Seed Sci Res* 13, 113–130. doi: 10.1079/SSR2003130.
- Vera-Sirera, F., Gomez, M. D., & Perez-Amador, M. A. (2016). DELLA Proteins, a Group of GRAS Transcription Regulators that Mediate Gibberellin Signaling. *Plant Transcription Factors:*

## BIBLIOGRAFÍA

- Evolutionary, Structural and Functional Aspects, 313–328. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800854-6.00020-8>
- Vicente-Carbajosa, J., and Carbonero, P. (2005). Seed maturation: developing an intrusive phase to accomplish a quiescent state. *Int J Dev Biol* 49, 645–651. doi: 10.1387/IJDB.052046JC.
- Vishal, B., and Kumar, P. P. (2018). Regulation of Seed Germination and Abiotic Stresses by Gibberellins and Abscisic Acid. *Front Plant Sci* 9. doi: 10.3389/FPLS.2018.00838.
- Voegele, A., Linkies, A., Müller, K., and Leubner-Metzger, G. (2011). Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot* 62, 5131–5147. doi: 10.1093/JXB/ERR214.
- Vu, L. D., Gevaert, K., and de Smet, I. (2019). Feeling the Heat: Searching for Plant Thermosensors. *Trends Plant Sci* 24, 210–219. doi: 10.1016/J.TPLANTS.2018.11.004.
- Wagner M.-H., Demilly D., Ducournau S., Dürr C., Léchappé J. (2011). Computer vision for monitoring seed germination from dry state to young seedlings. *seed Test. Int.* 142, 49–51.
- Wakao, S., Andre, C., and Benning, C. (2008). Functional analyses of cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenases and their contribution to seed oil accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146, 277–288. doi: 10.1104/PP.107.108423.
- Waldron, K. W., and Faulds, C. B. (2007). Cell Wall Polysaccharides: Composition and Structure. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology* 1–4, 181–201. doi: 10.1016/B978-044451967-2/00005-2.
- Wang, H., Yang, C., Zhang, C., Wang, N., Lu, D., Wang, J., et al. (2011a). Dual role of *BKI1* and *14-3-3 s* in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev Cell* 21, 825–834. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2011.08.018.
- Wang, X., and Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of *BKI1*, a negative regulator of *BRI1* signaling, from the plasma membrane. *Science* 313, 1118–1122. doi: 10.1126/SCIENCE.1127593.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M. B., et al. (2008). Sequential transphosphorylation of the *BRI1/BAK1* receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* 15, 220–235. doi: 10.1016/J.DEVCEL.2008.06.011.
- Wang, X., Wang, H., Wang, J., Sun, R., Wu, J., Liu, S., et al. (2011b). The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat Genet* 43, 1035–1040. doi: 10.1038/NG.919.
- Wang, X., Zhang, M. M., Wang, Y. J., Gao, Y. T., Li, R., Wang, G. F., et al. (2016a). The plasma membrane NADPH oxidase *OsRbohA* plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice. *Physiol Plant* 156, 421–443. doi: 10.1111/ppl.12389.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Zhao, S., Liu, Z., Feng, Y. Q., et al. (2011c). Cytokinin antagonizes ABA suppression to seed germination of *Arabidopsis* by downregulating *ABI5* expression. *Plant J* 68, 249–261. doi: 10.1111/J.1365-313X.2011.04683.X
- Wang, Z., Chen, F., Li, X., Cao, H., Ding, M., Zhang, C., et al. (2016b). *Arabidopsis* seed germination speed is controlled by SNL histone deacetylase-binding factor-mediated regulation of *AUX1*. *Nat Commun* 7. doi: 10.1038/NCOMMS13412.

- Wang, Z., Chen, F., Li, X., Cao, H., Ding, M., Zhang, C., et al. (2016c). Arabidopsis seed germination speed is controlled by SNL histone deacetylase-binding factor-mediated regulation of AUX1. *Nat Commun* 7. doi: 10.1038/NCOMMS13412.
- Wang, Z. Y., Bai, M. Y., Oh, E., and Zhu, J. Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 46, 701–724. doi: 10.1146/ANNUREV-GENET-102209-163450.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380–383. doi: 10.1038/35066597.
- Waterworth, W. M., Footitt, S., Bray, C. M., Finch-Savage, W. E., and West, C. E. (2016). DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 9647–9652. doi: 10.1073/PNAS.1608829113.
- Waterworth, W. M., Masnavi, G., Bhardwaj, R. M., Jiang, Q., Bray, C. M., and West, C. E. (2010). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* 63, 848–860. doi: 10.1111/J.1365-313X.2010.04285.X.
- Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., and Vierling, E. (1996). Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol* 112, 747–757. doi: 10.1104/PP.112.2.747.
- Weitbrecht, K., Müller, K., and Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *J Exp Bot* 62, 3289–3309. doi: 10.1093/JXB/ERR030.
- Wen, C. K., and Chang, C. (2002). Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* 14, 87–100. doi: 10.1105/TPC.010325.
- Whistler, R. L. (1993). HEMICELLULOSES. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives: Third Edition*, 295–308. doi: 10.1016/B978-0-08-092654-4.50015-2.
- White, C. N., Proebsting, W. M., Hedden, P., and Rivin, C. J. (2000). Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiol* 122, 1081–1088. doi: 10.1104/PP.122.4.1081.
- Wickham H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Wilens, R. W., van Rooijen, G. J. H., Pearce, D. W., Pharis, R. P., Holbrook, L. A., and Moloney, M. M. (1991). Effects of Jasmonic Acid on Embryo-Specific Processes in Brassica and Linum Oilseeds. *Plant Physiol* 95, 399. doi: 10.1104/PP.95.2.399.
- Willför, S., Pranovich, A., Tamminen, T., Puls, J., Laine, C., Suurnäkki, A., et al. (2009). Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Ind Crops Prod* 29, 571–580. doi: 10.1016/J.INDCROP.2008.11.003.
- Willige, B. C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E. M. N., Maier, A., et al. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1209–1220. doi: 10.1105/TPC.107.051441.
- Willis, C. G., Baskin, C. C., Baskin, J. M., Auld, J. R., Venable, D. L., Cavender-Bares, J., et al. (2014). The evolution of seed dormancy: environmental cues, evolutionary hubs, and diversification of the seed plants. *New Phytol* 203, 300–309. doi: 10.1111/NPH.12782.

## BIBLIOGRAFÍA

- Willmann, M. R., Mehalick, A. J., Packer, R. L., and Jenik, P. D. (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 155, 1871–1884. doi: 10.1104/PP.110.171355.
- Xi, W., Liu, C., Hou, X., and Yu, H. (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22, 1733–1748. doi: 10.1105/TPC.109.073072.
- Xiong, M., Yu, J., Wang, J., Gao, Q., Huang, L., Chen, C., et al. (2022). Brassinosteroids regulate rice seed germination through the BZR1-RAmy3D transcriptional module. *Plant Physiol* 189, 402–418. doi: 10.1093/PLPHYS/KIAC043.
- Xu, H., Lantzouni, O., Bruggink, T., Benjamins, R., Lanfermeijer, F., Denby, K., et al. (2020a). A Molecular Signal Integration Network Underpinning *Arabidopsis* Seed Germination. *Current Biology* 30, 3703. doi: 10.1016/J.CUB.2020.07.012.
- Xu, P., Tang, G., Cui, W., Chen, G., Ma, C. le, Zhu, J., et al. (2020b). Transcriptional Differences in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seeds at the Freshly Harvested, After-ripening and Newly Germinated Seed Stages: Insights into the Regulatory Networks of Seed Dormancy Release and Germination. *PLoS One* 15. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0219413.
- Xu, X., Kathare, P. K., Pham, V. N., Bu, Q., Nguyen, A., and Huq, E. (2017). Reciprocal proteasome-mediated degradation of PIFs and HFR1 underlies photomorphogenic development in *Arabidopsis*. *Development* 144, 1831–1840. doi: 10.1242/DEV.146936.
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59, 225–251. doi: 10.1146/ANNUREV.ARPLANT.59.032607.092804.
- Yamaguchi, S., Smith, M. W., Brown, R. G. S., Kamiya, Y., and Sun Tai-ping (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell* 10, 2115–2126. doi: 10.1105/TPC.10.12.2115.
- Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S. (2004). Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16, 367–378. doi: 10.1105/TPC.018143.
- Yan, A., Wu, M., Yan, L., Hu, R., Ali, I., and Gan, Y. (2014a). AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*. *PLoS One* 9. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0085208.
- Yan, D., Duermeyer, L., Leoveanu, C., and Nambara, E. (2014b). The functions of the endosperm during seed germination. *Plant Cell Physiol* 55, 1521–1533. doi: 10.1093/pcp/pcu089.
- Yang, J., Liu, D., Wang, X., Ji, C., Cheng, F., Liu, B., et al. (2016). The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection. *Nat Genet* 48, 1225–1232. doi: 10.1038/NG.3657.
- Ye, N., Zhu, G., Liu, Y., Zhang, A., Li, Y., Liu, R., et al. (2012). Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *J Exp Bot* 63, 1809–1822. doi: 10.1093/JXB/ERR336.
- Yephremov, A., Wisman, E., Huijser, P., Huijser, C., Wellesen, K., and Saedler, H. (1999). Characterization of the FIDDLEHEAD gene of *Arabidopsis* reveals a link between adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *Plant Cell* 11, 2187–2201. doi: 10.1105/TPC.11.11.2187.

- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120, 249–259. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.044.
- Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K., et al. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7861–7866. doi: 10.1073/PNAS.1321669111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201321669SI.PDF.
- Yoshioka, T., Endo, T., and Satoh, S. (1998). Restoration of Seed Germination at Supraoptimal Temperatures by Fluridone, an Inhibitor of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 39, 307–312. doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.PCP.A029371.
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., et al. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 65, 634–646. doi: 10.1111/J.1365-313X.2010.04449.X.
- Zhang, Z. L., Ogawa, M., Fleet, C. M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J. O., et al. (2011). SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2160–2165. doi: 10.1073/PNAS.1012232108/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201012232SI.PDF.
- Zhao, X., Dou, L., Gong, Z., Wang, X., and Mao, T. (2019). BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in Arabidopsis. *New Phytologist* 221, 908–918. doi: 10.1111/nph.15437.
- Zhong, C., Patra, B., Tang, Y., Li, X., Yuan, L., and Wang, X. (2021). A transcriptional hub integrating gibberellin–brassinosteroid signals to promote seed germination in Arabidopsis. *J Exp Bot* 72, 4708. doi: 10.1093/JXB/ERAB192.
- Zhou, X., Yuan, F., Wang, M., Guo, A., Zhang, Y., and Xie, C. G. (2013). Molecular characterization of an ABA insensitive 5 orthologue in Brassica oleracea. *Biochem Biophys Res Commun* 430, 1140–1146. doi: 10.1016/J.BBRC.2012.12.023.



## ANEXO II

---

### Tablas suplementarias



- **Tabla\_Suplementaria\_3:** Datos del ensayo de germinación realizado con las 6 variedades de invierno de *B. napus*.
- **Tabla\_Suplementaria\_4:** Cuantificación de los rasgos de germinación, niveles de metabolitos y niveles hormonales de las 6 variedades de invierno de *B. napus*.
- **Tabla\_Suplementaria\_5:** Análisis de los datos transcriptómicos durante la germinación de las variedades de invierno de *B. napus* estudiadas.