



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**“Participación de la glutamato-carboxipeptidasa ALTERED
MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1) en el desarrollo de la semilla y la
diferenciación epidérmica en *Arabidopsis thaliana*”**

Que presenta:

QFB. Claudia Marina López García

Como requisito para obtener el título de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Director de tesis:

Dr. en Ciencias: José López Bucio

Morelia, Mich., Octubre de 2015

Esta tesis está dedicada a mi hijo

Diego Daniel López García.

El presente trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
bajo la asesoría del D. C. José López Bucio

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A mi comité sinodal conformado por los doctores Elda Beltrán Peña, Ernesto García Pineda, Lourdes Macías Rodríguez y Eduardo Valencia Cantero por sus aportaciones a este trabajo.

A mi asesor el D.C. José López Bucio por aceptarme en su grupo de trabajo, guiarme durante la realización de mi tesis, pero sobre todo por transmitirnos esa pasión que siente por lo que hace cada día y la importancia del trabajo en equipo.

Al M.C. Jesús Salvador López Bucio por sus aportaciones a mi trabajo y al M.C. Javier Raya González, mi *sent seit* que además de sus contribuciones me compartió sus conocimientos y estuvo siempre a mi lado para ayudarme con mi trabajo.

Al D.C. Víctor López Morelos del Instituto de Investigaciones Metalúrgicas de la UMSNH por el permiso para utilizar el microscopio electrónico y al Ing. José Antonio Rodríguez Torres por ayudarnos a tomar las fotografías para el análisis de testa de las semillas.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de biología del desarrollo vegetal que hicieron mi estancia allí muy agradable y me apoyaron tanto en lo personal como en lo laboral: Ramón que cuando no estaba mi *sent seit* me apoyaba, León que siempre tiene buenas sugerencias en el trabajo, Salvador que me espero muchas veces en durante los ensayos de germinación, al club de mamás Amy y Edith, el amigo que siempre nos salva de la manera en que solo él puede hacer, Aarón, que sería de mi si no controlara mi computadora cuando se rebela. A Jano y Gus porque siempre tienen disponibilidad para ayudar en lo que sea, a César por alinear mis chacras, por todos esos jueves a las “chicas”: Liz con todas sus atenciones, la pequeña Lupis (mi incondicional), a Sarahí “la nueva hermanita” del laboratorio que ya nos acompaña en nuestras aventuras y Viry que siempre está allí

a un ladito para apoyarme con toda su sinceridad y locura, a pesar de que relativamente tengo poco tiempo de conocerla se ha convertido en una gran amiga.

También quiero agradecer a esas personas que son como una roca para mí porque siempre me han apoyado en todo lo que hago, mi amiga Valery que ha estado en las buenas y en las malas, que pesar de que la distancia nos separe siempre está cerca de alguna manera y especialmente a mi familia, Martha y Mariana mis hermanas, por ser eso, hermanas, personas con las que aprendes, compartes y te acompañan, con quienes peleas gran parte del tiempo y que defiendes con coraje ante cualquier cosa, a mis papás Javier López y Martha García que me han guiado a lo largo de la vida, me han dado su cariño incondicional a mí y ahora también a mi amado hijo Diego Daniel, luz de mis ojos y más grande motivación y finalmente a Dios por poner en mi camino a todas esas grandes personas que han marcado mi vida, muchas de las cuales se encuentran en esta lista de agradecimientos.

RESUMEN

Las semillas representan un medio de propagación y de protección ante condiciones ambientales adversas. Durante el desarrollo de la semilla se establecen programas genéticos que relacionan la morfogénesis del embrión con la estructura de la testa, los integumentos y la epidermis. Durante la germinación, la raíz genera los pelos radiculares y posteriormente, cuando emergen las hojas verdaderas, éstas producen tricomas, ambas estructuras pelos radiculares y tricomas se forman mediante el proceso de diferenciación celular epidérmica.

En este trabajo se investigó la participación del gen *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)* que codifica para una glutamato-carboxipeptidasa, en el desarrollo del embrión, la formación semilla y la diferenciación celular epidérmica. La comparación de la semilla en plantas silvestres y mutantes *amp1* mostró alteraciones en las mutantes definidas por su fenotipo como “regulares”, “rugosas”, “irregulares” y “protrusivas”. Las alteraciones mostradas por las diferentes clases de semillas de *amp1* están relacionadas con el proceso de germinación y la formación de pelos radiculares y tricomas. Estos datos sugieren que la proteína AMP1 es necesaria para coordinar el desarrollo del embrión y la testa y además juega un importante papel en el establecimiento de los patrones de diferenciación de la epidermis tanto en la raíz como en las hojas.

Palabras clave: *Arabidopsis*, diferenciación celular, tricomas, testa, pelos radiculares.

ABSTRACT

Seeds are important for dispersal and embryo protection against adverse environmental conditions. During seed development, genetic programs are established, which relate embryo morphogenesis with the structure of the testa, integuments and epidermis. During germination, roots produce root hairs, whereas trichomes are formed in leaves through the cell differentiation process.

In this work, it was investigated the participation of *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)* gene, which encodes a glutamate carboxypeptidase, in embryo development, seed formation and epidermal cell differentiation. WT and *amp1* mutant comparisons revealed that mutations in *AMP1* cause alterations on seed production, seed coat structure and embryo development as *amp1* mutants display four distinct and stable seed phenotypes defined as “regular”, “raisin”, “irregular” and “burst” seeds. The alterations on *amp1* seeds cause delay in germination and affects root hair and trichome development. Our data suggest that AMP1 is necessary for the normal seed coat and embryo establishment during seed development and plays an important role in epidermal cell differentiation in roots and in leaves.

Keywords: *Arabidopsis*, cell differentiation, seed coat, root hairs, trichomes.

INDICE

Página

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
INDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Planta modelo, <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
2.2. Desarrollo de la semilla	5
2.2.1. Fertilización de las flores	5
2.2.2. Embriogénesis en <i>Arabidopsis</i>	7
2.2.3. Maduración de la semilla.	8
2.3. Desarrollo del endospermo	9
2.4. Diferenciación de la testa	13
2.5. Genes involucrados en la regulación del desarrollo de la semilla	18
2.6. Germinación	19
2.6.1. Regulación de la germinación.....	20
2.6.2. Regulación hormonal de la germinación	21
2.7. Establecimiento de la plántula.....	27
2.7.1. Diferenciación de la epidermis en <i>Arabidopsis</i>	27
2.7.2. Desarrollo de pelos radiculares.....	28
2.7.3. Desarrollo de tricomas.	29
2.8. Péptidos como reguladores de crecimiento y desarrollo.	30
2.9. <i>ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)</i>	31
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general.....	36
5.2. Objetivos específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37

6.1. Material biológico.....	37
6.2. Microscopía.....	37
6.3. Microscopía electrónica.....	37
6.4. Detección de mucílago.....	37
6.5. Preparación de las semillas.....	38
6.6. Preparación del medio de cultivo.....	38
6.7. Condiciones de crecimiento.....	38
6.8. Análisis de pelos radiculares, tricomas y silicuas.....	38
6.9. Ensayo de germinación.....	39
6.10. Análisis de embriones.....	39
6.11. Análisis de datos.....	39
7. RESULTADOS	40
7.1. La mutación en <i>AMP1</i> afecta el tamaño del fruto y la producción de semillas.....	40
7.2. Las semillas de <i>amp1</i> muestran defectos en la estructura de la testa y producción de mucílago.....	46
7.3. Relación entre el desarrollo de la testa y el embrión en la mutante <i>amp1</i>	49
7.4. Las alteraciones en la forma de la semilla en <i>amp1</i> correlaciona con la viabilidad .	53
7.5. <i>AMP1</i> está involucrado en el desarrollo post-embriionario de células epidérmicas de parte aérea y raíz.....	55
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	58
9. LITERATURA CITADA	64

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
FIGURA 2. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis</i>	4
FIGURA 3. Gametogénesis en <i>Arabidopsis</i>	5
FIGURA 4. Fertilización en <i>Arabidopsis</i>	6
FIGURA 5. Estadios embrionarios en <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
FIGURA 6. Etapas del desarrollo del endospermo de <i>Arabidopsis</i>	11
FIGURA 7. Esquema del embrión en fase de corazón.....	14
FIGURA 8. Testa de <i>Arabidopsis</i>	15
FIGURA 9. Germinación de las semillas de <i>Arabidopsis</i>	19
FIGURA 10. Procesos que controlan la dormancia y la germinación de la semilla en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
FIGURA 11. Patrón de diferenciación epidérmico en la radícula.....	29
FIGURA 12. Procesamiento de péptidos de señalización	31
FIGURA 13. La mutación en <i>amp1-10</i>	32
FIGURA 14. Fenotipos de las silicuas de plantas silvestres (Col-0) y <i>amp1-10</i>	41
FIGURA 15. La mutación en <i>AMP1</i> causa cuatro diferentes fenotipos de semilla.....	42
FIGURA 16. Esquema de las mutantes <i>amp1-10</i> , <i>amp1-20</i> y <i>amp1-22</i>	43
FIGURA 17. Los fenotipos de semillas son causados por la mutación en <i>amp1</i>	44
FIGURA 18. Análisis de la amplitud de semillas afectadas en vías hormonales	45
FIGURA 19. La mutación en <i>AMP1</i> afecta la estructura de la testa	47
FIGURA 20. La formación de la cápsula de mucílago está alterada <i>amp1-10</i>	48
FIGURA 21. La mutación en <i>AMP1</i> afecta el desarrollo del embrión	50
FIGURA 22. Las alteraciones en la testa están relacionadas con cambios en la estructura el embrión en la mutante <i>amp1</i>	51
FIGURA 23. La mutación en <i>AMP1</i> ocasiona alteraciones en el embrión.....	52
FIGURA 24. Germinación en WT y la mutante <i>amp1</i>	54
FIGURA 25. El desarrollo de los pelos radiculares está afectado en las mutantes <i>amp1</i>	56
FIGURA 26. El desarrollo de tricomas está afectado en las mutantes <i>amp1</i>	57
FIGURA 27. Modelo propuesto para la participación de <i>AMP1</i> en la regulación del desarrollo de la semilla y diferenciación epidérmica.....	63

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, pluricelulares, que poseen estructuras altamente especializadas que les permiten crecer, desarrollarse y reproducirse. Su naturaleza sésil los hace susceptibles a cambios en factores ambientales, a los que se adaptan por su gran plasticidad fenotípica. Además, son capaces de realizar la fotosíntesis, lo que les otorga un papel fundamental en los ecosistemas donde actúan como productores primarios y representan la fuente primordial de granos y semillas para la alimentación de la población (Sultan, 2000).

Dentro de los factores que pueden afectar el desarrollo de las plantas se incluyen señales abióticas como agua, luz, dióxido de carbono, minerales, la gravedad, la composición y estructura del suelo, compuestos volátiles, exudados radiculares y bióticas como la presencia de otros organismos. Cuando se detecta un cambio en alguno de estos factores se inducen respuestas que le permiten a la planta adaptarse asegurando así su supervivencia (Gersani *et al.*, 1998; Kegge y Pierik, 2010).

El estudio de las plantas es de vital importancia ya que al tratarse de organismos eucariontes comparten características con los animales y de esta manera el estudio de los procesos vegetales podría brindar información acerca de los procesos fisiológicos en animales. Sin embargo, el objetivo principal de la “ciencia de las plantas” es entender el funcionamiento de estos organismos que son la base de la agricultura y la alimentación mundial.

En biología, para el entendimiento de procesos fisiológicos, genéticos y moleculares se han utilizado ampliamente modelos biológicos. Existen varias especies utilizadas como modelo, entre las cuales destaca *Arabidopsis thaliana* debido su genoma pequeño (125 Mb) que se encuentra completamente secuenciado y se cuenta con un banco de mutantes para cada uno de sus 25,498 genes (Wixon, 2001). Además, esta planta posee un ciclo de vida corto y produce gran cantidad de semillas.

El ciclo de vida de las plantas se divide en dos periodos de desarrollo, una etapa juvenil y una etapa reproductiva, ambas controladas por reguladores de crecimiento como fitohormonas y péptidos de señalización (Poethig, 1990; Schultz y Haughn, 1993; Telfer *et al.*, 1997). El proceso de germinación de una semilla es un evento decisivo porque permite el establecimiento de una nueva generación y contribuye en la propagación de la progenie. La semilla es una estructura que confiere protección al embrión y le provee nutrientes, lo que ocurre a través de una comunicación tisular altamente sofisticada (Lin y Schiefelbein, 2001).

La germinación comienza con la imbibición o captación de agua por parte del mucílago localizado en la cubierta de la semilla y finaliza con la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1994). Este es un proceso altamente regulado que implica la interacción de factores externos como la cantidad de luz y la temperatura y de factores internos como algunas fitohormonas entre las cuales destacan el ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA's), auxinas, algunos nutrientes como el nitrato y fosfato, así como la distribución adecuada de fotosintatos. Además, se ha reportado que la estructura de la semilla está implicada en el control de la germinación (Bentsink y Koornneef, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1. Planta modelo, *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis es una especie crucífera nativa de Europa, Asia y noreste de África (Hoffmann, 2002), miembro de la familia *Brassicaceae*, emparentada con la mostaza, col y el nabo, esta planta ha sido ampliamente utilizada como modelo en investigación (Meinke *et al.*, 1998). Su aspecto es el de una planta herbácea, pequeña, que presenta una base en forma de roseta con hojas anchas, un tallo con hojas más delgadas, sus flores son de color blanco, agrupadas en inflorescencias cuyo fruto es una silicua (fruto simple, seco formado por dos o más carpelos) que produce aproximadamente treinta semillas (Fig. 1, Moreno, 1984).

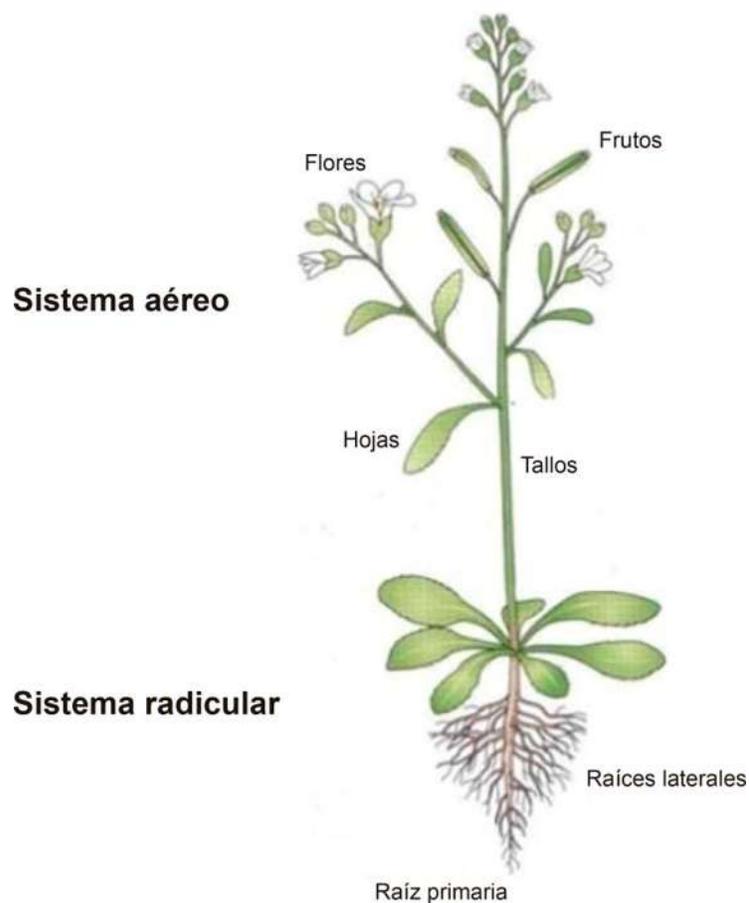


FIGURA 1. *Arabidopsis thaliana*. Estructuralmente *Arabidopsis* está constituida por un sistema aéreo formado por hojas, tallos, flores y frutos, así como por un sistema radicular conformado por una raíz primaria y por raíces laterales (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002).

El ciclo de vida de *Arabidopsis* consta de dos fases: la fase juvenil que abarca desde la germinación hasta la fase vegetativa temprana caracterizada por el desarrollo de la raíz, hojas y tallos y la fase reproductiva que inicia con la aparición de la primera inflorescencia hasta la producción de las semillas (Boyes *et al.*, 2001), es decir incluye la gametogénesis, fertilización y embriogénesis (Fig. 2). La duración de estas dos fases puede variar de acuerdo a factores ambientales como la cantidad y calidad de luz, la disponibilidad de nutrientes y agua, entre otros (Martinez-Zapater *et al.*, 1994).

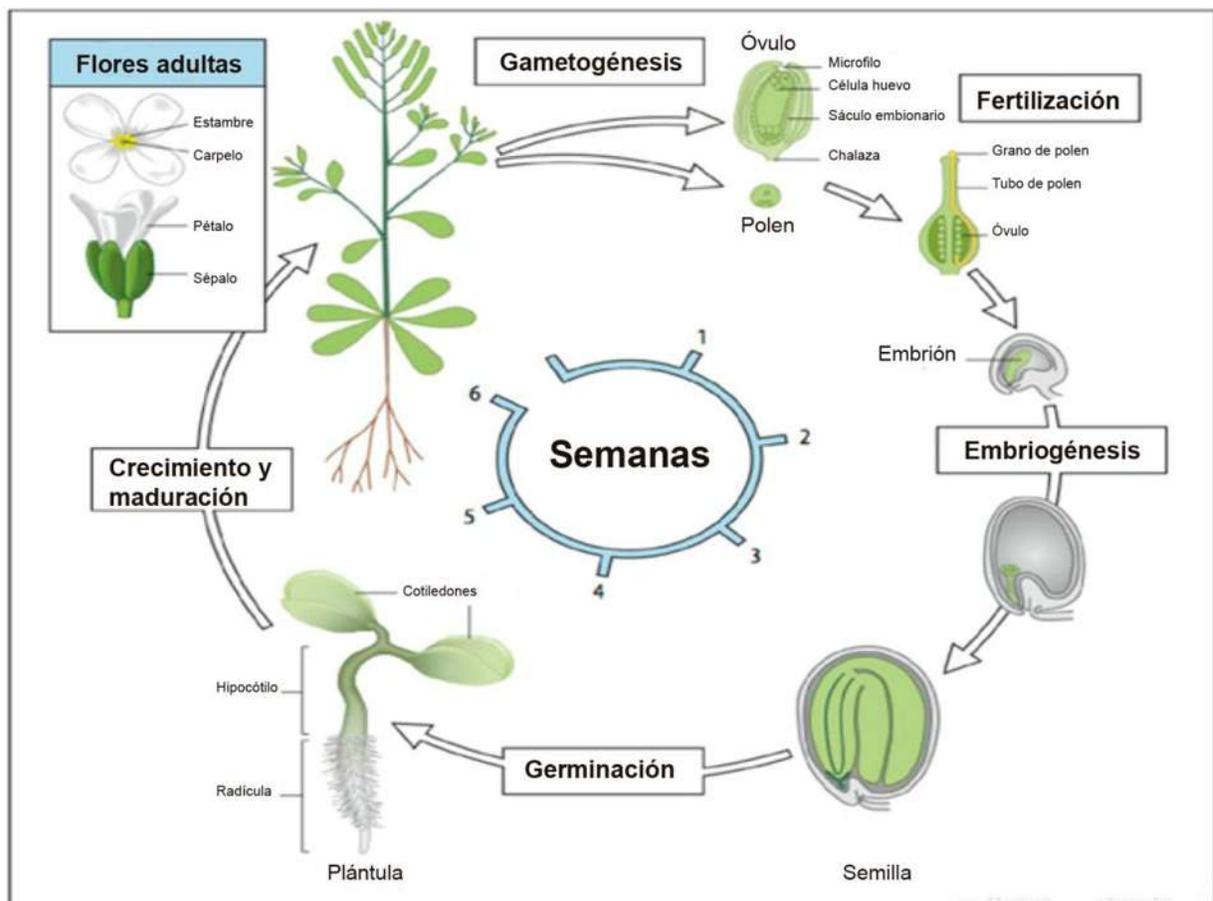


FIGURA 2. Ciclo de vida de *Arabidopsis*. El ciclo comienza en las flores de plantas adultas con la gametogénesis donde se producen el polen y el óvulo para que ocurra la fertilización, cuyo producto será un embrión que después de la germinación a través de diferentes procesos de desarrollo y maduración, se convertirá en una planta adulta donde el ciclo comenzará de nuevo.

2.2. Desarrollo de la semilla

La semilla es la estructura de propagación desarrollada por algunas especies pertenecientes a las espermatofitas o plantas con semilla que incluyen tanto a las gimnospermas como a las angiospermas. Las semillas se desarrollan después de la fertilización del óvulo y están formadas por un embrión; una estructura nutritiva, el endospermo, y una estructura de protección, la testa.

2.2.1. Fertilización de las flores

Para que ocurra la formación de una semilla primero debe llevarse a cabo la fertilización en las flores de las plantas adultas (Fig. 3A). Las flores de *Arabidopsis* son hermafroditas y están formadas por cuatro sépalos, cuatro pétalos y seis estambres (estructura masculina) que consisten de un filamento y una antera donde se produce el polen. En la parte central de la flor emerge el gineceo, la estructura femenina que contiene a los óvulos y está constituida por el estigma, estilo y el ovario (Irish, 2010).

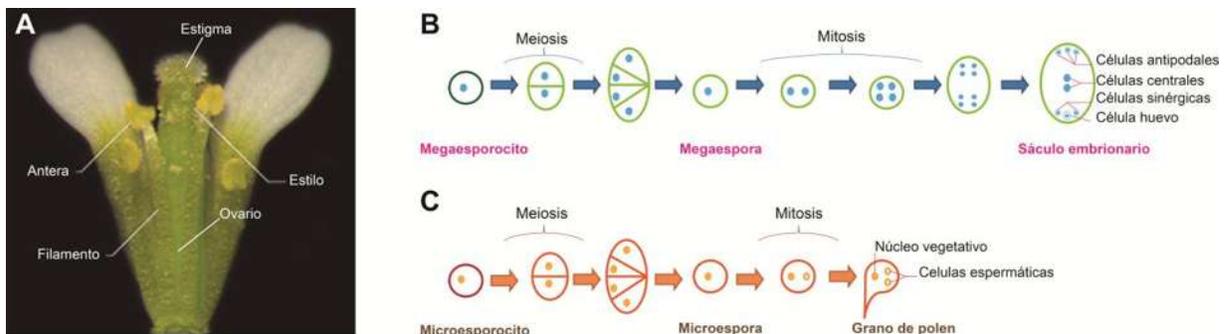


FIGURA 3. Gametogénesis en *Arabidopsis*. **(A)** La gametogénesis se lleva a cabo en las estructuras sexuales de las flores. **(B)** La megasporogénesis ocurre dentro del ovario donde el megasporocito después de varias divisiones celulares tanto mitóticas como meióticas forma el saco embrionario del óvulo. **(C)** La microsporogénesis sucede en las anteras, el microsporocito a través de divisiones mitóticas y meióticas producirá el grano de polen.

La fertilización ocurre al fusionarse el óvulo y un grano de polen. El óvulo está formado por un núcleo que contiene el saco embrionario y la chalaza de la cual emergen los diferentes tegumentos que lo recubren. El saco embrionario alberga ocho células haploides: la célula huevo, dos células sinérgicas, dos núcleos polares

que forman a la célula central y tres cuerpos antipodales (Fig. 3B, Bewley *et al.*, 2013). El polen desarrollado de las microesporas en la antera (Fig. 3B), consiste de dos células espermáticas haploides encapsuladas por una célula vegetativa haploide (Bewley *et al.*, 2013).

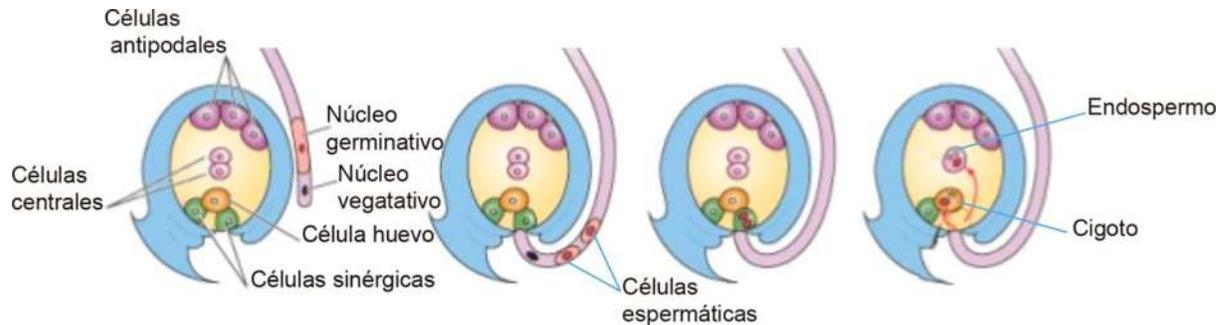


FIGURA 4. Fertilización en *Arabidopsis*. Al germinar el polen experimenta la última división mitótica para producir dos células espermáticas que son atraídas por una de las células sinérgicas al microfilo. La célula sinérgica capta el contenido de las células espermáticas para que sus núcleos se fusionen con la célula huevo y con las células centrales y así producir el cigoto y el endospermo, respectivamente.

Alteraciones en el desarrollo en las estructuras sexuales reducen la fertilidad, como es el caso de la mutación en la proteína activada por mitógenos MPK6, que muestra una disminución en el tamaño de la antera previniendo de esta manera la liberación del polen y provocando una reducción de la fertilidad (Bush y Krysan, 2007).

Durante el proceso de fertilización el polen entra en contacto con el estigma y germina, es decir la célula vegetativa comienza a crecer de manera polar para pasar a través del estilo y dar lugar a la última división celular del grano de polen para producir dos células espermáticas. Posteriormente, el tubo de polen entra por la única abertura de los tegumentos, el microfilo, entonces el polen cesa su crecimiento y vierte su contenido (Higashiyama *et al.*, 2001). Una de las células espermáticas se fusiona con la célula huevo del óvulo produciendo una célula diploide, el cigoto, mientras que la otra se fusiona con la célula central ovárica produciendo una célula triploide, el endospermo (Fig. 4, Lopes y Larkins, 1993; Faure *et al.*, 2002).

2.2.2. Embriogénesis en *Arabidopsis*

Después de la fertilización, el cigoto formado comienza a diferenciarse a través del proceso de embriogénesis que depende de niveles de algunas fitohormonas y se divide en tres etapas: la etapa temprana caracterizada por un patrón apical-basal en las divisiones del cigoto y que está regulada por la acumulación de auxinas (Bowman y Floyd, 2008), y la media y tardía controladas por la acumulación de ABA. En la fase media, el embrión debe crecer hasta rellenar las cubiertas ováricas (Goldberg *et al.*, 1994) y en la tardía entra en un proceso de latencia o dormancia donde se sintetizan proteínas que le permiten adquirir resistencia a la desecación y llevar a cabo el plegamiento correcto de otras proteínas necesarias para el proceso de germinación (Goldberg *et al.*, 1994; Kamisugi y Cuming, 2005).

La embriogénesis comienza cuando el producto de la fertilización, la célula diploide triplica su tamaño y ocurre la primera división generando una célula apical pequeña con citoplasma denso y una célula basal grande y vacuolada (Mansfield y Briarty, 1991). La célula apical experimenta divisiones longitudinales y transversales hasta formar el octámero (ocho células), cuya parte superior contribuye a la estructura aérea de la planta y la inferior a la radícula. La célula basal experimenta divisiones longitudinales y forma el suspensor que nutrirá al embrión, además la célula superior de esta estructura, denominada hipófisis, contribuirá a formar el meristemo radicular de la planta. En la transición del octámero a la fase globular (Fig. 5A), se forma el tejido precursor epidérmico, el protodermo (Capron *et al.*, 2009), en la siguiente fase, llamada de corazón (Fig. 5B), los principales órganos embrionarios, meristemas, hipocótilo y los cotiledones se hacen visibles (Barton y Poething, 1993; Lee *et al.*, 2010). En las fases finales de la embriogénesis: torpedo (Fig. 5C) y cinturón (Fig. 5D) aparecen los tejidos provasculares, los primordios de los cotiledones y la organización del hipocótilo y la raíz son completados (Capron *et al.*, 2009). De esta manera el patrón estructural de la planta queda establecido desde la embriogénesis.

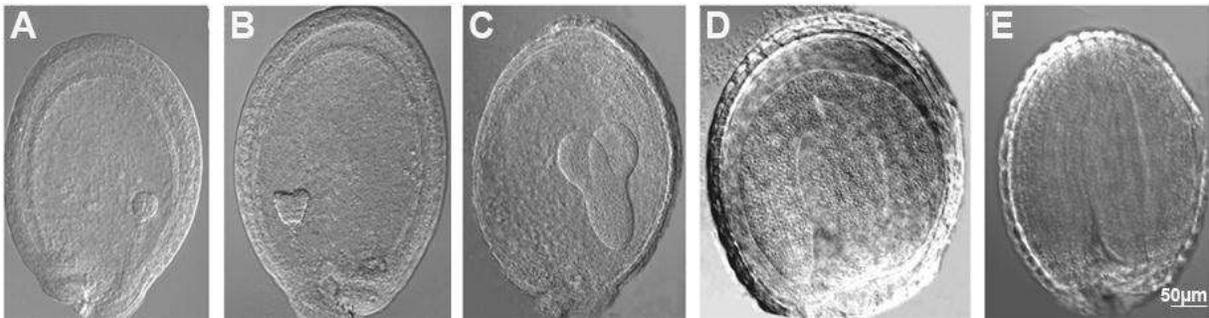


FIGURA 5. Estadios embrionarios en *Arabidopsis thaliana*. Las fotografías muestran las etapas del desarrollo embrionario. **(A)** Globular, **(B)** Corazón, **(C)** Torpedo, **(D)** Cinturón, **(E)** Embrión maduro, la barra de escala mostrada en **(E)** es la misma para todas las fotografías (Modificado de Beaudoin *et al.*, 2009).

2.2.3. Maduración de la semilla

La etapa de maduración de la semilla se divide en dos eventos: uno consiste en la reorganización del metabolismo y la biosíntesis de algunas proteínas y compuestos de reserva (carbohidratos, aceites y proteínas de almacenamiento) que proveen nutrientes para el crecimiento temprano de la plántula (Thomas, 1993) y otro, donde se adquiere resistencia a la desecación. La desecación le permite a las semillas controlar la síntesis de proteínas y el daño causado por la peroxidación lipídica (Lalonde *et al.*, 1986; Leprince *et al.*, 1990). El objetivo de la maduración de la semilla consiste en la inhibición del ciclo celular, disminución de la humedad, el incremento en los niveles de ABA, la producción de compuestos de reserva y establecimiento de la dormancia (Matilla y Matilla-Vazquez, 2008).

El proceso de maduración inicia cuando el embrión crece y cesa la división celular (Raz *et al.*, 2001) y termina cuando los compuestos de reserva se han acumulado, los niveles de ABA se han incrementado, se ha adquirido tolerancia a la desecación y se ha establecido la dormancia (Goldberg *et al.*, 1994; Holdsworth *et al.*, 2008). La dormancia se define como la incapacidad de una semilla viable para germinar aunque las condiciones del medio sean adecuadas (Bewley, 1997) y depende de factores internos, principalmente de hormonas, así como características estructurales y morfológicas del endospermo y la testa (Koornneef *et al.*, 2002; Kucera *et al.*, 2005).

Durante las etapas temprana y media de la maduración de la semillas se sintetizan proteínas de almacenamiento que sirven principalmente como fuente de carbono entre las cuales se encuentran las albúminas y globulinas, se ha sugerido que estas proteínas también participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ERO), debido a que la abundancia de proteínas 12S, da como resultado plantas con fenotipo hipersensible a las ERO (Galland *et al.*, 2014). En la fase final de la maduración se sintetizan proteínas que permiten adquirir resistencia a la desecación y llevar a cabo el plegamiento correcto de otras proteínas necesarias para el proceso de germinación (Kamisugi y Cuming, 2005). Dentro de este grupo de proteínas se encuentran las LATE EMBRIOGENESIS ABUNDANT (LEA), para las cuales se han sugerido varias funciones, como la protección de las membranas celulares (Chakrabortee *et al.*, 2012) y la estabilización de cristales de azúcar dentro de las semillas (Wolkers *et al.*, 2001), y las proteínas de choque térmico (HSP) que son conocidas por su función como chaperonas moleculares (Méndez-Ferreira *et al.*, 2013).

Los compuestos de reserva constan de proteínas y ácidos grasos, las proteínas son almacenadas en vacuolas ubicadas en la parte central del embrión y los ácidos grasos en cuerpos oleicos ubicados en la periferia de los cotiledones (Mansfiel y Briarty, 1992). FUSCA 3 (FUS3) es el regulador maestro del almacenamiento de proteínas (Ezcurra *et al.*, 1999; Redt *et al.*, 2000) y LEC2 del almacenamiento de lípidos (Santos-Mendoza *et al.*, 2005; Braybrook *et al.*, 2006).

2.3. Desarrollo del endospermo

Durante las primeras fases de la embriogénesis, los nutrientes son proporcionados por el suspensor hasta alcanzar la fase de corazón, mientras que en la maduración de la semilla la nutrición está a cargo del endospermo (Hill *et al.*, 2003), que transporta los nutrientes de los tegumentos al embrión a través del apoplasto (Kim y Zamryski, 2005).

El endospermo es un órgano nutritivo triploide que deriva de la fertilización de la célula central, consiste de una masa proximal de citoplasma que atesora una larga vacuola central que posteriormente se diferenciará en distintos tipos celulares para soportar las necesidades energéticas de la maduración y germinación de la semilla. Su desarrollo consta de cuatro fases: sincitial, de celularización, diferenciación y muerte (Bewley *et al.*, 2013).

La primera división de la fase sincitial del endospermo precede a las divisiones del cigoto (Feaure *et al.*, 2002), las divisiones celulares en esta fase se caracterizan por no presentar citocinesis (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001) y continúan hasta formar un sincitio que migra del microfilo a la chalaza (Fig. 6A). Durante este proceso se forman tres regiones: microfilar que atesora al embrión, periférica y la de la chalaza (Sorensen *et al.*, 2002).

Durante la fase de corazón ocurre la celularización del endospermo (Fig. 6B) (Brown *et al.*, 1999) donde los aproximadamente 200 núcleos formados durante la fase sincitial se delimitarán como células gracias a la formación de sistemas de microtúbulos radiales (Bewley *et al.*, 2013). La celularización es una fase determinante en el tamaño de la semilla, una celularización precoz produce semillas pequeñas mientras que una celularización prolongada genera semillas alargadas (Scott *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2006).

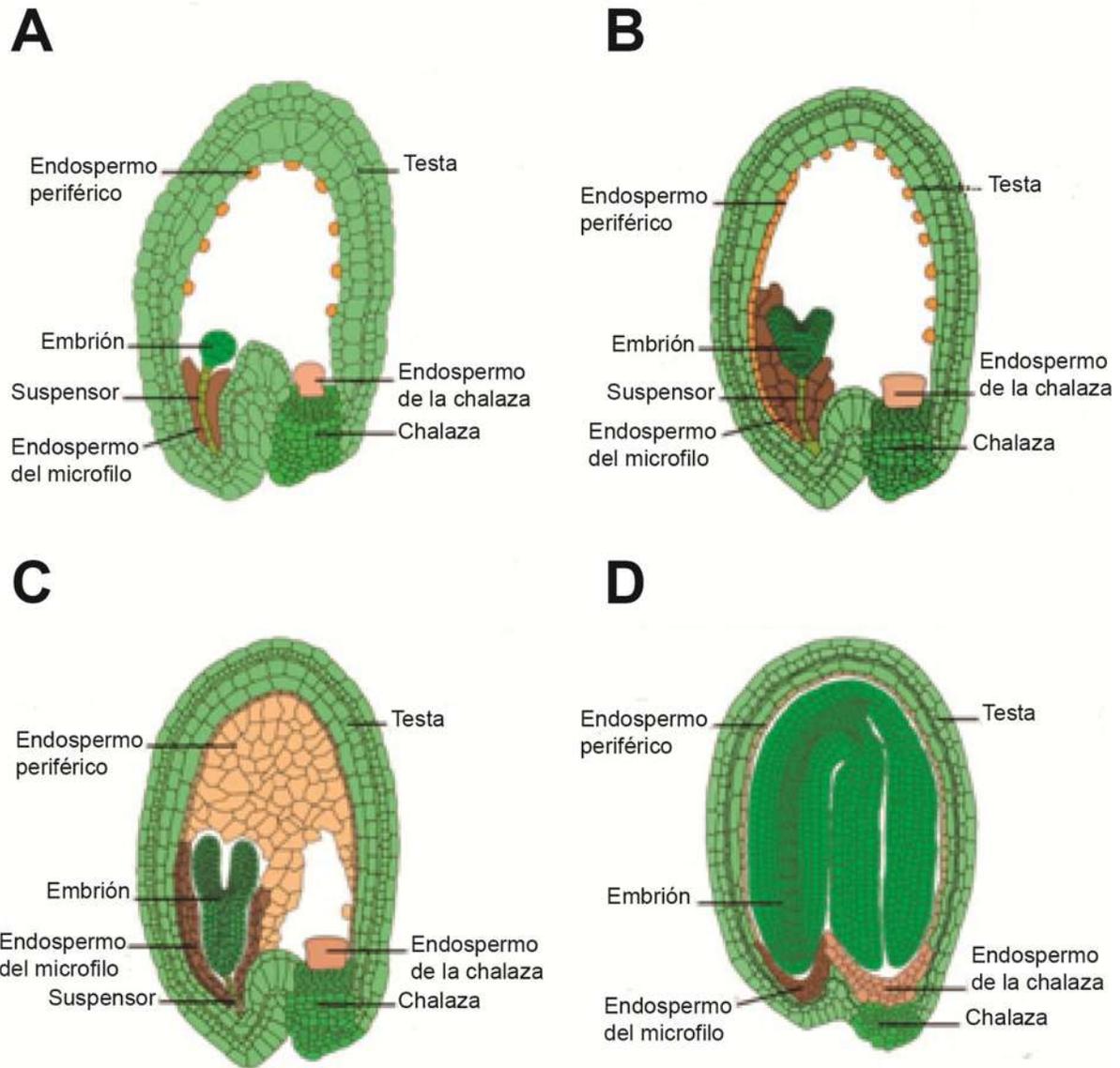


FIGURA 6. Etapas del desarrollo del endospermo de *Arabidopsis*. **(A)** Formación del sincitio. **(B)** Celularización del endospermo y formación de las tres secciones del endospermo, microfilar, periférico y chalaza. **(C)** Diferenciación del endospermo. **(D)** Estructura de una semilla madura (Modificado de Belmonte *et al.*, 2013).

Se han elucidado tres vías para la celularización del endospermo en *Arabidopsis*: la que involucra al factor de transcripción MADS-box APETALA 2 (AP2); la mediada por proteínas grupo polycomb (PcG, por sus siglas en ingles) y finalmente la vía de HAIKU (IKU) (Bewley *et al.*, 2013). AP2 es una proteína involucrada en

varias fases del desarrollo: el desarrollo del endospermo debido a que la mutación en este gen ocasiona una celularización prolongada (Ohto *et al.*, 2009).

Las proteínas PcG son reguladores de la identidad celular que actúan como represores transcripcionales (Schuettengruber y Cavalli, 2009), estos complejos catalizan la trimetilación de la histona H3, sin embargo también se les ha relacionado con el control del desarrollo del endospermo. Específicamente *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED-POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (FISPRC2)* actúa en la célula central del óvulo (Weinhofer *et al.*, 2010), está formado por varias subunidades: *MEDEA (MEA)*, *FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2 (FIS 2)*, *FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)* y *MULTICOPY OF SUPPRESSOR (MSI1)*, la mutación en estos genes provoca proliferación del endospermo aún en ausencia de la fertilización (Grossniklaus *et al.*, 1998; Kiyosue *et al.*, 1999; Makarevich *et al.*, 2008). Además, se ha reportado que la mutación en *MEA* ocasiona que la célula central se divida y llegue hasta fase de celularización y se desarrolle la testa aunque no haya fertilización (Chaudhury *et al.*, 1997; Kiyosue *et al.*, 1999) por lo cual se sugiere que la función de *MEA* es prevenir la replicación de la célula central en ausencia de la fertilización.

La vía más estudiada, involucra los genes *HAIKU (IKU)*, los cuales controlan la transición entre la fase sincitial y la de celularización (García *et al.*, 2003) donde participa *IKU1*, que codifica para una proteína con motivo VQ (Wang *et al.*, 2010). *IKU2* codifica para una cinasa con repeticiones ricas en leucina (Luo *et al.*, 2005), mientras que mutaciones en *MINISEED3 (MINI3)* que codifica un factor de transcripción tipo WRKY (Luo *et al.*, 2005), ocasionan una celularización precoz (García *et al.*, 2003). Estos tres genes son incluidos en una sola vía ya que *IKU1* regula a *MINI3* y *MINI3* regula a *IKU2* (García *et al.*, 2003).

Durante la fase de diferenciación (Fig. 6C) se producen cuatro tipos celulares principales: células que acumulan almidón, células de la capa aleurónica, células de transferencia y células de la región del embrión, finalmente muchas de las células del endospermo morirán durante la maduración de la semilla (Orozco-Arroyo *et al.*, 2015). La función de las células de la región del embrión aún es desconocida, se

piensa que podría proveer una zona de comunicación entre el endospermo y el embrión para nutrirlo o simplemente proporcionar una barrera entre ellos durante el desarrollo de la semilla (Olsen, 2004). La función de las células de transferencia facilita la transferencia de aminoácidos, sacarosa y monosacáridos entre el tejido materno y el embrión. Las células de la capa aleurónica tienen un papel primordial durante la germinación ya que movilizan el almidón a través de la producción de enzimas líticas en respuesta a la activación del ácido giberélico (Saousssem *et al.*, 2009).

Se han reportado algunas mutaciones que afectan el desarrollo del endospermo dentro de las cuales se encuentran *transparent testa glabra 2 (ttg2)* que afecta negativamente la elongación de los tegumentos y altera el desarrollo del endospermo y el tamaño de la semilla (García *et al.*, 2003, 2005).

2.4. Diferenciación de la testa

La testa o cubierta de las semillas es un órgano externo multifuncional que cubre al embrión, lo nutre y protege y puede influenciar el tamaño y aspecto de la semilla. La testa deriva de los tegumentos del ovulo por lo cual es la única estructura de la semilla cuyo origen no proviene del producto de la doble fertilización (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1996). Los tegumentos son capas celulares que recubren al ovulo maduro, van desde el microfilo hasta la chalaza. El tegumento interno está constituido por dos capas celulares (Fig. 7), mientras que el externo por tres capas (Shneitz *et al.*, 1995).

La testa está constituida por cuatro capas: una capa epidérmica que produce mucílago, una sub-epidérmica parenquimatosa y otra en empalizada, que provienen del tegumento externo. Del tegumento interno deriva una capa pigmentada que contiene antocianinas, flavonoles y proantocianinas, que dan los colores rojo, morado y café, es denominada endotelio (Bewley *et al.*, 2013).

Las principales funciones de la testa son mantener al embrión deshidratado y en una condición de latencia hasta que las condiciones del medio sean adecuadas para que ocurra la germinación, así como protegerlo del daño mecánico y ataque de patógenos (Penfield *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007).

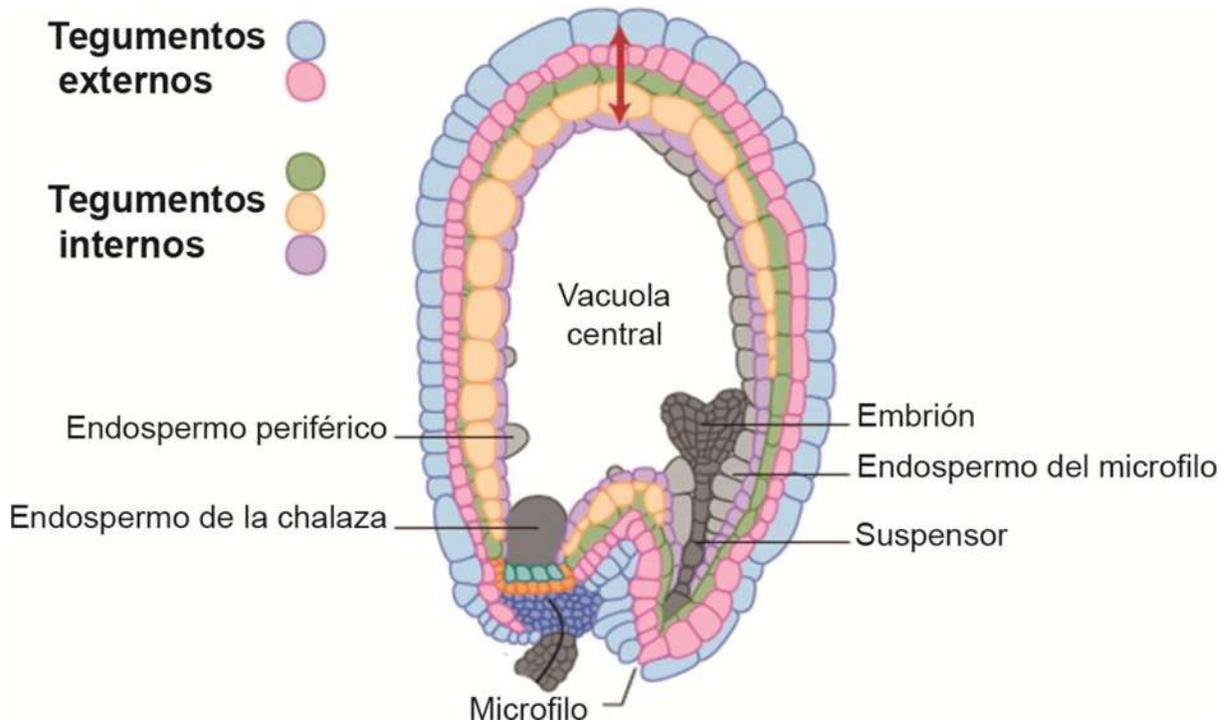


FIGURA 7. Esquema del embrión en fase de corazón. Durante la fase de corazón el endospermo comienza la celularización para poder nutrir al embrión durante el desarrollo de la semilla y antes de que ocurra la germinación. Para proteger el embrión los tegumentos internos y externos del ovulo darán origen a las diferentes capas de la testa (Modificado de Bewley *et al.*, 2013).

La testa incrementa su tamaño después de la fertilización por influencia de los programas de desarrollo del endospermo (Roszak y Kohler *et al.* 2011). Después de la fertilización, aunque las células de los tegumentos aún se encuentran en división, predominan eventos de expansión y diferenciación, en los que células exteriores sintetizan al mucílago que es secretado a la región adyacente del apoplasto formando una bolsa en forma de dona entre la membrana y la pared celular. Enseguida una segunda pared celular rica en celulosa es sintetizada más allá de la bolsa de mucílago y es conocida como columela (Fig. 8, Windsor *et al.*, 2000).

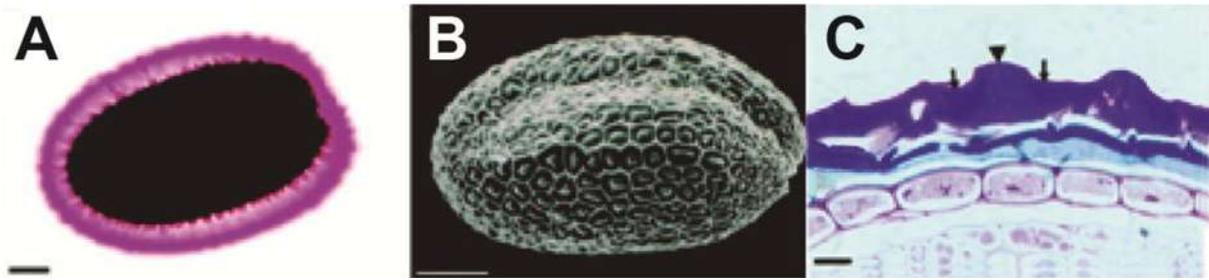


FIGURA 8. Testa de *Arabidopsis*. **(A)** Tinción con rojo de rutenio de la capa de mucílago presente en la testa. **(B)** Micrografía electrónica de la testa que muestra la estructura reticular formada por la bolsa de mucílago y las columelas. **(C)** Corte transversal de testa fijada con formaldehído y etanol, las flechas indican la acumulación del mucílago y la cabeza de flecha la columela (Modificado de Western *et al.*, 2000).

La diferenciación de las células epidérmicas no parenquimatosas a células excretoras de mucílago comienza cuando el embrión está en fase de octámero. Western *et al.*, 2000 dividen la diferenciación celular en cinco etapas: i) inmediatamente después de la fertilización la célula crece al incrementar el número de vacuolas, ii) comienza la síntesis de mucílago que ocasiona una compresión del protoplasto celular que coincide con el inicio de síntesis de almidón que servirá como un precursor de polisacáridos para reforzar la pared celular secundaria (Windsor *et al.*, 2000), iii) se forma una columna citoplasmática en el centro de la célula (la columela) y el mucílago comienza a acumularse de manera polar en la membrana plasmática, iv) durante esta etapa la producción del mucílago es completada y comienza a formarse la columela y a degradarse el almidón, v) finalmente ocurre una deshidratación del mucílago y se forma una delgada capa en arreglo hexagonal alrededor de la columela.

El mucílago de *Arabidopsis* contiene grandes cantidades de ramnosa y ácido galacturónico y pequeñas cantidades de otros azúcares como arabinosa, galactosa, xilosa y manosa (Voiniciuc *et al.*, 2015) formando pectina, celulosa y hemicelulosa (Naran *et al.*, 2008; Arsovski *et al.*, 2009) que bajo condiciones de hidratación dan lugar a una capsula de gel que cubre la semilla madura, probablemente para

proteger al embrión durante el proceso de germinación (Arsovski *et al.*, 2010; Western, 2012).

La pectina está constituida por un grupo heterogéneo de polisacáridos, cuya unidad es el ácido poligalacturónico (PGA) que consta de una cadena de residuos α 1,4 de Gal-UA. El PGA forma tres tipos de polímeros que constituyen la pectina: i) ramnogalacturano I (RGI), una cadena altamente ramificada de residuos alternados α 1,4 de Gal-UA y α 1,2 ramnosa vinculados a calcio; ii) ramnogalacturano II (RGII), contiene ramificaciones vinculadas al borato lo cual lo distingue del RGI y iii) homogalacturano, un polímero de PGA sin ramificaciones (Brett y Waldron, 1990).

Las pectinas se hidratan embebiendo a la hemicelulosa y la celulosa para protegerlas de una posible hidrólisis al contacto con el agua. La hemicelulosa es un heteropolisacarido formado principalmente por glucosa, fructosa y galactosa unidas mediante enlaces β 1-4, en el mucílago la hemicelulosa se presenta como unidades de galactoglucomanano, xilanos y xiloglucanos (Voiniciuc *et al.*, 2015). La celulosa es un polímero de glucosas unidas mediante enlaces β 1-4 que forman un esqueleto que le da rigidez al mucílago (Taiz y Zeiger, 2002).

El mucílago presenta dos dominios que han sido identificados con rojo de rutenio, técnicas inmunológicas y análisis químico (Fig. 8A). El dominio exterior es difuso sin una estructura obvia, pobremente adherido a la semilla y fácil de extraer por agitación (Western *et al.*, 2000; Macquet *et al.*, 2007) compuesto de RGI, hemicelulosa, galactanos y arabinanos. El dominio interno está fuertemente adherido a la semilla y no puede ser removido por agitación, sugiriendo que podría estar unido a la testa, la tinción con rojo de rutenio se ve más oscura con respecto al dominio exterior, lo cual sugiere que la pectina es más densa en el dominio interno, químicamente está conformado por RGI, hemicelulosa, celulosa y galactanos (Western *et al.*, 2000; Macquet *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2011; Haughn y Western, 2012).

El fenotipo de las mutantes de testa puede ser clasificarse en dos grupos: las de pigmentación que incluyen a *transparent testa 1 (tt1)*, *transparent testa 2 (tt2)* y

transparent testa glabra (ttg) que presentan semillas amarillas debido a alteraciones en la síntesis de proantocianinas, además de dormancia reducida (Masucci y Schiefelbein, 1996). La mutación en *TTG*, también ocasiona una disminución en la cantidad de proteínas e incrementa el contenido de ácidos grasos de reserva de la semilla, lo que resulta en una disminución del tamaño y peso de la semilla (Chen *et al.*, 2012). Se han identificado otras mutantes estructurales que incluyen a *aberrant testa shape (ats)* que muestra alteraciones en el desarrollo de los tegumentos del ovulo provocando que la semilla adquiera forma de corazón (León-kloosterziel *et al.*, 1994) y *glabra 2 (gl2)* que presenta defectos en la producción de mucílago (Rerie *et al.*, 1994; Massucci y Schiefelbein, 1996).

La testa puede imponer dormancia de dos formas distintas: al ser un impedimento mecánico para la propulsión de la radícula (Debeaujan *et al.*, 2000) y mediando el proceso de imbibición al controlar la captación de agua mediante el mucílago, así como al inducir la biosíntesis del ABA. Se ha demostrado que cuando las condiciones para la germinación no son adecuadas, ocurre la síntesis de *nov* de ABA en la semilla (Lee *et al.*, 2010). Las mutantes afectadas en pigmentación muestran más alteraciones en la germinación que las mutantes estructurales (Debeaujan *et al.*, 2000).

Aunque la testa no sea producto de la doble fertilización del óvulo hay evidencia de que su formación coordina al desarrollo del embrión mediante un cruce de señales con el endospermo (Roszak *et al.*, 2011). Se han propuesto dos mecanismos para explicar el cruce de señales entre el desarrollo del endospermo y el de la testa: i) el modelo de restricción del tamaño del endospermo propone que la expansión de las células de la testa representa una barrera mecánica al desarrollo de la cavidad embrionaria y por ende al embrión mismo. ii) el modelo de señalización de la celularización, implica una molécula señal que migra del endospermo a la testa para sincronizar el desarrollo de la semilla. Una de las moléculas candidatas son los flavonoides, ya que su biosíntesis comienza en el endospermo después de la fertilización (Debeaujan *et al.*, 2003), alteraciones en esta vía han dado lugar a alteraciones en la celularización del endospermo (Scott *et al.*, 2013; Doughty *et al.*,

2014). Además, los flavonoides inhiben el transporte polar de auxinas mediado por transportadores PGP afectado de esta manera el desarrollo de la semilla principalmente en estadios tempranos (Terasaka *et al.*, 2005). Otras moléculas sugeridas son los polisacáridos como la sacarosa, debido a que AP2 modula la nutrición de los tejidos maternos sintetizando sacarosa a partir de hexosas y de esta manera modula el tamaño de la semilla (Ohto *et al.*, 2009).

2.5. Genes involucrados en la regulación del desarrollo de la semilla

Se han encontrado varios genes inducidos diferencialmente durante las distintas fases del desarrollo de la semilla, muchos de los cuales guardan una estrecha relación con la vía del ABA como son *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)*, *FUSCA 3(FUS3)*, *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* y *LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)* cuyas mutaciones repercuten en el almacenamiento de proteínas y alteran la dormancia de la semilla (Gutierrez *et al.*, 2007). También se han reportado genes involucrados en el control del tamaño de la semilla, *SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 (SHB1)*, *HAIKU1 (IKU1)*, *MINISEED3 (MINI3)* y *HAIKU2 (IKU2)* que promueven el desarrollo del endospermo aumentando el tamaño de la semilla (Wang *et al.*, 2010). Por lo contrario, *APETALA 2 (AP2)*, inhibe el crecimiento de los tegumentos y del embrión, reduciendo consecuentemente el tamaño de la semilla (Ohto *et al.*, 2009). El gen *AUXIN RESPOSE FACTOR 2 (ARF2)* también modula el tamaño y peso de la semilla, la deficiencia de este factor de transcripción ocasiona divisiones extras en los tegumentos del óvulo, lo cual provoca la formación de una testa alargada y también regula el crecimiento de los tegumentos reduciendo el número de divisiones (Schruff *et al.*, 2006). La mutación en el gen *MPK6* conlleva a alteraciones importantes en la estructura de las semillas que van desde aumento de tamaño, arrugas en la testa hasta la protrusión del embrión (López-Bucio *et al.*, 2013).

2.6. Germinación

La germinación es uno de los eventos más importantes del ciclo de vida de las plantas que comienza con la imbibición o captación de agua por parte del mucílago localizado en la cubierta de la semilla y finaliza con la emergencia de la radícula (Bewley y Black, 1994; Hermann *et al.*, 2007). Para que ocurra la emergencia de la radícula, se deben cumplir dos pasos secuenciales: la ruptura de la testa y la del endospermo (Mansfield y Briarty, 1996; Liu *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2006; Carrera *et al.*, 2007). Durante el proceso de germinación, la semilla tiene que liberarse de un estado de latencia o dormancia y activar el metabolismo con la reparación del DNA, la movilización de reservas y la síntesis de RNA y proteínas de *novo* (Tan *et al.*, 2013).

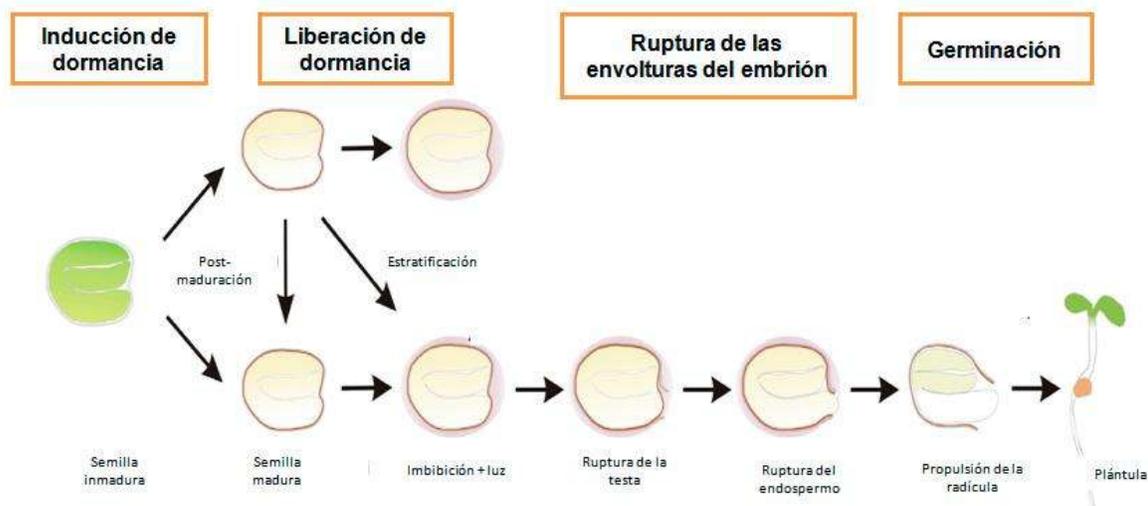


FIGURA 9. Germinación de las semillas de *Arabidopsis*. La dormancia es inducida al final de la maduración, después ocurre la liberación de la dormancia si las condiciones del medio promueven la germinación o se mantiene si son inadecuadas. La germinación comienza cuando una semilla madura capta agua a través de su capa de mucílago (imbibición). Posteriormente, se desencadena el catabolismo que induce la ruptura de la testa. Enseguida, sucede la ruptura del endospermo y de esta manera la emergencia de la radícula para establecer finalmente una plántula (Modificado de Bentsink *et al.*, 2008).

La germinación de la semilla ocurre en tres fases: la primera en la cual la hidratación del mucílago ocurre de una manera rápida; la segunda donde la hidratación se mantiene constante y el metabolismo es activado para preparar la salida de la radícula de la testa y finalmente la tercera fase donde las células de los meristemos radicular y apical se activan para producir la raíz y el follaje (Fig. 9, Galland *et al.*, 2014).

2.6.1. Regulación de la germinación

Los factores ambientales involucrados en la germinación son la humedad, el frío, la disponibilidad de nitrato y la cantidad de luz (Fig. 10) (Ali-Rachedi *et al.*, 2004; Bethke *et al.*, 2007). Para que se lleve a cabo la germinación, la semilla tiene que responder ante las condiciones ambientales que son adecuadas, algunos receptores y moléculas señal están involucradas en la percepción de señales ambientales durante la germinación. Tal es el caso de los receptores de giberelinas (Voegele *et al.*, 2011), calmodulina (Ritche y Gilroy, 1998) y los receptores que activan MAP cinasas (Knetsch *et al.*, 1996). Las señales ambientales desencadenan cascadas de señalización que son reguladas principalmente por la interacción de las fitohormonas ácido giberélico (GA) y ABA, mientras que el primero promueve la germinación, el ABA impone la dormancia en respuesta a factores ambientales.

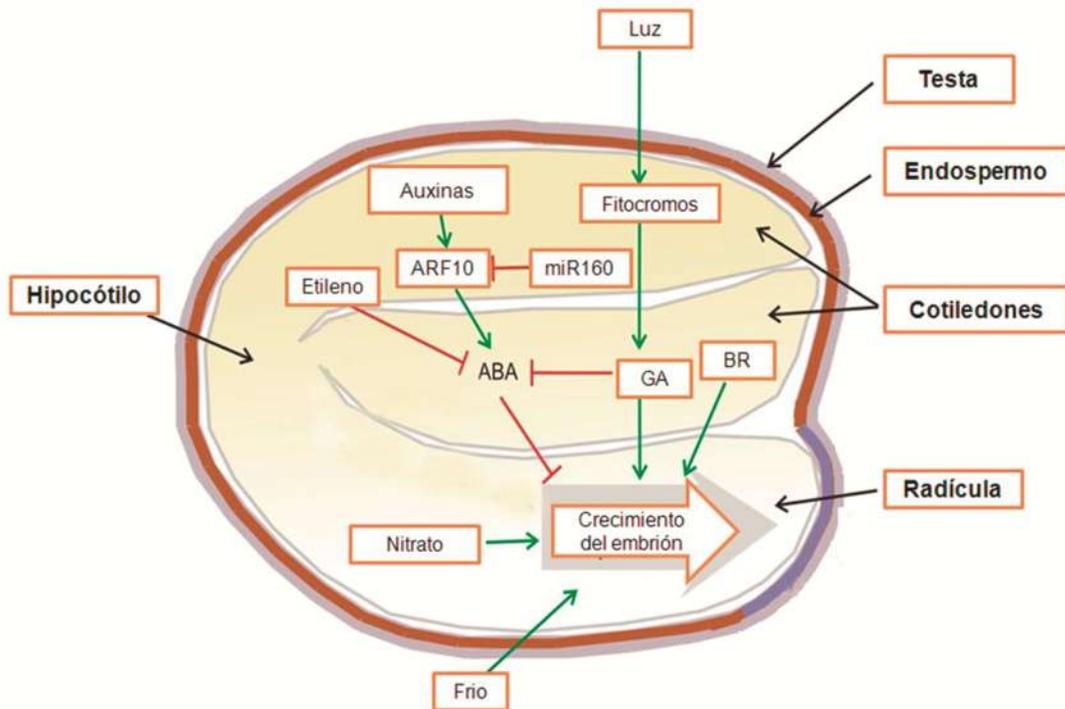


FIGURA 10. Procesos que controlan la dormancia y la germinación de la semilla en *Arabidopsis thaliana*. Los principales factores externos que favorecen la germinación son la luz, el frío y el nitrato promoviendo el crecimiento del embrión. La biosíntesis del GA es inducida por la luz y esta hormona inhibe los efectos del ABA que imponen la dormancia. Además, se muestran los cruces de señales entre el etileno y las auxinas que inhiben y promueven, respectivamente la vía del ABA. Los BR directamente actúan sobre el crecimiento del embrión. Las flechas verdes indican la promoción de la germinación y las rojas la inhibición (Modificado de Bentsink *et al.*, 2008).

2.6.2. Regulación hormonal de la germinación

El ABA es una hormona sesquiterpenica que promueve la maduración de la semilla, deposición de nutrientes de reserva, tolerancia a la desecación, inducción de dormancia e inhibición de la germinación al evitar la expansión celular y la movilización de compuestos de reserva (Garcíarrubio *et al.*, 1997). Esta hormona es percibida por múltiples receptores denominados PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTORS (PYR/PYL/RCARs) que funcionan en diferentes compartimentos sub-celulares, una vez que el ABA está unido al receptor, inhibe a los componentes negativos de la vía, incluyendo a TYPE 2C PROTEIN PHOSPHATASES (PP2Cs), lo cual permite la acumulación de la cinasa SNF1 RELATED PROTEIN KINASE

(SnRK2) cuya fosforilación activa la transcripción de elementos de respuesta a ABA (Shan *et al.*, 2012).

Si las condiciones ambientales son adecuadas, el ABA endógeno se hidroxila y se promueve su catabolismo, y consecuentemente la germinación debido a que el ciclo celular arrestado durante la dormancia puede liberarse en ausencia de ABA (Sanchez *et al.*, 2005; Arc *et al.*, 2013). Sin embargo, en condiciones adversas, la planta inicia la biosíntesis de *novo* del ABA, lo que a su vez, induce factores de transcripción que promueven la síntesis de los represores que inhiben la vía del GA para evitar la germinación (Arc *et al.*, 2013). Los factores de transcripción inducidos por ABA son ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3), ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) y ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5). ABI3 regula la transición entre la maduración del embrión y el establecimiento de la plántula. ABI4 codifica para un factor de transcripción APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (AP2/ERF) que actúa como un regulador positivo de la vía de ABA (Soderman *et al.*, 2000) coordinando el crecimiento del embrión y de las cubiertas de la semilla, movilizandol lípidos desde el embrión. Además, se ha demostrado que juega un importante papel en el cruce de señales entre ABA y GA a través de la regulación de genes clave para la biosíntesis de ambas hormonas (Shu *et al.*, 2013). ABI5 se encuentra río abajo de ABI3 y reprime la germinación activando un grupo de genes LATE EMBRIOGENESIS ABUNDANT (LEA). Las mutantes insensibles a ABA como *abscisic acid insensitive 1-5 (abi1-5)*, presentan dormancia reducida (Koornneef *et al.*, 1984), mientras que las deficientes en GA, como la mutante *galactokinase 1-3 (gal1-3)* no germinan (Koornneef y van Veen, 1980).

Las giberelinas son hormonas diterpénicas sintetizadas por los tejidos en crecimiento en los embriones o tejidos meristemáticos, que promueve la germinación al facilitar la movilización de compuestos de reserva y la secreción de hidrolasas de pared celular para facilitar la expansión celular (Cooley *et al.*, 1999). Su señalización comienza cuando sus niveles se incrementan y son percibidos por el receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1), el cual forma parte de un complejo de ubiquitinación E3 ligasa. El blanco de este complejo son los reguladores

transcripcionales DELLA que reprimen la activación transcripcional de los PIFs, que son factores que se unen a los promotores de los genes de respuesta al GA (Griffiths *et al.*, 2006). Recientemente, se ha demostrado que algunas proteínas tipo dedos de zinc como la INDETERMINATE DOMAIN 1 (IDD1)/ENHYDROUS (ENY) median el efecto del GA balanceando la maduración promovida por ABA (Feurtado *et al.*, 2011). Se ha sugerido que las proteínas DELLA interactúan con sitios de unión a DNA y cuando estas se unen a las ENY aumentan la acumulación del transcrito DELLA. Los genes de respuesta a GA codifican para algunas enzimas como las glucanasas, endohidrolasas y proteínas tipo expansinas que hidrolizan el endospermo y liberan la inhibición de ABA sobre el crecimiento del embrión (McCarty, 1995; Dorcey *et al.*, 2009), contribuyendo así al crecimiento del embrión, de tal manera que la radícula pueda emerger de la testa.

La germinación está determinada por un balance entre el ABA y el GA, por consiguiente es de esperarse un cruce de señales que regule el nivel de ambas hormonas. Un ejemplo de dicho cruce es el ocasionado por RGA-LIKE 2 (RGL2) principal factor tipo DELLA involucrado en germinación (Tyler *et al.*, 2004), que se expresa durante la germinación temprana en especial antes de la emergencia de la radícula y también estimula la biosíntesis de ABA y la actividad de ABI5. Por otra parte, el ABA mejora la expresión de *RGL2*, sugiriendo que este último juega un papel importante mediando la interacción del GA y el ABA durante la germinación. *RGL2* promueve directamente la transcripción del gen *MOTHER OF FT AND TFL1* (*MFT*) que codifica para una proteína de unión a la fosfatidiletanolamina que participa en la germinación vía señalización del ABA y el GA. La expresión de *MFT* está regulada por ABI3 y ABI5, responde a señales tanto del GA como del ABA y controla la germinación a través de una retroalimentación negativa sobre la vía del ABA (Xi *et al.*, 2010). Además, se ha sugerido que *RGL2* podría también actuar como un regulador negativo de genes que codifican para enzimas hidrolíticas promovidas por GA (Lee *et al.*, 2002). Aunque la germinación es regulada principalmente por el ABA y el GA, también participan otras fitohormonas que mediante un cruce de señales contribuyen en algún proceso vinculado a la germinación (Bentsink *et al.*, 2008).

El papel principal de las auxinas se presenta en la embriogénesis (Liu *et al.*, 1993; Xu y Ni, 1999; Rashotte *et al.*, 2000; Benjamins y Scheres, 2008; Popko *et al.*, 2010). Su participación ocurre en la regulación de la dormancia y germinación mediante un cruce de señales con el ABA (Liu *et al.*, 2007, 2013).

Las auxinas son percibidas por receptores nucleares de la familia TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE (TIR1) y sus proteínas homologas de la familia AUXIN-SIGNALING F-BOX PROTEINS (AFB1, 2, 3, 4). Las auxinas promueven la interacción entre el co-receptor (TIR1/AFB) y el represor transcripcional AUX/IAA lo cual dirige a AUX/IAA a su degradación mediante el complejo SCF^{TIR1/AFB}, la degradación del represor permite que los factores transcripcionales AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) se liberen de la represión causada por su interacción con AUX/IAA e inicien la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Shan *et al.*, 2012). Las mutaciones en *AFB2* y *AFB3* se manifiestan con pérdida de la raíz e hipocótilo y con frecuencia la formación de un solo cotiledón. En *Arabidopsis* se han identificado 23 ARF's únicamente ARF2, ARF5, ARF3 y ARF10 se han involucrado en el desarrollo del embrión. Uno de los reguladores claves de la expansión es AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2) que codifica para un factor de transcripción tipo B3 regulado por auxinas (Li *et al.*, 2004). La mutación en este gen ocasiona la producción de semillas más largas (Schruff *et al.*, 2006). Por otra parte, la pérdida de función en *ARF5/MONOPTEROS (MP)* resulta en alteraciones en la hipófisis que conducen a la ausencia de la radícula y el meristemo radicular y frecuentemente conduce a la letalidad en el embrión (Berleth y Jurgens, 1993; Hardtke y Berleth, 1998). La mutación en *BONDENLOSS (BDL)* que codifica para IAA12 ocasiona un fenotipo similar a *mp*. *ARF3/ETTIN (ETT)* controla el desarrollo correcto de los tegumentos, la mutación en este gen ocasiona efectos similares a *ats* (Kelley *et al.* 2012), en cuanto a ARF10 está involucrado en la germinación a través del ABA, una línea transgénica que expresa un micro RNA resistente a ARF10 (miR-160) es hipersensible a la aplicación exógena de ABA (Liu *et al.*, 2007).

Durante la embriogénesis debe establecerse un máximo de auxinas, desde la primera división del cigoto la célula apical muestra una acumulación de auxinas, en fases posteriores éstas se acumulan en la punta de la radícula, primordios de cotiledones y la hipófisis, este máximo de auxinas se logra probablemente por el transporte de auxinas de origen materno hacia el embrión (Ni *et al.*, 2001; Dorcey *et al.*, 2009). El transporte de auxinas en el embrión está mediado principalmente por proteínas tipo PIN-FORMED (PIN's): PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7 que son expresadas desde las fases tempranas de la embriogénesis. *PIN7* se localiza en el suspensor y la mutación en este gen ocasiona defectos en la formación de la radícula y alteraciones en los cotiledones. Sin embargo, estos defectos pueden recuperarse en la fase globular mediante la expresión de PIN1 y PIN4 ya que al parecer durante el periodo embriogénico los PIN's tienen funciones redundantes, se ha visto que mutantes afectadas en cuatro de estas proteínas, dependiendo del fondo genético, pueden producir plantas sin radícula.

Las auxinas también están involucradas en el desarrollo del endospermo, se les relaciona con la especificación y posicionamiento de la capa aleurónica (Forestan *et al.*, 2010). Los inhibidores del transporte de auxinas como el NPA ocasionan un incremento en el número de capas celulares en aleurona (Becraft y Asuncion-Crabb, 2000; Becraft y Yi, 2011).

Las citocininas (CK's) son hormonas con un papel antagónico a las auxinas que regulan el desarrollo del embrión, cotiledones y hojas (Rashotte *et al.*, 2006). Las citocininas son censadas por receptores tipo histidina cinasas que fosforilan a proteínas denominadas ARABIDOPSIS HISTIDIN PHOSPHOTRANSFER PROTEINS (AHP's) que entran al núcleo e inducen la expresión de genes de la familia ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARR's). Hay dos tipos de genes ARR: los de tipo A que son reguladores negativos de la vía y los del grupo B que regulan la expresión genética como son los CYTOKININ RESPONSE FACTOR (CRF).

Las CK's se pueden sintetizar en la semilla, pero también son transportadas del tejido materno hacia el endospermo (Zhang *et al.*, 2009, Rijavec y Dermastia,

2010). Durante las primeras fases del desarrollo embrionario, los genes relacionados a la producción de CK's se asocian al desarrollo del endospermo y la testa, el endospermo expresa ARR's tipo B (ARR1, ARR18, ARR19, ARR8), CRF2 y CRF3 (Day *et al.*, 2008). Liu *et al.*, (2013) han demostrado que CKY2 es un blanco de IKU. Los receptores de citocininas ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2 (AHK2) y ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 3 (AHK3) regulan el peso y tamaño de las semillas a través de una regulación epigenética (vía cambios en el estado de la cromatina) que influye en la transcripción, a través del desarrollo de los tegumentos y endospermo por proliferación (Sun *et al.*, 2010; Miransari *et al.*, 2014).

Respecto a la función del etileno durante la germinación, se ha observado que las mutantes *ethylene receptor 1 (etr1)* y *ethylene insensitive 2 (ein2)* con alteraciones en la vía del etileno son hipersensibles al ABA. El fenotipo no dormante de la doble mutante *ein2abi3-4* indica que el etileno regula negativamente la dormancia al inhibir la acción del ABA (Beudoin *et al.*, 2000).

Los brasinoesteroides (BR) son fitoreguladores de origen esteroideo que participan en la regulación del desarrollo de estomas, longitud de las células fuente, expansión de hojas, diferenciación de tejido vascular, etc. (Arc *et al.*, 2013). Se les ha atribuido una función sobre la regulación del desarrollo de la semilla, debido a que mutantes deficientes en esta hormona tanto en *Arabidopsis thaliana*, como en *Pisum sativum*, *Solanum lycopersicum* y *Oryza sativa*, aparte de su baja fertilidad también presentan una disminución en la longitud de la semilla (Fujioka y Yokota, 2003; Morinaka *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2010). El mecanismo sugerido para esta hormona indica que BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) el regulador positivo de la vía de los BR activa directamente a genes que controlan el tamaño de la semilla (Jiang *et al.*, 2013) como *AP2*, *TTG2*, *IKU*, *MINI3*, *FIS2*, *MEA*, *FIE*, *MET1*, *SWN* y *MSI2* (Sun, 2010; Jiang, 2013). Estas hormonas actúan sinérgicamente con GA y antagónicamente con ABA (Zhang *et al.*, 2009). Tanto el GA, etileno como BR promueven la germinación al inducir la ruptura del endospermo afectando a las proteínas de la pared celular (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006; Holdsworth *et al.*, 2008; Finkelstein *et al.*, 2008).

2.7. Establecimiento de la plántula

La organización básica del cuerpo de la planta, es decir tanto el patrón apical-basal como el radial de los órganos y tejidos son establecidos durante la embriogénesis (Laux y Jürgens, 1997). Después de la germinación, ocurre el establecimiento de la plántula que consta de una radícula, un hipocótilo y dos cotiledones. El establecimiento de la plántula es altamente sensible a las condiciones ambientales, principalmente la luz. Bajo condiciones de luz los cotiledones se abren y se expanden debido a un aumento de volumen por hidratación y se restringe el crecimiento del hipocótilo (Cosgrove, 1994; Quail *et al.*, 1995). La radícula termina de emerger a los 4 días, el hipocótilo y los cotiledones lo hacen a los 5 días (Boyes *et al.*, 2001). En condiciones de obscuridad los cotiledones se mantienen cerrados formando un gancho apical, el crecimiento de la raíz es reducido y el del hipocótilo es altamente promovido. Durante los primeros dos días después de la germinación el hipocótilo, la raíz y los cotiledones se alargan y los pelos radiculares comienzan su desarrollo (Von Arnim y Deng, 1996). El desarrollo de tricomas comienza hasta que el meristemo apical produce el primer par de hojas verdaderas aproximadamente a los 10 días para tener una máxima exposición a la luz y comienza la síntesis de clorofila (Cosgrove, 1994; Quail *et al.*, 1995). El desarrollo vegetativo de la planta termina a los 26 días cuando emerge la primera inflorescencia.

2.7.1. Diferenciación de la epidermis en *Arabidopsis*

La diferenciación de la epidermis en la raíz y el hipocótilo ocurre desde la embriogénesis (Scheres *et al.*, 1994). Este proceso continúa después de la germinación con la formación de los pelos radiculares en la raíz, así como los estomas y tricomas en la epidermis del hipocótilo y las hojas, respectivamente (Fig. 11). El gen *GLABROUS 2 (GL2)*, que codifica un factor de transcripción se expresa desde etapas tempranas de la embriogénesis en la parte basal del embrión, específicamente en las células del protodermo en la fase de corazón (Reire *et al.*, 1994; Lin y Schiefelbein, 2001) e interactúa con la proteína GL2, WEREWOLF

(WER) y TRANSPARENT TESTA GLABRA (TTG) una proteína con repeticiones WD40 (Walker *et al.*, 1999).

2.7.2. Desarrollo de pelos radiculares

La epidermis de la raíz de *Arabidopsis* es generada partir de 16 células madre iniciales formadas durante la embriogénesis (Dolan *et al.*, 1993; Scheres *et al.*, 1994; Baum y Rost, 1996). Los pelos radiculares son prolongaciones tubulares de células epidérmicas de aproximadamente 10 μm , que se hacen visibles en la plántula rápidamente después de la germinación, sus funciones incluyen la adquisición de nutrientes, anclaje al suelo y la promoción de interacciones microbianas (Hofer, 1991). El primer paso para el desarrollo de los pelos es la especificación celular de células formadoras de pelos (células H) y de células no formadoras de pelos (células N) (Cormack, 1949; Bunning, 1951; Dolan *et al.*, 1993; Galway *et al.*, 1994). Esta diferenciación celular está regulada por la actividad de factores de transcripción pertenecientes a la vía WER/TTG/CPC/GL2 que se expresan desde fases tempranas de la embriogénesis para determinar que las células localizadas en la vecindad de una sola célula cortical se diferencien en células N (Grierson *et al.*, 2014). La expresión de *GL2* en las células N en la raíz depende de la formación de un complejo transcripcional en el cual TTG interactúa con GLABROUS 3/ENHANCER GLABROUS 3 (*GL3/EGL3*), un activador transcripcional bHLH que a su vez interactúa con WER (Bernhardt *et al.*, 2003). En las células H se expresa CAPRICE (CPC), que codifica para una pequeña proteína que actúa como un regulador negativo de la vía WER/TTG/*GL3/EGL3/GL2* (Wada *et al.*, 1997). Este interfiere con la unión de WER a *GL3/EGL3* de una manera competitiva (Lee *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2013), y la mutación en este gen ocasiona una disminución en el número de pelos radiculares.

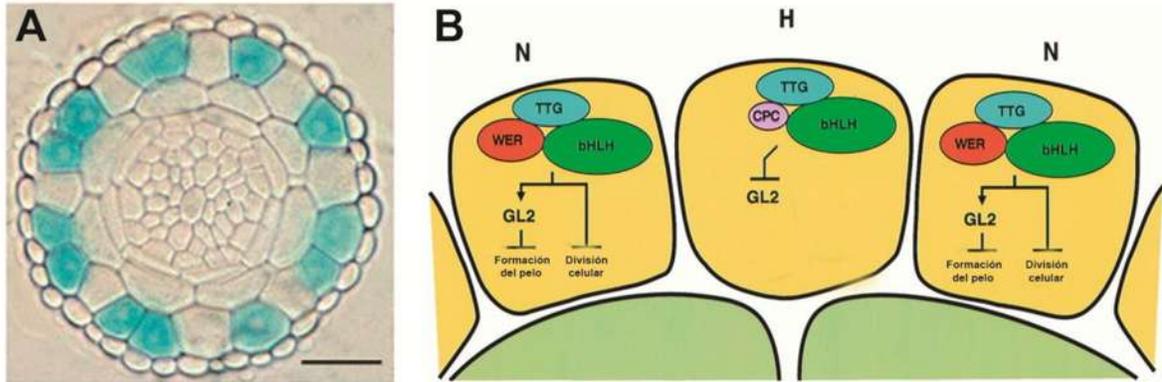


FIGURA 11. Patrón de diferenciación epidérmico en la radícula. **(A)** Expresión de *GL2::GUS* en la epidermis radicular, las células que expresan la línea marcadora se encuentran en posición N. **(B)** Esquema de los genes que establecen la determinación de las células N y células H (Modificado de Grierson *et al.*, 2014).

2.7.3. Desarrollo de tricomas

Los tricomas son protuberancias que poseen tres bifurcaciones y se localizan en la parte aérea de las plantas para atraer polinizadores, proteger a la planta de la luz UV y depredación de insectos mediante exudados (Wagner *et al.*, 2004). Los tricomas se originan de células protodérmicas de los primordios de las hojas, durante la fase vegetativa se distribuyen únicamente en las hojas de la roseta. Su desarrollo está controlado por una serie de factores transcripcionales que tanto en la epidermis de la parte aérea como la radicular forman un complejo trimérico con proteínas de la vía WER/TTG/GL3/EGL3/GL2. El complejo está formado por GL1, GL3/EGL3 y TTG1 que activan la expresión de GL2, que induce la producción de tricomas (Reire *et al.*, 1994). Incluso la mutación en CPC muestra un fenotipo con un aumento en el número de tricomas. La mutación en GL3/EGL3 resulta en una disminución en el número de tricomas y la bifurcación de estos, de la misma manera TTG1 disminuye el número de tricomas.

2.8. Péptidos como reguladores de crecimiento y desarrollo

Los procesos de desarrollo son regulados por la homeostasis de distintas hormonas, al igual que en modelos animales, las plantas poseen moléculas de origen peptídico que funcionan como reguladores del crecimiento y desarrollo, ya que modulan la actividad meristemática, la formación de órganos como hojas, raíces y flores (Edlund y Jessell, 1999). Los péptidos se pueden ser péptidos de secreción y de no secreción (Hashimoto *et al.*, 2008; Katsir *et al.*, 2011; Matsubayashi, 2011). Los péptidos de no-secreción están involucrados tanto en procesos de desarrollo como en respuesta a estrés ambiental. Los péptidos de secreción participan en procesos de crecimiento y desarrollo. Se han identificado 10 diferentes tipos de familias que codifican para péptidos de secreción en plantas entre las cuales se encuentran CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE), EPIDERMAL PATTERNING FACTOR (EPF), ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF)/CLE LIKE (CLEL)/GOLVEN (GLV), INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION LIKE (IDL) y RAPID ALKALINISATION FACTOR (RALF) por citar algunas. CLE en *Arabidopsis* codifica para 32 péptidos mientras que RGF/CLEL/GLV para 11 (Stenvik *et al.*, 2008; Matsuzaki *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2012). Los péptidos de secreción se pueden clasificar en dos grupos: i) ricos en cisteína con <160 residuos de amino ácidos con un dominio de cisteína en el C-terminal y ii) pequeños con modificaciones postransduccionales que contiene en promedio 20 residuos de amino ácidos (Matsubayashi, 2012). Los péptidos de secreción son transcritos como pre-propéptidos con una secuencia señal en el N-terminal que facilita su transporte a través del sistema reticular, el cual es removido por peptidasas produciendo un propéptido que será modificado estructuralmente (Matsubayashi, 2011), los péptidos ricos en cisteína forman puentes disulfuro y los pequeños sufren diversos tipos de modificaciones postransduccionales en residuos de aminoácidos específicos como: sulfatación de tirosina, hidroxilación de prolina y/o arabinosilación de hidroxiprolina para producir un péptido maduro con actividad biológica (Fig. 12, Matsubayashi, 2011; Mellado-Rojas *et al.*, 2013).

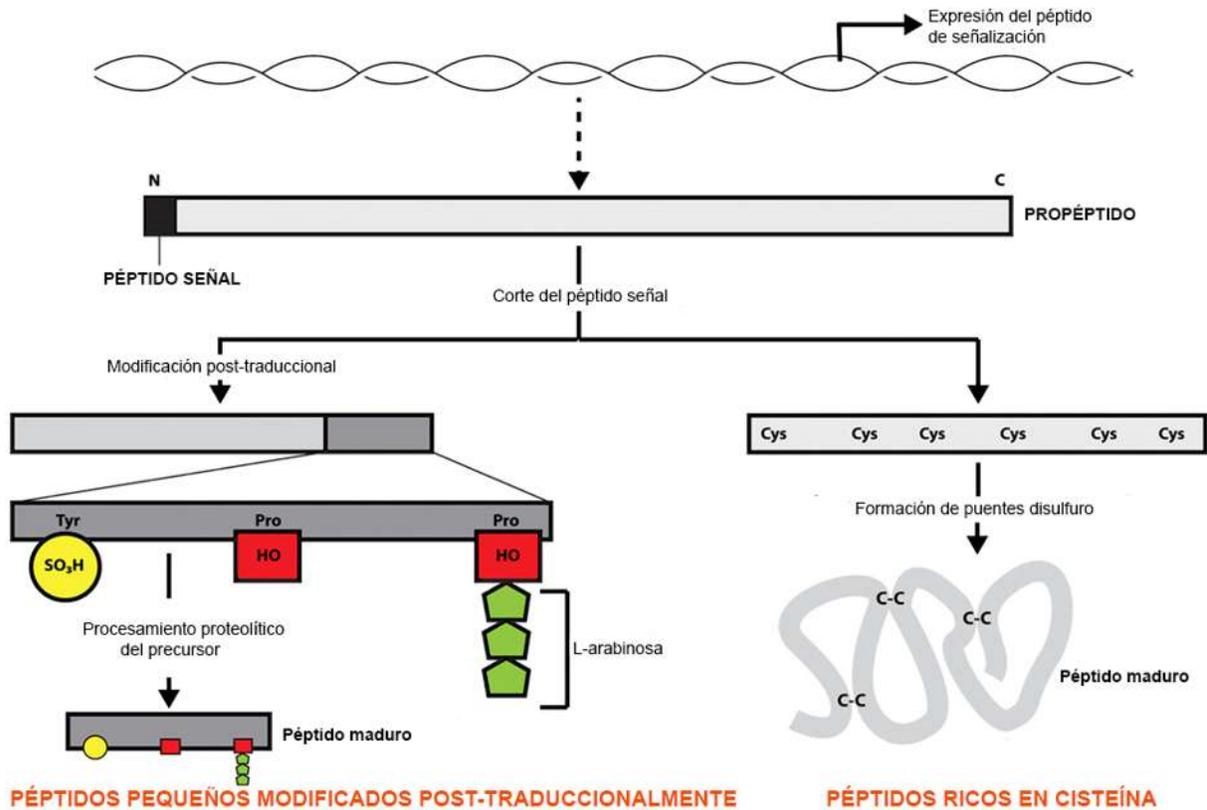


FIGURA 12. Procesamiento de péptidos de señalización. La transcripción de genes que codifican para péptidos de señalización produce un pre-propéptido que contiene una secuencia señal que lo dirige al retículo endoplásmico donde una peptidasa cortará la señal. Una vez cortada el propéptido formado es susceptible a sufrir modificaciones de acuerdo al grupo de péptidos de secreción al cual pertenece para formar así un péptido maduro (Modificado de Murphy *et al.*, 2012).

2.9. ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)

Las glutamato carboxipeptidasas son enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia de las metaloproteasas M28 las cuales se caracterizan por tener dos iones Zn que activan una molécula de agua para que lleven a cabo un ataque nucleofílico sobre un enlace peptídico (Rawlings y Salvesen, 2013). Estas enzimas juegan un importante papel en el tráfico de proteínas de secreción. Las metaloproteasas humanas han sido de interés particular porque se involucran en procesos asociados a cáncer y patologías durante el desarrollo (Klein y Bischoff, 2011; Sbardella *et al.*, 2012). *ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1)* codifica para una glutamato carboxipeptidasa de función desconocida (Fig. 13a, Helliwell *et al.*, 2001), que

mantiene una similitud del 48% con una glutamato-carboxipeptidasa humana la N-acetylated- α -linked acidic dipeptidase (NAALADase) la cual modula las concentraciones del glutamato que funciona como neurotransmisor en el tejido neuronal (Robinson *et al.*, 1987). Las mutantes *amp1* muestran defectos pleiotropicos que afectan el desarrollo de la planta en diferentes etapas, los cuales incluyen alteraciones en el meristemo apical y el número de cotiledones, aumento de la dormancia en las semillas y proliferación celular así como fotomorfogenesis constitutiva y aumento del tiempo de floración (Fig. 13B-D, Chaudhury *et al.*, 1993; Mordhorst *et al.*, 1998; Nogué *et al.*, 2000a, b; Griffiths *et al.*, 2011).

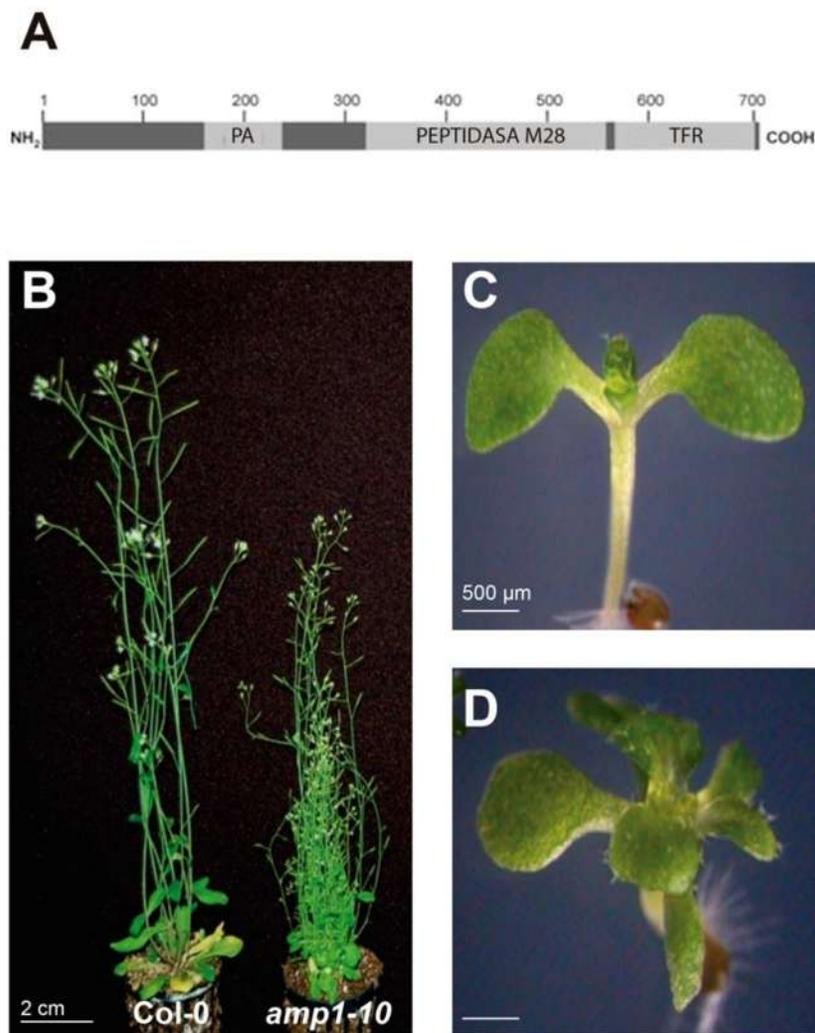


FIGURA 13. La mutación en *amp1-10*. **(A)** Dominios conservados en AMP1. **(B)** Fenotipo de la mutante *amp1-10* en desarrollo post- embrionario. **(C)** Plántula silvestre (Col-0). **(D)** Plántula mutante *amp1-10*.

El cDNA de *AMP1* codifica para 706 aminoácidos, contiene seis hexones, una putativa caja TATA localizada a 60 pares de bases cascada arriba del codón de inicio. La proteína AMP1 posee tres dominios característicos: de peptidasa M28, un dominio asociado a proteasas y un dominio de receptor tipo transferrina (Fig. 13A). La proteína AMP1 se localiza en el retículo endoplasmático y podría modular los niveles de una pequeña molécula de origen peptídico que regula distintas fases del desarrollo (Helliwell *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas tienen un gran impacto en la economía mundial debido a que la alimentación humana se sustenta en alimentos de origen vegetal y animal, además la alimentación de los animales también se basa en forrajes provenientes de la familia de las gramíneas. Para incrementar la producción de las plantas de interés comercial es de vital importancia conocer los procesos involucrados en el desarrollo de las semillas y el impacto que este proceso tiene sobre la germinación y el desarrollo post-embrionario de la propia planta.

Arabidopsis ofrece ventajas como modelo biológico para el estudio del desarrollo y germinación de la semilla. *AMP1* codifica para una carboxi-peptidasa involucrada en el procesamiento de péptidos de señalización, además de estar vinculada con diversas vías hormonales. Sin embargo, se desconoce a nivel celular y molecular su participación en los procesos del desarrollo embrionario y post-embrionario. El entendimiento de estos procesos aportará información sobre la regulación del desarrollo en plantas.

4. HIPÓTESIS

AMP1 regula procesos del desarrollo embrionario que afectan la estructura de la semilla, el desarrollo del embrión y la diferenciación celular epidérmica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Determinar los procesos de crecimiento y desarrollo regulados por *AMP1*.

5.2. Objetivos específicos:

1. Determinar la participación de *AMP1* en el desarrollo embrionario y formación de la semilla.
2. Analizar el papel de *AMP1* en el desarrollo post-embrionario y la diferenciación de la epidermis.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico. Para la realización de los diferentes experimentos, se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia 0 (Col-0), *Landsberg erecta* (Ler) y Wassilewskija (Ws), así como de las líneas transgénicas PRO:AMP1 (por complementación de *amp1-20*) (Shi *et al.*, 2013) y AMP1 OX2 (línea sobreexpresora) (Shi *et al.*, 2013) y mutantes sencillas y dobles *amp1-10* (SALK_021406), *amp1-22* (SALK_138749), *cre1-12* (Inoue *et al.*, 2001), *ahk2-2* (Ueguchi *et al.*, 2001), *ahk3-3* (Ueguchi *et al.*, 2001), *det2-1* (Chory *et al.*, 1991), *rpn12* (Smalle *et al.*, 2002), *ein2* (Guzman *et al.*, 1990), *ein3* (Kieber y Ecker, 1993), *etr1* (Bleecker *et al.*, 1988), *eto3* (Woeste y Kieber, 1999), *ctr* (Kieber *et al.*, 1993), *Atnoa1* (Guo *et al.*, 2003), *nia1nia2* (Wilkinson y Crawford, 1993), *jar1* (Tiryaki y Staswick, 2002), *pft1-2* (Raya-González *et al.*, 2014), *sag13*, *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990), *axr2-1* (Wilson *et al.*, 1990), *slr1* (Fukaki *et al.*, 2002), *arf7arf19* (Okushima *et al.*, 2007), *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009), *abi1* (Leung *et al.*, 1997), *abi2* (Leung *et al.*, 1997), *abi3* (Nambara *et al.*, 1992), *abi4* (Finkelstein *et al.*, 1998), *abi5* (Finkelstein, 1994) and *drr1* (Morquecho-Contreras *et al.*, 2010).

6.2. Microscopía. Las semillas *Arabidopsis thaliana* se analizaron utilizando microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B) en 40X.

6.3. Microscopía electrónica. Semillas secas de *Arabidopsis thaliana* WT y de las diferentes clases de semillas de *amp1* fueron cubiertas con cobre para hacerlas conductoras y ser analizadas en un microscopio electrónico de barrido (JSM-7600F) en los aumentos 250, 500 y 3000X.

6.4. Detección de mucílago. Semillas secas de *Arabidopsis thaliana* WT y de las diferentes clases de semillas de *amp1* se colocaron en solución de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) al 50 mM por dos horas a 1000 rpm. Posteriormente, se retiró la solución y se adicionó rojo de rutenio al 1% por una hora a 1000 rpm, se retiró nuevamente la solución y se procedió a lavar dos veces con agua destilada. Se montaron preparaciones semipermanentes para ser analizadas mediante microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B) a 40X.

6.5. Preparación de las semillas. Las semillas WT y de las diferentes clases segregadas por *amp1* se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml, se agregaron 500 µl de etanol al 96% v/v y se sometieron a agitación durante 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se retiró el etanol y adicionó 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% v/v, sometiéndose nuevamente a agitación por 7 minutos. Finalmente, se retiró el hipoclorito y se lavaron con 1 ml de agua destilada estéril, cinco veces durante de 1 minuto en agitación. El proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Al finalizar la desinfección, los tubos se colocaron a 4 °C durante 48 h para promover y homogenizar la germinación.

6.6. Preparación del medio de cultivo. En un frasco conteniendo agua destilada se agregó 0.6 % de sacarosa, posteriormente 0.9 g por litro de sales de Murashige y Skoog (con los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas) (1962) (MS) que corresponden a una concentración de 0.2X. El medio MS está formado por los siguientes componentes: NH₄NO₃ 4.12 mM, KNO₃ 3.76 mM, CaCl₂.2H₂O 0.6 mM, MgSO₄.7H₂O 0.3 mM, KI 1 µM, H₃BO₃ 20 µM, MnSO₄.H₂O 20µM, ZnSO₄.7H₂O 6 µM, NaMoO₄.2H₂O 0.2 µM, CuSO₄.5H₂O 0.02 µM, CoCl₂.6H₂O 0.02 µM, FeSO₄.7H₂O 0.02 mM, Na₂EDTA.2H₂O 0.02 mM. Una vez adicionados todos los componentes del medio se disuelven por agitación, se ajustó el pH a 7, con KOH 0.1 N y se agregó agar al 1 %. El medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120 °C y 15 libras de presión. Después el medio es vaciado en cajas de Petri desechables estériles de 100 x 15 mm y se deja solidificar.

6.7. Condiciones de crecimiento. Después de la siembra de las semillas estas se incubaron en una cámara de crecimiento Percival AR95L con fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad, temperatura de 22 °C y humedad del 80 %. Las cajas se colocaron en posición vertical con un ángulo de 75° de inclinación, para permitir tanto el crecimiento del sistema radicular como del aéreo de la planta.

6.8. Análisis de pelos radiculares, tricomas y silicuas. Una vez solidificado el medio, se procedió a siembra de las semillas de Col-0 y *amp1-10* en la parte superior en fila para permitir a la raíz un crecimiento sobre el medio, las cajas se sellaron con

plástico o cinta micropore, para evitar contaminación por microorganismos como bacterias y hongos y se colocaron en cámara de crecimiento. A los siete días se analizaron los pelos radiculares mediante microscopio estereoscópico (Leica MZ6) en un aumento de 1.25X y 4.0X y preparaciones semipermanentes con microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B) en el aumento 40X, posteriormente fueron medidos con el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Los tricomas fueron analizados a los 14 días mediante microscopio estereoscópico en 0.63X y 1.25X y medidos con el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). A los 14 días algunas plantas fueron transferidas a suelo para la producción de semillas. Diez silicuas fueron diseccionadas con una aguja para exponer los embriones y fotografiarlos con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6).

6.9. Ensayo de germinación. Semillas silvestres y de la mutante *amp1* fueron desinfectadas y sembradas en medio MS adicionado con y sin ácido giberélico (GA) 1 μ M. Las cajas de Petri se colocaron en la cámara de crecimiento y se monitorearon cada 4 hrs; la salida de la radícula se registró como indicativo de germinación.

6.10. Análisis de embriones. Embriones silvestres y de las diferentes clases de semillas segregadas por *amp1* fueron extraídos de la silicua en diferentes estadios, con una aguja e incubados por dos días en solución de Hoyer (preparada como se describe en Seed Genes Project database; <http://www.seedgenes.org>). Después se clarificaron y fueron analizados con microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B).

6.11. Análisis de datos. Los datos fueron analizados por univarianza y sometidos a una prueba post hoc Tukey para determinar diferencias en las respuestas evaluadas en todos los tratamientos. En las gráficas las letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$). Para todos los experimentos los datos se analizaron estadísticamente con el programa StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system). www.statsoft.com.

6. RESULTADOS

7.1. La mutación en *AMP1* afecta el tamaño del fruto y la producción de semillas

El desarrollo de las semillas es de vital importancia como característica adaptativa. Un análisis de plantas de *Arabidopsis* (Col-0) y *amp1-10* crecidas en suelo mostró que las silicuas de la mutante *amp1* son 65% más cortas que las silicuas de plantas silvestres, con un menor número de semillas y un incremento en el número de eventos abortivos, lo cual sugiere que la fertilización podría estar afectada en la mutante *amp1-10* (Fig. 14). Para analizar la viabilidad de las semillas, tres lotes con 500 semillas de plantas homocigas de *amp1-10* fueron comparadas con semillas silvestres. *amp1* segregó cuatro fenotipos de semillas (Fig.15), que denominamos “regulares”, “rugosas”, “irregulares” y “protrusivas”. En las semillas de la primera clase (~80% *amp1-10*/semillas, regular) la mutación en el gen *AMP1* no causó alteraciones significativas en las semillas (Fig.15B). En la segunda clasificación (~8% *amp1-10*/semillas, rugosas) se incluyeron semillas con arrugas en la testa (Fig.15C). La tercera clase (~10% *amp1-10*/semillas, irregular) contiene semillas con alteraciones en la forma, estructura de la testa y pigmentación (Fig. 15D), mientras que en última clase (~2% *amp1-10*/semillas, protrusivas) las semillas expulsan al embrión (Fig. 15E).

Para confirmar que las diferentes clases de semillas observadas en la mutante *amp1-10* son un efecto de la mutación en *AMP1* analizamos otro alelo, *amp1-22* (Fig. 16), el cual nuevamente segregó las cuatro clases de semillas (Fig. 17). Además, una línea complementada con una copia de *AMP1* en la mutante *amp1-20* revierte el fenotipo segregando únicamente semillas silvestres (Fig. 17B), lo cual corrobora que las alteraciones en las diferentes clases de semillas es un efecto de la mutación sobre *AMP1*. La línea que sobre-expresa a *AMP1* (OX2) no presentó alteraciones en las semillas (Fig. 17C). Estos datos muestran que aunque la pérdida de función en *AMP1* afecta la forma y tamaño de las semillas, altos niveles de *AMP1* no alteran la morfogénesis de la semilla.

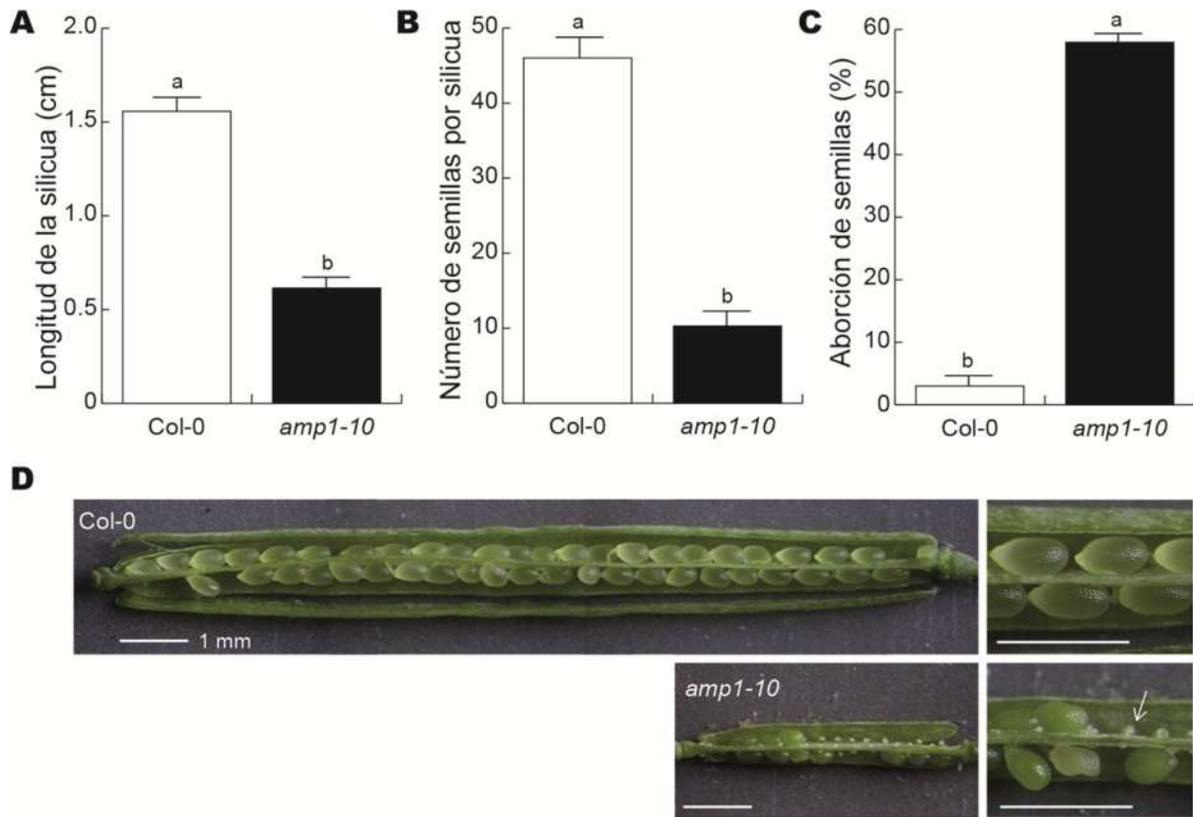


FIGURA 14. Fenotipos de las silicuas de plantas silvestres (Col-0) y *amp1-10*. **(A)** Longitud de la silicua. **(B)** Número de semillas por silicua. **(C)** Eventos abortivos por silicua. **(D)** Micrografías representativas de las silicuas silvestres y *amp1-10*. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).



FIGURA 15. La mutación en *AMP1* causa cuatro diferentes fenotipos de semilla. **(A)** Se muestran semillas de plantas silvestres (Col-0). **(B-E)** se muestran los diferentes fenotipos de semilla segregados por *amp1-10*. **(B)** Semillas “regulares”. **(C)** Semillas “rugosas”. **(D)** Semillas “irregulares”. **(E)** Semillas “protrusivas”.

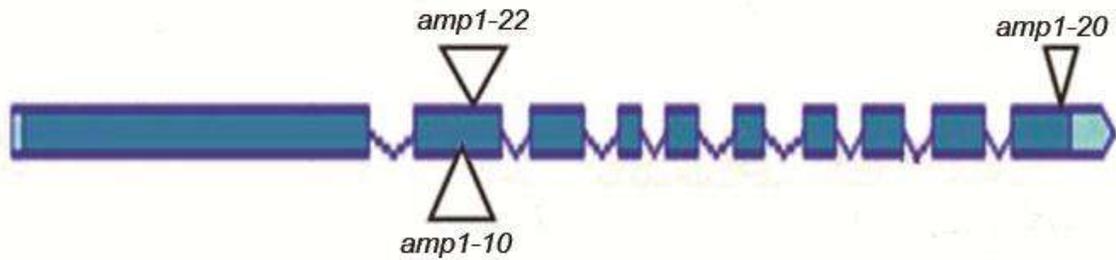


FIGURA 16. Esquema de las mutaciones en *amp1-10*, *amp1-20* y *amp1-22*. El gen *AMP1* consta de 10 exones y 9 intrones mostrados en cuadros azules y líneas azules respectivamente, en triángulos invertidos se muestra la localización de cada una de las mutaciones, *amp1-10* y *amp1-22* afectan al exón 2 mientras que *amp1-20* afecta al exón 10 (Modificado de Shi *et al.*, 2013).

Las fitohormonas son conocidas por participar en la regulación del desarrollo de las semillas por lo cual se analizó si el fenotipo de semillas *amp1* podría ser observado en mutantes afectadas en vías de señalización hormonal (ET, CK's, ABA, NO y ácido jasmónico, JA). Se midió la amplitud de 100 semillas secas de cada una de las siguientes líneas mutantes: *cre1-12*, *ahk2-2*, *ahk3-3*, *rpn12* corresponden a la vía de CK; *det2-1*, a la de BR; *ein2*, *ein3*, *etr1*, *eto3*, *ctr1*, a la del ET; *Atnoa1*, *nia1nia2*, a la de NO; *jar1*, *med25*, *sag13*, a la vía de JA; *aux1-7*, *axr2-1*, *slr1*, *arf7arf19*, *tir1afb2afb3*, a la de auxinas; *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5*, *drr1* a la de ABA. Sin embargo ninguna de las mutantes incluidas mostró fenotipos de semillas similares a los encontrados en *amp1* (Fig. 18).

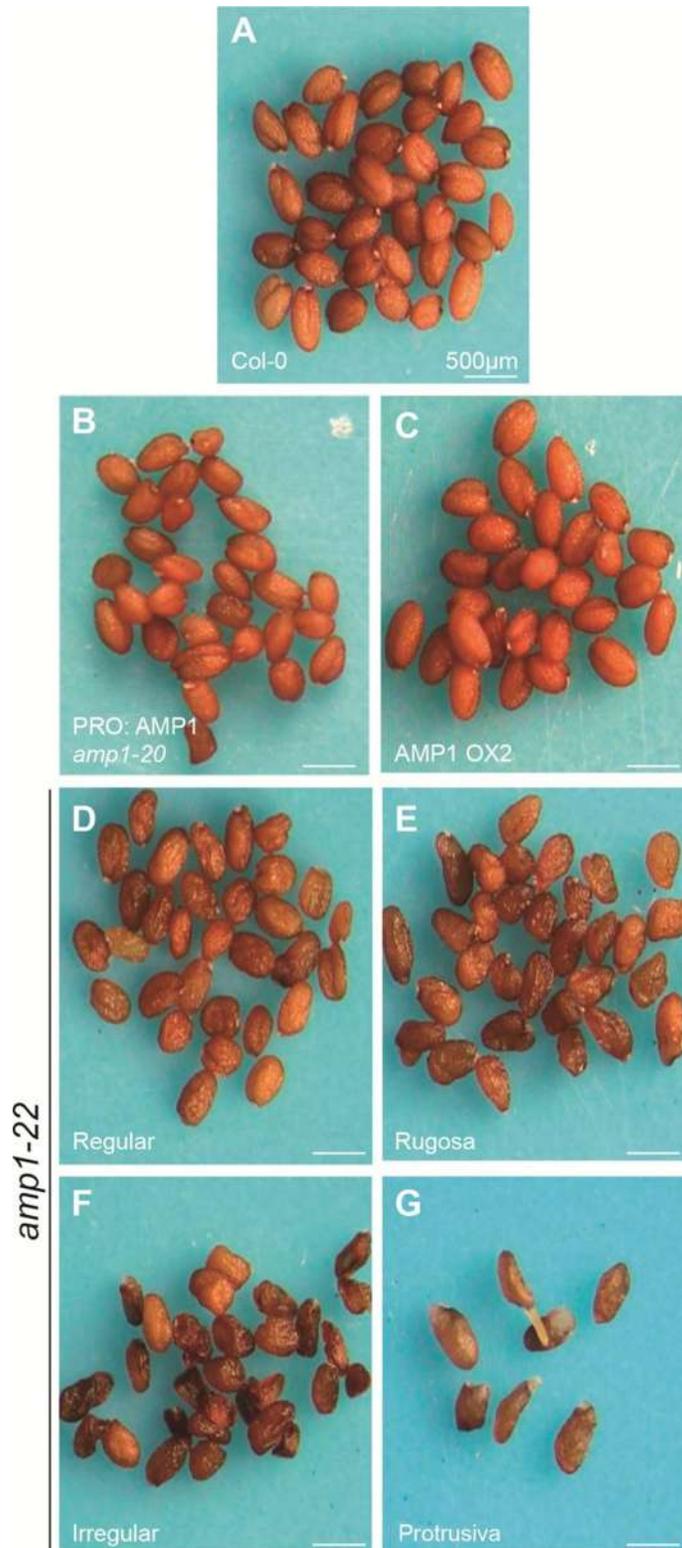


FIGURA 17. Los fenotipos de semillas son causados por la mutación en *amp1*. **(A)** Semillas silvestres (Col-0). **(B)** *amp1-20* complementada con una copia del gen *AMP1*. **(C)** Línea sobre-expresora de *AMP1*. **(D-E)** Fenotipos de semilla de *amp1-22*. **(D)** semillas “regulares”, **(E)** semillas “rugosas”, **(F)** semillas “irregulares”, **(G)** semillas “protrusivas”.

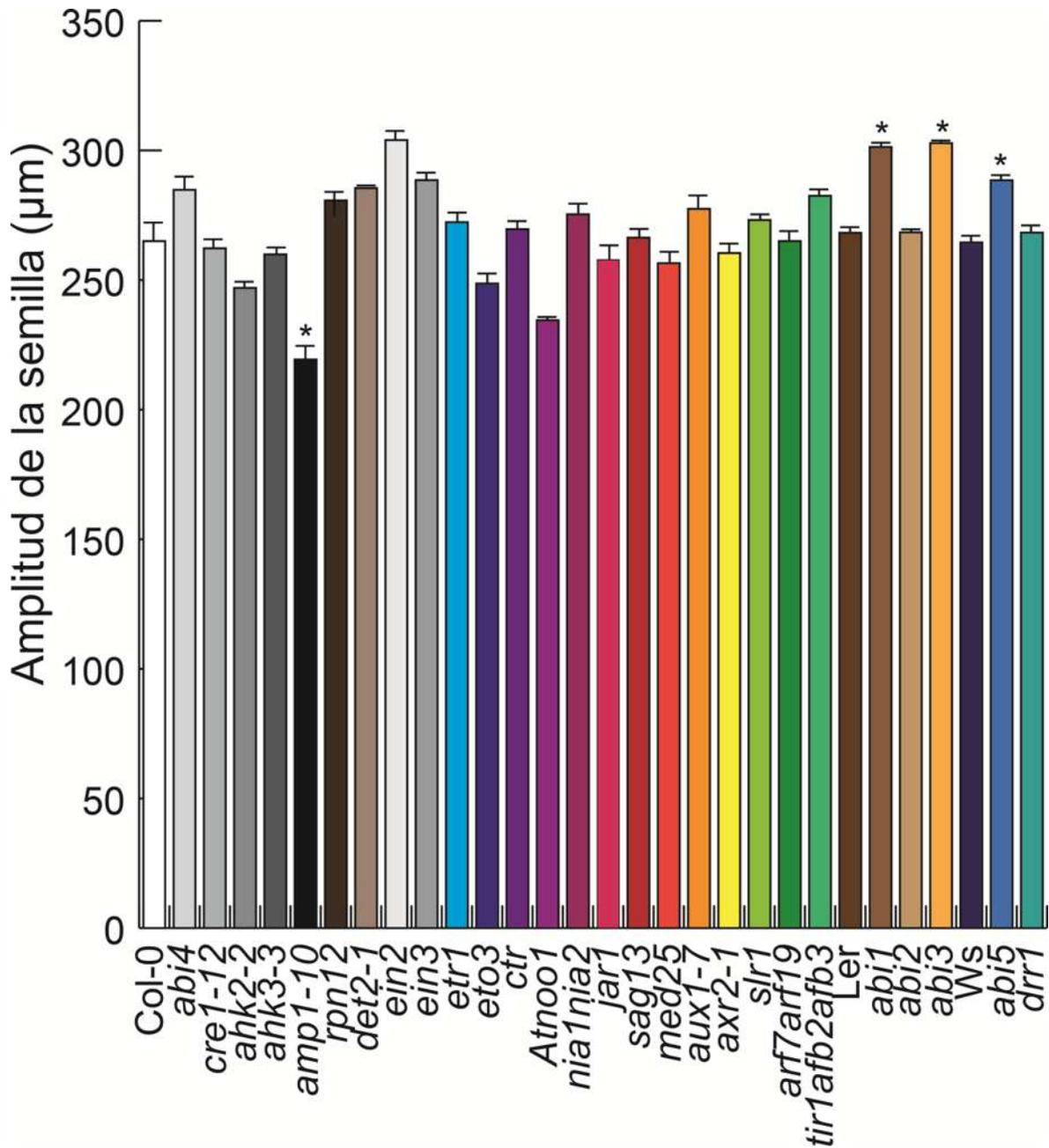


FIGURA 18. Análisis de la amplitud de semillas afectadas en vías hormonales. Semillas silvestres (Col-0, Ler y Ws) y mutantes afectadas en las vías del ABA (*abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5*, *drr1*), CK's (*cre1-12*, *ahk2-2*, *ahk3-3*, *rpn12*), BR (*det2-1*) ET (*ein2*, *ein3*, *etr1*, *eto3*), NO (*Atnoa1*, *nia1nia2*), JA (*jar1*, *med25*, *sag13*) y auxinas (*aux1-7*, *aux2-1*, *slr1*, *arf7arf19*, *tir1*, *afb2afb3*) fueron medidas individualmente usando el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Los valores representan la media \pm error estándar de 3 repeticiones analizadas, los asteriscos indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).

7.2. Las semillas de *amp1* muestran defectos en la estructura de la testa y producción de mucílago

La capa externa de las semillas de *Arabidopsis* consiste de células muertas que forman una estructura poligonal con una bolsa con forma de dona alrededor de una elevación central en forma de volcán conocida como columela. Para determinar si *AMP1* modula la morfología de la semilla a través de modificaciones en las células de la testa se analizaron 10 semillas de cada clase y se compararon con semillas silvestres mediante microscopia electrónica de barrido. Este análisis reveló que la característica poligonal del mucílago y la columela estaban bien definidas en las semillas silvestres (Fig. 19A-C), en cambio la testa de las diferentes clases de semillas de *amp1-10* exhiben células epidérmicas anormales (Fig. 19D-O). Aunque aparentemente no hay diferencias significativas en el tamaño de las semillas “regulares” y “rugosas” con respecto a las semillas WT, las columelas de estas clases de semillas mutantes mostraron ser más robustas (Fig. 19F, I y L) mientras que las semillas “protrusivas” tuvieron una organización anormal en las células de la testa, perdiendo la formación hexagonal alrededor de la columela (Fig. 19O).

El contenido de mucílago puede ser estimado mediante tinción con rojo de rutenio que se une a biopolímeros ácidos encontrados en la testa (Hanke y Northcote, 1975). La tinción de semillas silvestres con rojo de rutenio mostró dos dominios característicos: uno interno que adquiere una coloración magenta y uno externo que no se tiñe (Fig. 20A-C). La tinción de las diferentes clases de semillas evidencia los siguientes datos: las semillas “regular” y “rugosa” mostraron patrones de tinción similares a los de las silvestres, sin embargo las semillas “irregulares” y “protrusivas” presentaron regiones que no fueron teñidas (Fig. 20J-O), indicando una relación directa entre los fenotipos de *amp1* y la formación de la cápsula de mucílago durante la imbibición de la semilla.

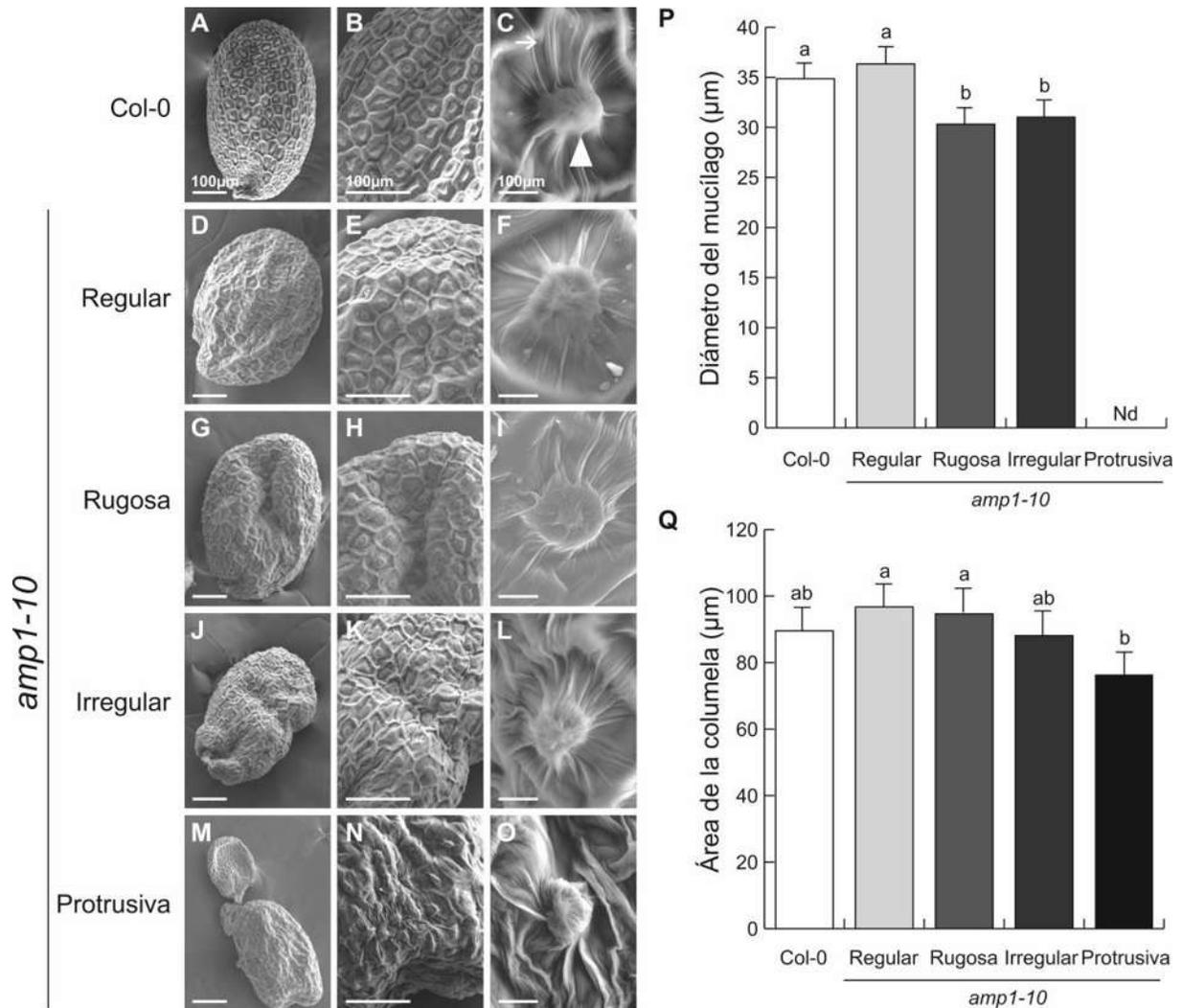


FIGURA 19. La mutación en *AMP1* afecta la estructura de la testa. Semillas silvestres secas y de los diferentes fenotipos de *amp1* fueron cubiertas con cobre para ser analizadas por microscopía electrónica. **(A-C)** Semillas silvestres mostrando una estructura reticular de hexágonos (indicado con flecha blanca) que delimitan la columela (cabeza de flecha). **(D-F)** semillas *amp1* con fenotipo “regular”. **(G-I)** semillas “rugosas”. **(J-L)** semillas “irregulares”. **(M-O)** semillas “protrusivas”. Los fenotipos “rugosos”, “irregulares” y “protrusivas” de *amp1* muestran alteraciones en la columela. **(P)** Diámetro de la bolsa de mucílago y **(Q)** Área de la columela ambos medidos de micrografías electrónicas usando el programa Image J. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).

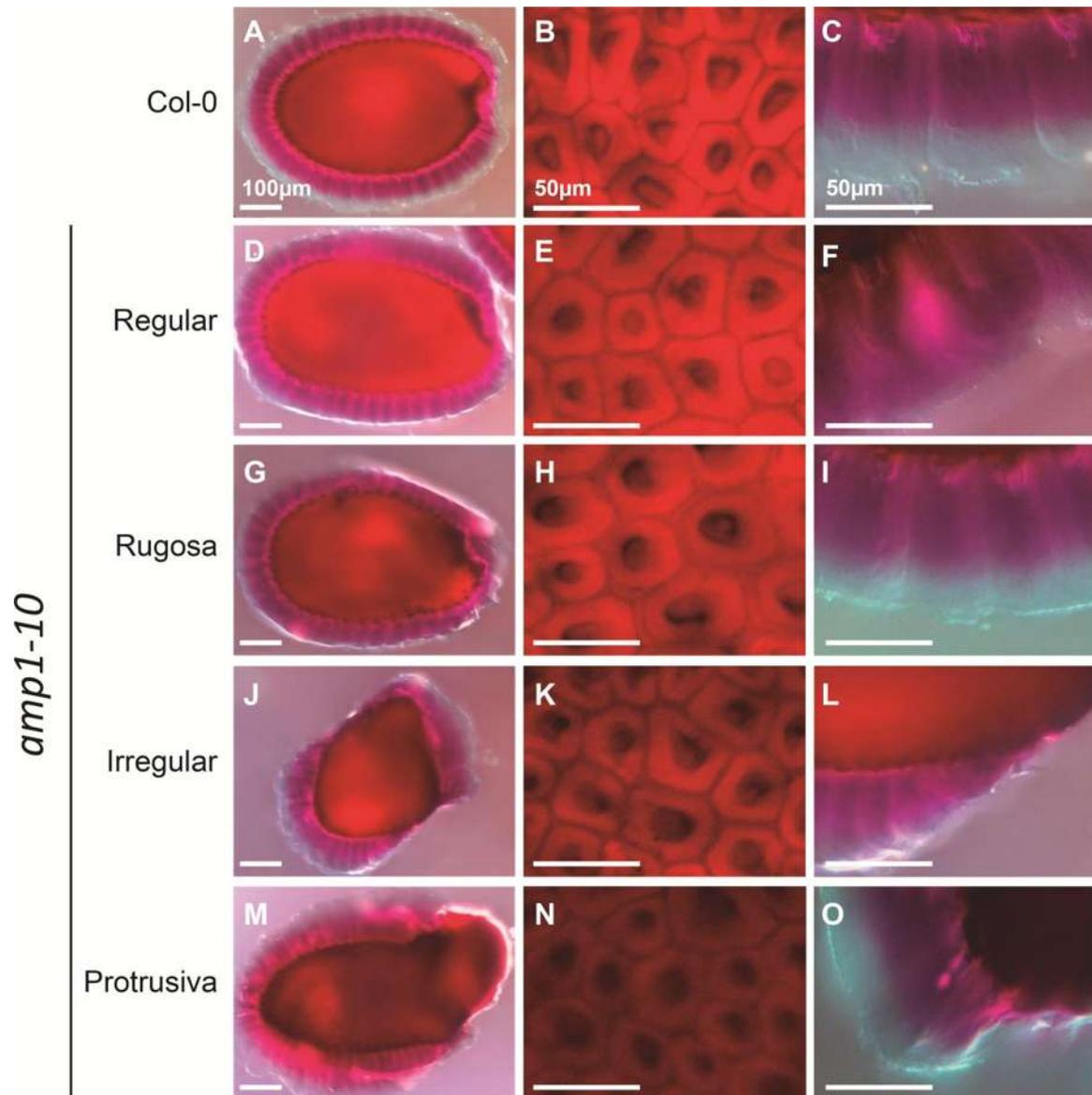


FIGURA 20. La formación de la cápsula de mucílago está alterada *amp1-10*. Semillas WT y *amp1* fueron teñidas con rojo de rutenio y observadas con microscopia de Nomarsky. La cápsula de mucílago en semillas WT (Col-0) muestran dos dominios característicos.

7.3. Relación entre el desarrollo de la testa y el embrión en la mutante *amp1*

Vidaurre *et al.*, (2007) habían reportado que la mutación de *AMP1* afecta el desarrollo embrionario al ocasionar divisiones celulares ectópicas y un desarrollo exagerado del meristemo apical. Para analizar si las alteraciones embrionarias ya reportadas podrían estar relacionadas con alteraciones en la testa, se analizaron embriones silvestres y de mutantes *amp1* en diferentes estadios. En la figura 21 en la columna izquierda se muestran embriones silvestres en los diferentes estadios y el desarrollo normal de la testa en cada uno de ellos (Fig. 21A-J). Los embriones de *amp1* desarrollaron comúnmente embriones con tres cotiledones (Fig. 21K-T) y mostraron alteraciones en el desarrollo de la testa a nivel de acumulación de mucílago en los diferentes estadios así como el ya reportado hiper-desarrollo del meristemo apical. De la misma manera se procedió a clarificar semillas maduras de cada una de las diferentes clases *amp1*. Las semillas “irregulares” de *amp1* presentaron testas maduras y conteniendo embriones en estadios tempranos o vacíos (Fig. 22). Al disectar embriones de semillas maduras silvestres y de las diferentes clases de *amp1*, se encontró que los embriones de semillas “regulares” y “rugosas” son preferentemente tricotiledóneos, las semillas “irregulares” y “protrusivas” mostraron ser masas celulares indiferenciadas y estar fuertemente adheridas a la testa (Fig. 23). Estos resultados sugieren que el desarrollo de la testa es independiente del desarrollo del embrión y que la mutación en *amp1* altera la acumulación de mucílago en la testa.

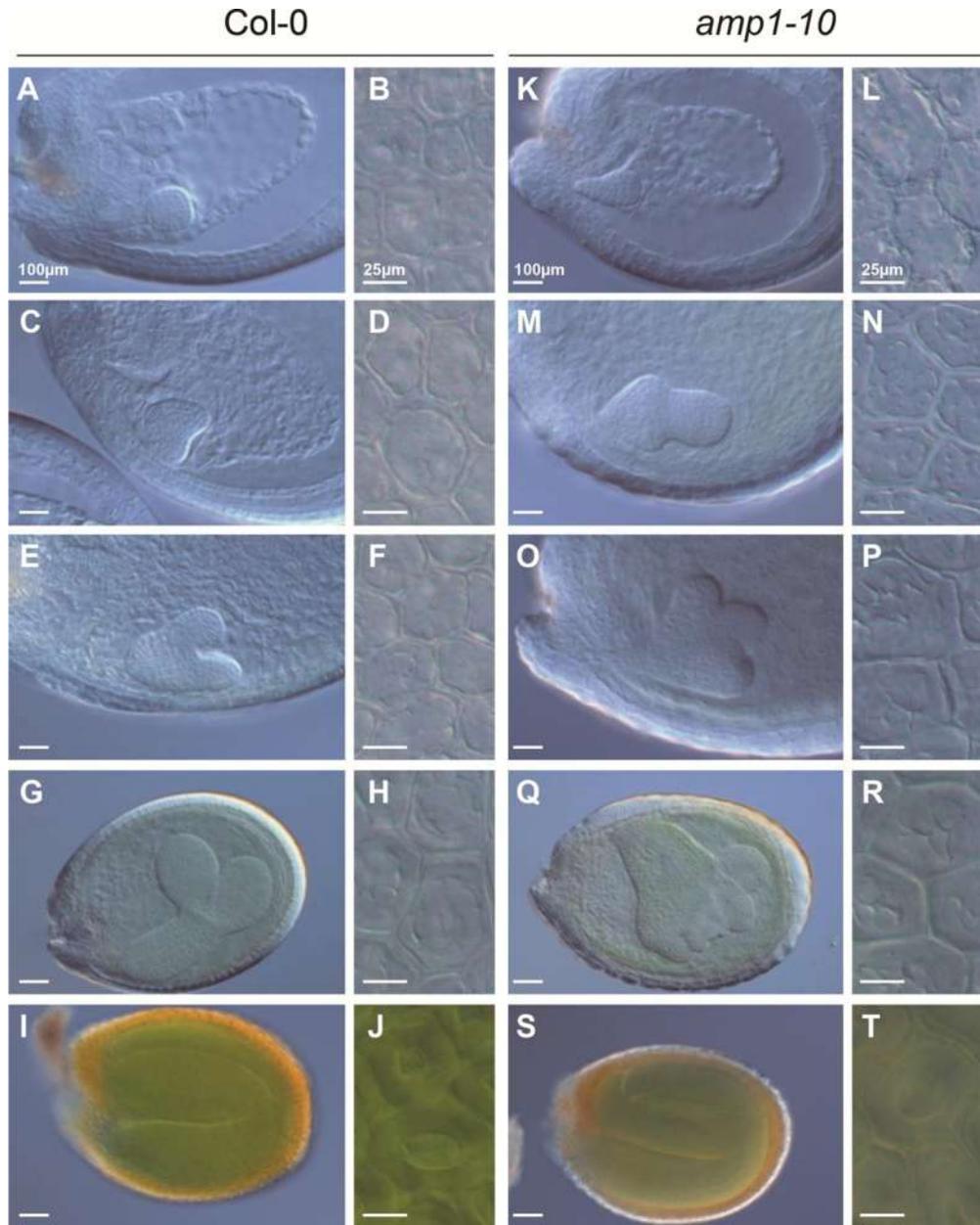


FIGURA 21. La mutación en *AMP1* afecta el desarrollo del embrión. En la primera columna se muestran embriones silvestres (Col-0) en las diferentes etapas embrionarias: **(A)** Pre-globular, **(C)** globular, **(E)** Corazón, **(G)** Cinturón e **(I)** Embrión maduro. En la segunda columna se muestra el desarrollo de la testa en cada una de las etapas embrionarias **(B, D, F, H y J)**. La tercera columna muestra el desarrollo del embrión en *amp1* en cada una de las etapas correspondientes a los embriones WT **(K, M, O, Q y S)**, se puede observar un hiper-desarrollo del meristemo aéreo en todas las etapas que le da a los embriones mutantes una apariencia de “chupón”, además desde la etapa de corazón se puede observar el aumento en el número de cotiledones. En la última columna que muestra el desarrollo de la testa en su correspondiente etapa embrionaria en *amp1* muestra alteraciones en la acumulación de mucílago y formación de la columela. Las micrografías fueron tomadas mediante microscopía de Nomarsky. La barra de escala es indicada en **(A, B, K y L)** para cada columna.

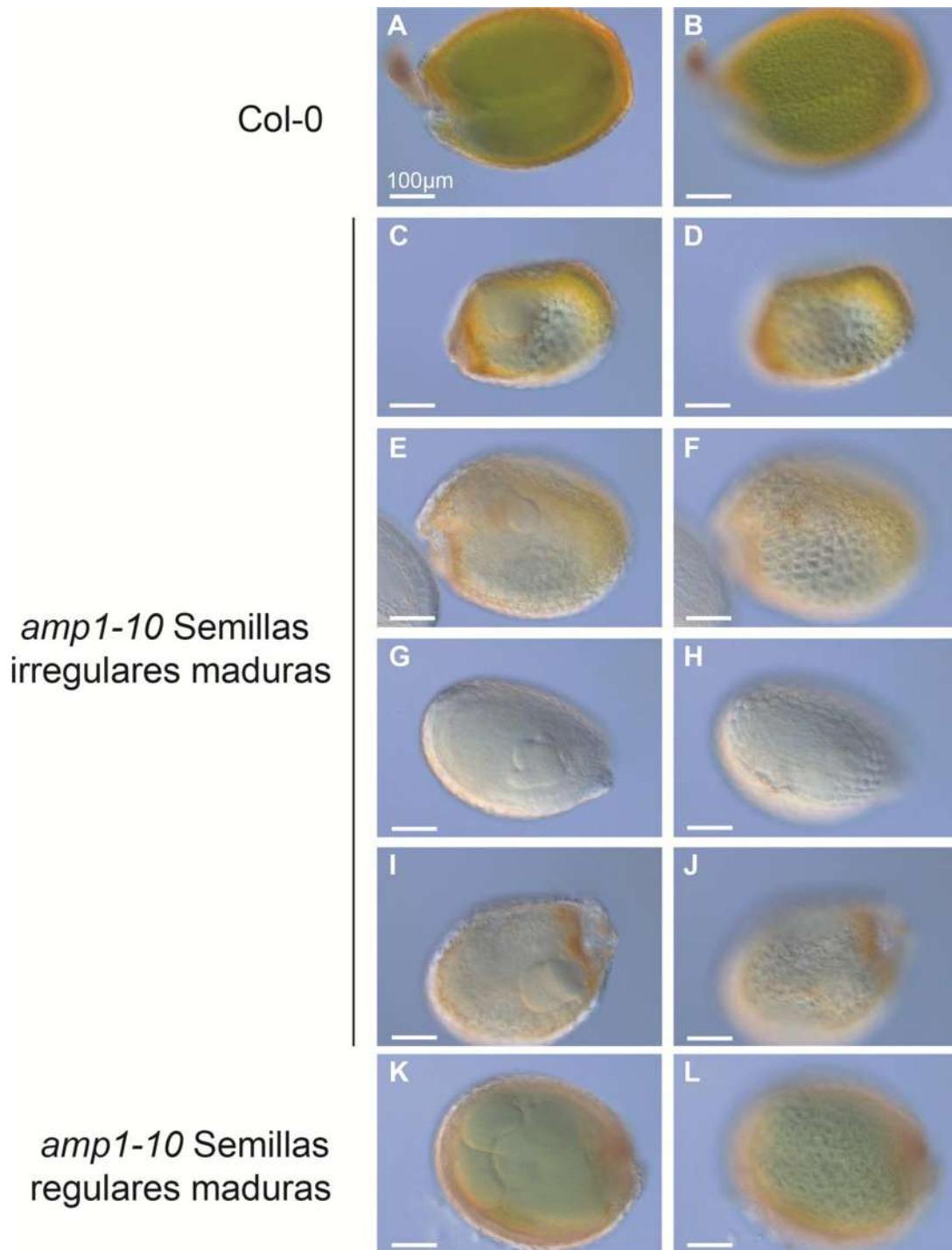


FIGURA 22. Las alteraciones en la testa están relacionadas con cambios en la estructura del embrión en la mutante *amp1*. Semillas maduras silvestres y *amp1* fueron clareadas con hidrato de cloral. **(A-B)** Embrión silvestre y su correspondiente testa. **(C-J)** Embriones “irregulares” y sus testas correspondientes. **(K-L)** Embriones “regulares” y su testa correspondiente. Las semillas “irregulares” están vacías **(C)** o arrestan su desarrollo en fases embrionarias tempranas **(G e I)**. La barra de escala mostrada en **(A)** es la misma para todas las micrografías.

amp1-10

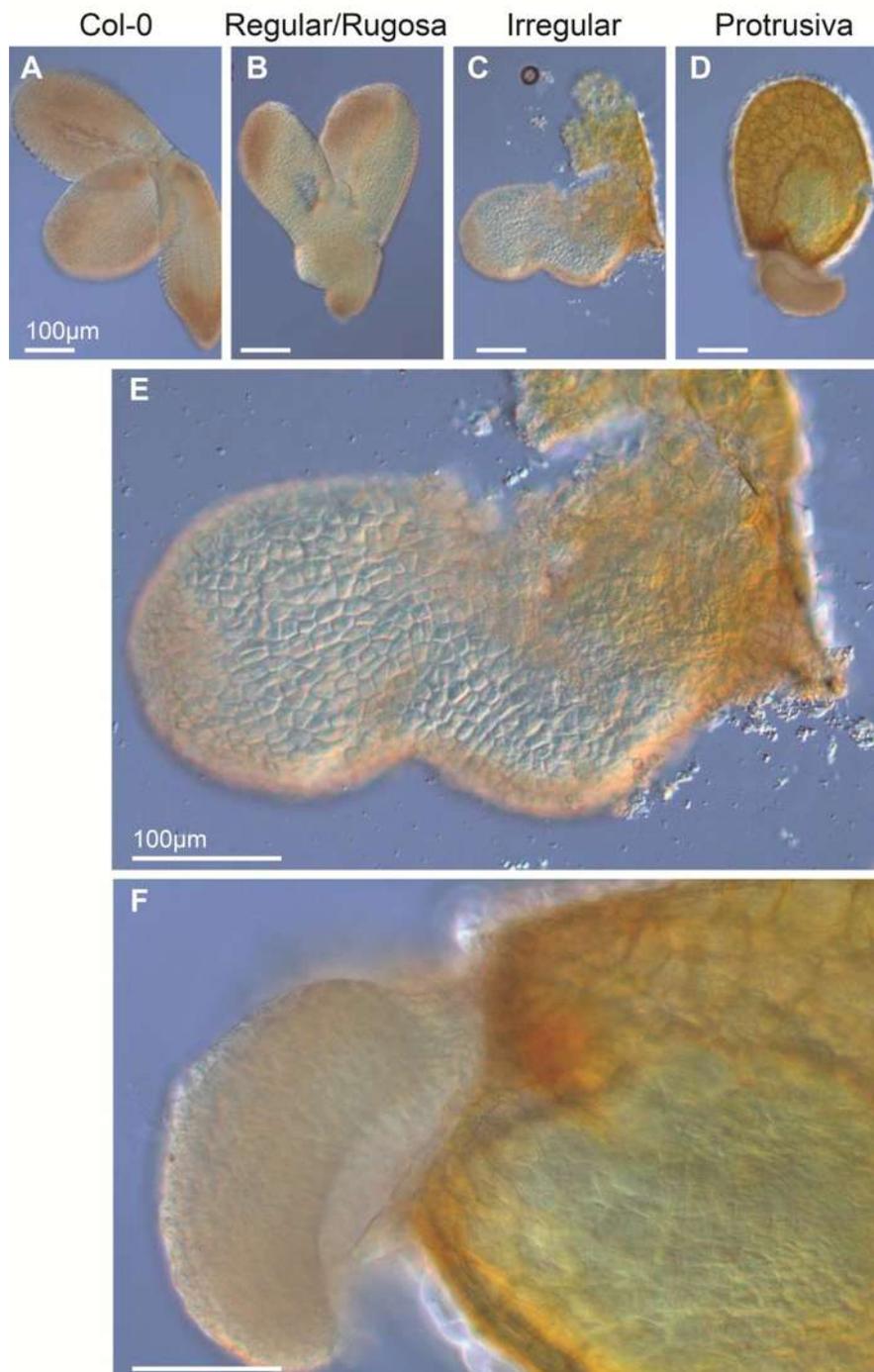


FIGURA 23. La mutación en *AMP1* ocasiona alteraciones en el embrión. Semillas maduras silvestres (Col-0) y *amp1* fueron procesadas para extraer el embrión. **(A)** Embrión silvestre. **(B)** Los embriones de las semillas “regulares” y “rugosas” fueron similares entre si y mostraron alteraciones en el número de cotiledones y tamaño de la radícula. **(C)** El embrión de semillas “irregulares” aparenta ser una masa indiferenciada. **(D)** Los embriones de semillas “protrusivas” que estaban fuertemente adheridos a las cubiertas embrionarias, son masas indiferenciadas que crecen preferencialmente cerca del microfilo. **(E)** Acercamiento de embrión “irregular”. **(F)** Acercamiento de embrión “explosivo”. La barra de escala se muestra en **(C)** y **(E)** y es la misma para las micrografías.

7.4. Las alteraciones en la forma de la semilla en *amp1* correlaciona con la viabilidad

AMP1 regula la dormancia de la semilla, germinación y respuesta a ABA (Griffits *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013b). La testa de la semilla es importante para los procesos de dormancia y germinación, por lo cual las alteraciones observadas en esta estructura de las semillas de *amp1* podrían repercutir en la viabilidad de la semilla alterando el proceso de germinación. Para determinar la viabilidad de las diferentes clases de semillas segregadas por *amp1* comparamos las frecuencias de germinación entre semillas silvestres y *amp1* (Fig. 24). Las semillas silvestres comenzaron a germinar a las 24 h después de ser sembradas y alcanzaron 100% de germinación a las 32 h. A diferencia de éstas, las diferentes clases de semillas de *amp1* comenzaron a germinar antes de las 24h pero ninguno de los fenotipos alcanzó satisfactoriamente el 100% de germinación, las semillas “regular”, “rugosa”, “irregular” y “protrusiva” alcanzaron un porcentaje de germinación de 75%, 40%, 15% y 8%, respectivamente.

El ácido giberélico es conocido por inducir la germinación (Ullah *et al.*, 2002; Holdsworth *et al.*, 2008), por lo tanto se determinó si el GA podría normalizar la germinación en las semillas de *amp1*, encontrándose que el GA induce la germinación únicamente en semillas silvestres y semillas “regulares”, pero no restaura la germinación en las otras clases de semillas de *amp1*. Estos resultados indican que las semillas de *amp1* tienen una menor viabilidad, lo cual está aparentemente relacionado con las alteraciones de la testa y el desarrollo embrionario.

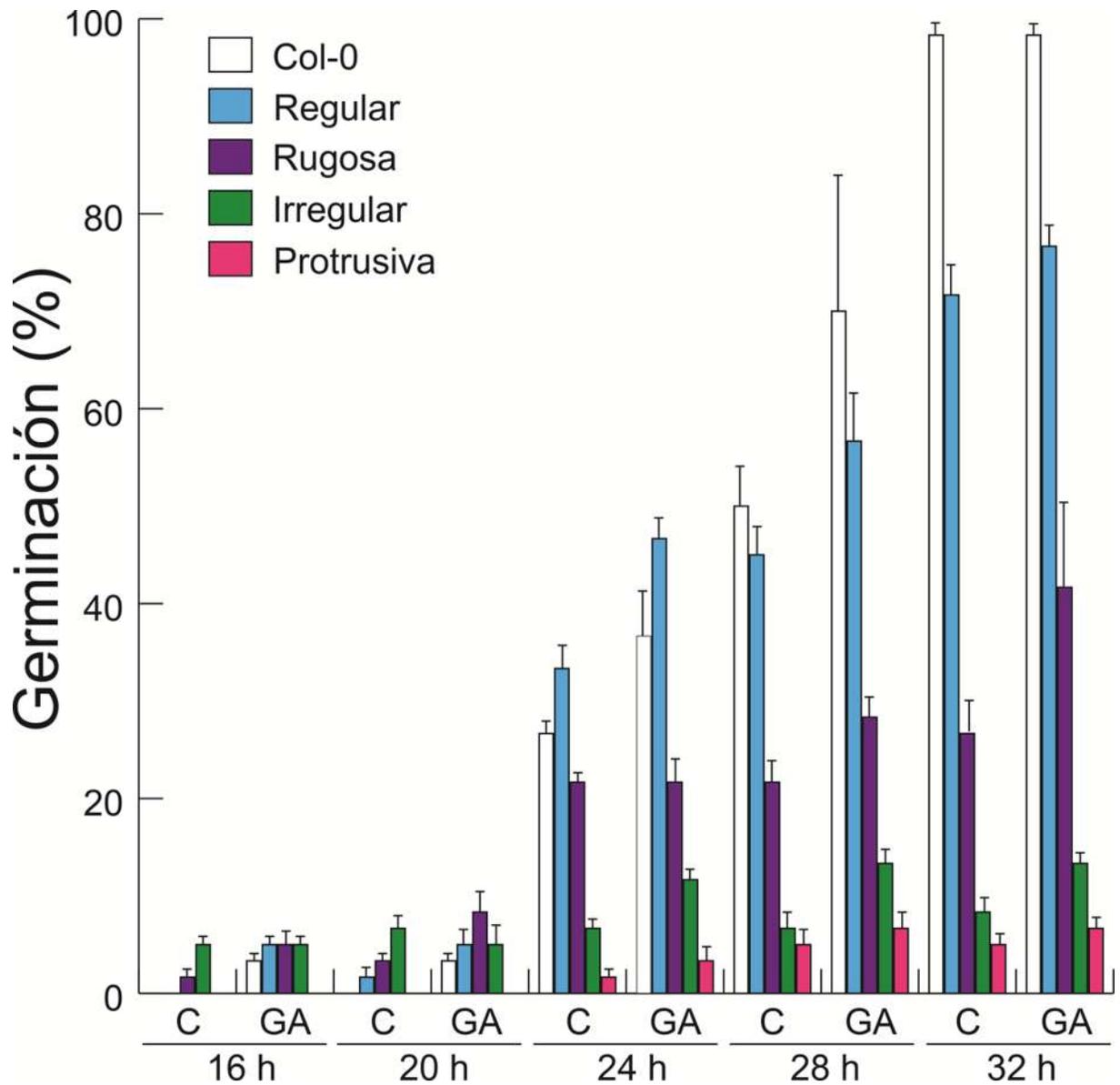


FIGURA 24. Germinación en plantas silvestres y la mutante *amp1*. Semillas silvestres (Col-0) y de los diferentes fenotipos de *amp1* fueron sembradas en medio MS 0.2X con y sin adición de ácido giberélico (GA). La germinación fue monitoreada como emergencia de la radícula cada 4 horas. La germinación de los diferentes fenotipos de semilla de la mutante fueron inferiores a los mostrados por las semillas WT y el GA no restaura la disminución de la germinación en las semillas mutantes.

7.5. *AMP1* está involucrado en el desarrollo post-embrionario de células epidérmicas de parte aérea y raíz

La epidermis vegetal juega un papel importante durante el desarrollo post-embrionario. Los tricomas y los pelos radiculares son células especializadas originadas a partir de la diferenciación posicional de células epidérmicas. Debido a que *amp1* mostró alteraciones en la testa que son de origen epidérmico, nos preguntamos si esta mutación también podría estar alterando el desarrollo de los tricomas y pelos radiculares, para esto comparamos la formación de pelos radiculares en plántulas silvestres y las diferentes clases de semillas de mutantes *amp1* a los 7 días después de la germinación. No se observaron alteraciones en la densidad de pelos radiculares en ninguno de los fenotipos de semilla de la mutante, pero la longitud de estos se afecta y se presentaron alteraciones en su estructura natural como la presencia de bifurcaciones (Fig. 25). En cuanto a los tricomas, estos se compararon en plántulas de 14 días analizando la epidermis de las hojas. Se observó que en plántulas provenientes de semillas “regulares” y “rugosas” la producción de tricomas disminuye en un 50% mientras que en semillas “irregulares” y “protrusivas” esto ocurre hasta un 75%, además de disminuir su bifurcación (Fig. 26). Estos resultados sugieren que *AMP1* tiene un papel importante en la diferenciación epidérmica tanto durante el desarrollo de la testa como en el de tricomas y pelos radiculares.

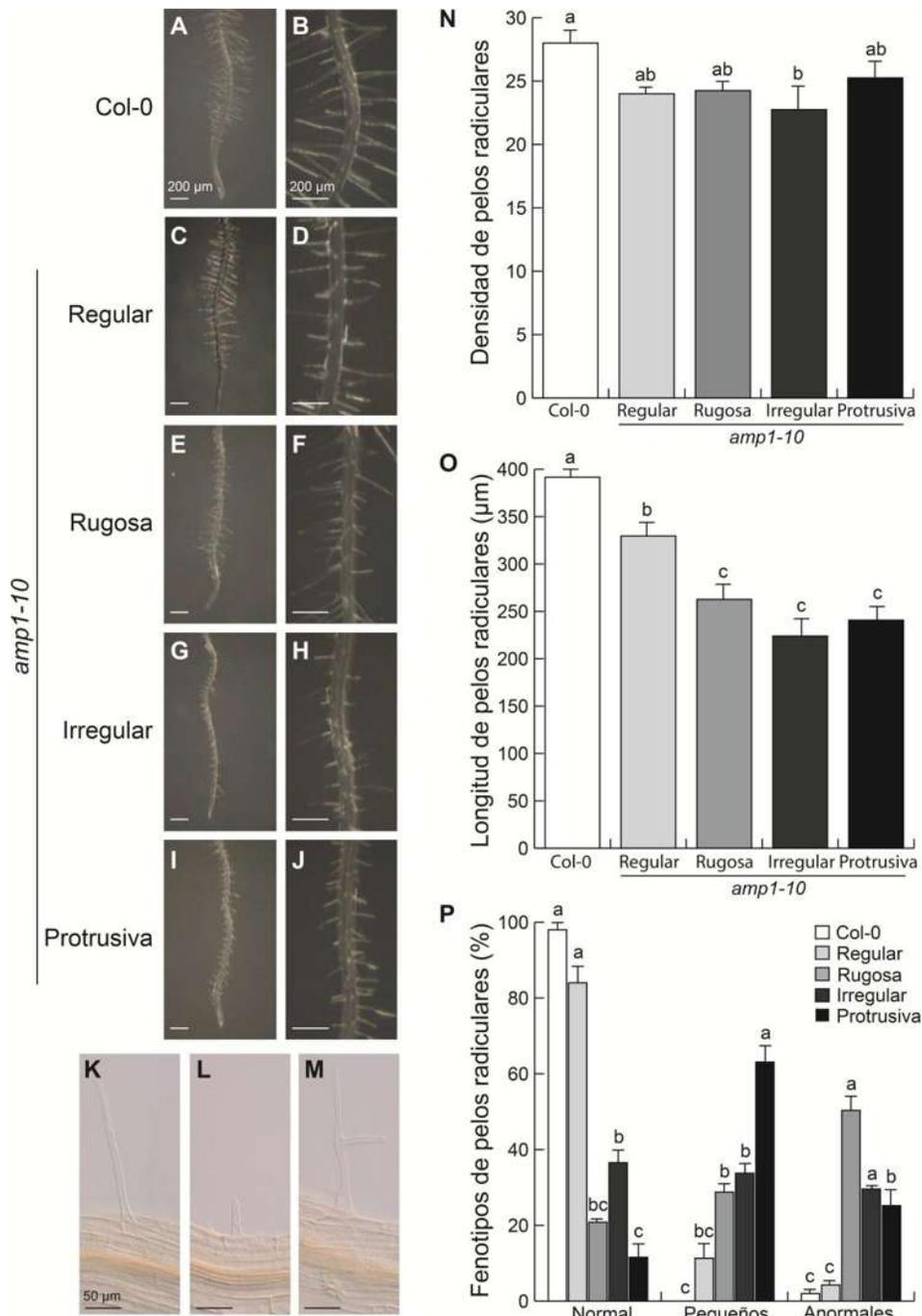


FIGURA 25. El desarrollo de los pelos radiculares está afectado en las mutantes *amp1*. **(A-B)** pelos radiculares de plantas silvestres (Col-0). **(C-J)** pelos radiculares en los diferentes fenotipos de semilla de *amp1*. **(K)** pelo radicular normal, **(L)** pelo radicular pequeño, **(M)** pelo radicular con bifurcaciones. **(N)** Densidad de pelos radiculares, se determinó el número de pelos por 1mm de raíz. **(O)** Longitud de pelos radiculares, se determinó de microfotografías con el programa Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). **(P)** fenotipo de pelos radiculares, se determinó de 100 pelos radiculares con alteraciones en cuanto a tamaño y forma. La barra de escala es indicada en **(A)**, **(B)** y **(K)** para las microfotografías similares. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).

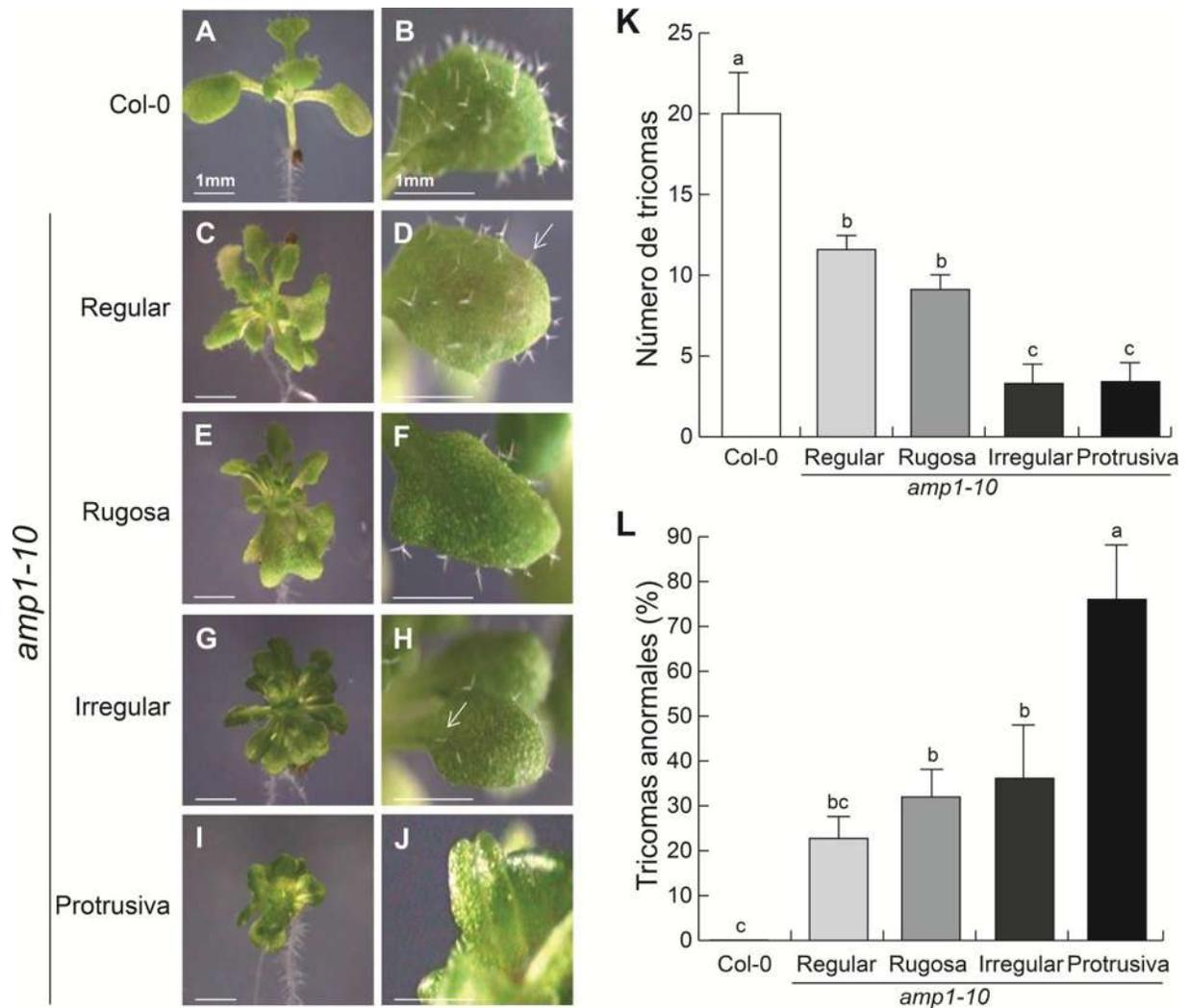


FIGURA 26. El desarrollo de tricomas está afectado en las mutantes *amp1*. Plantas silvestres y de los diferentes fenotipos de semillas de *amp1* fueron crecidas en medio MS para analizar sus hojas en un microscopio estereoscópico. **(A-B)** tricomas silvestres (Col-0). **(C-D)** tricomas de semillas “regulares”. **(E-F)** tricomas de semillas “rugosas”. **(G-H)** tricomas de semillas “irregulares”. **(I-J)** tricomas de semillas “protrusivas”. **(K)** Número de tricomas por hojas. **(L)** Tricomas anormales por hoja. La barra de escala se indica en **(A)** y **(B)** y es la misma para las micrografías semejantes. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 repeticiones analizadas, las letras indican las medias que difieren significativamente ($P < 0.05$).

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los genes que controlan la diferenciación celular son importantes para coordinar las funciones de órganos y tejidos especializados, mutaciones en estos genes pueden causar cambios en la estructura de un organismo. La mutación en *AMP1* produce defectos en las diferentes fases del desarrollo en *Arabidopsis* que incluyen alteraciones embrionarias, en el desarrollo del meristemo apical, floración y fotomorfogenesis, así como una germinación demorada (Chaudhury *et al.*, 1993; Helliwell *et al.*, 2001; Saibo *et al.*, 2007, Vidaurre *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013b). En este trabajo se realizó un análisis detallado de la semilla en la mutante *amp1* y los efectos que alteraciones en el desarrollo embrionario provocan a largo plazo durante el crecimiento y desarrollo de la plántula, estableciendo de esta manera una correlación entre el desarrollo embrionario, estructura de la testa, viabilidad de la semilla y diferenciación epidérmica.

La mutante *amp1* segrega cuatro tipos de semillas: i) “regulares” semillas con fenotipo silvestre, ii) “rugosas” semillas con alteraciones en la estructura de la testa, iii) “irregulares” semillas con alteraciones en la testa y embriones arrestados en fases tempranas de desarrollo y iv) “protrusivas” semillas con alteraciones en la testa y que expulsan al embrión. Las alteraciones mostradas en la estructura de la semillas fueron reproducibles en al menos cuatro generaciones de plantas homocigas de *amp1*, estas alteraciones se hicieron visibles desde etapas tempranas del desarrollo reproductivo con una floración temprana (Chaudhury *et al.*, 1993; Vidaurre *et al.*, 2007; Griffiths *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013b) y disminución en el tamaño de la silicua debido a un alto número de eventos abortivos. De esta manera se concluye que los fenotipos de semilla de *amp1* son genéticamente estables y aparentemente están relacionados con los defectos embrionarios ya reportados para esta mutante (Vidaurre *et al.*, 2007).

El desarrollo de la semilla en *Arabidopsis* está controlado por varios genes incluyendo *FUS3*, *ABI3*, *LEC1*, *LEC 2*, *AP2*, *TTG1* y *GL2*, las mutaciones en estos genes afectan la maduración de la semilla (Koornneef, 1981; Koornneef *et al.*, 1982; Bäumllein *et al.*, 1994; Jofuku *et al.*, 1994; Nambara *et al.*, 1995; Parcy *et al.*, 1997;

Braybrook *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguna de ellas presenta un fenotipo similar al encontrado en *amp1*. Las alteraciones en la testa de *amp1* mostradas por microscopía electrónica son similares a las encontradas en *wrinkled 1* (*wri1*), mutante afectada en el factor de transcripción APETALA 2/ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING (AP2/EREB) involucrado en el metabolismo de compuestos de reserva energética en la semilla (Focks y Benning, 1998; Cernac y Benning, 2004) por lo cual no se descarta una posible relación entre *WRI1* y *AMP1*. De la misma manera, la triple mutante *sweet11; 12; 15* afectada en transportadores de sacarosa retarda el desarrollo del embrión, reduce el peso de la semilla, contenido de almidón y lípidos resultando en fenotipos parecidos a las semillas “rugosas” e “irregulares”. De hecho, *sweet11; 12; 15* acumula almidón en la testa pero no en el embrión. Una posibilidad podría ser que *AMP1* regule los transportadores de sacarosa de la familia SWEET y de esta manera afecta el programa de desarrollo embrionario. Otra mutante más estrechamente relacionada con los fenotipos de semilla de *amp1* es MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (*MPK6*) que afecta la morfología y desarrollo embrionario dirigiendo a la formación de tres distintos fenotipos de semilla, que incluyen semillas más grandes, semillas con arrugas en la testa y semillas que expulsan el embrión de la testa, estos fenotipos correlacionan con defectos en el desarrollo de la plántula (López-Bucio *et al.*, 2014), lo cual sugiere que *AMP1* podría estar involucrado en la vía de las MAPK's en la regulación del desarrollo de la semilla.

El análisis de embriones de las semillas “regulares” de *amp1* muestra que los embriones de la mutante tienen un desarrollo exagerado del meristemo apical (SAM) que hace que se pierda la forma característica de los embriones de *Arabidopsis* adoptando de esta manera una forma de “chupón”. Uno de los reguladores claves en el desarrollo del SAM son las Ck's que son suficientes para inducir formación de *novo* de SAM (Skoog y Miller, 1957; Estruch *et al.*, 1991). La pérdida de función de *AMP1* ocasiona una sobre-producción de Ck's (Chaudhury *et al.*, 1993; Nogué *et al.*, 2000a) aumentando de esta manera la actividad y tamaño del SAM y contribuyendo al fenotipo embrionario presentado en *amp1*.

La proteína homóloga más cercana a AMP1, es una glutamato-carboxipeptidasa II (GCPII) humana, la cual está sobre-expresada en muchos tumores, pero su papel en el desarrollo de cáncer o en el ciclo celular es desconocido (Hlouchova *et al.*, 2012). Así que es posible que las divisiones anormales observadas durante el desarrollo embriogénico en *amp1* se alcanzan a través de cambios en el control de proteínas del ciclo celular ya que se ha reportado que en plantas de *amp1* se presenta una sobre-expresión de ciclina D3 (CDK3) (Chaudhury *et al.*, 1993; Vidaurre *et al.*, 2007); pero esta hipótesis necesita ser verificada experimentalmente. La ausencia de embrión en las semillas “irregulares” de *amp1* así como los eventos abortivos observados podrían deberse a una falla en el proceso de fertilización. La mutación en los genes *FISPRC2* ocasiona eventos abortivos, así como alteraciones en el endospermo y la testa, aún en ausencia de fertilización (Grossniklaus *et al.*, 1998; Kiyosue *et al.*, 1999; Makarevich *et al.*, 2008) lo cual podría estar sucediendo en las semillas “irregulares”.

La testa madura de *Arabidopsis* contiene células epidérmicas que producen mucílago con propiedades que son importantes para la dispersión de la semilla, retención de agua y protección del embrión (Arsovski *et al.*, 2010; Haughn y Western, 2012). Durante la germinación, el mucílago se hidrata formando una cápsula gelatinosa alrededor de la semilla que consta de dos capas: una interna adherida fuertemente a la testa conformada por RGI, hemicelulosa, celulosa y galactanos; y otra externa soluble al agua constituida por RGI, hemicelulosa, galactanos y arabinanos (Western *et al.*, 2000; Macquet *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011; Haughn y Western, 2012). Usando microscopía electrónica y tinción de rojo de rutenio, se determinó que las testas de *amp1* tienen defectos en estructura y en la formación de la cápsula de mucílago ya que las semillas de clase “irregular” y “protrusiva” contienen áreas donde la capsula de mucílago se pierde. Interesantemente, la capa externa de la cápsula de mucílago incrementa su tamaño en las semillas “regulares” sugiriendo que la composición química del mucílago podría estar alterada favoreciendo la presencia de componentes de la capa externa. Mediante estas observaciones se puede concluir que *AMP1* es importante para la correcta diferenciación de la testa. Mutaciones sobre los genes *MUCILAGE MOTIFIED (MUM)*

causan defectos en la producción de mucílago y en su composición química (Western *et al.*, 2001). Particularmente, *MUM4* codifica para una enzima implicada en la biosíntesis de ramnosa y es regulada por *GL2* y *TTG1* (Western *et al.*, 2004), genes clave en la regulación de procesos de diferenciación epidérmica en testa, raíz y follaje. *AMP1* podría estar regulando la expresión o actividad de reguladores maestros de la diferenciación epidérmica como *GL2* y *TTG* o que actúan cascada abajo de *MUM4*.

En *Arabidopsis* existen genes que regulan la producción de mucílago, desarrollo de pelos radicales y tricomas, que incluyen a *TTG1* y *GL2* (Walker *et al.*, 1999; Rerie *et al.*, 1994). Las mutantes *ttg1* y *gl2* carecen de la bolsa de mucílago en la testa y el desarrollo de pelos y tricomas se ve afectado. Por lo cual se decidió analizar si la mutación en *AMP1* además de ocasionar alteraciones en la producción de mucílago en la testa, afectaría el desarrollo de pelos radicales y tricomas. *amp1* presenta un número de tricomas reducido en las hojas, además de que éstos fueron más cortos y no están trifurcados como en las plántulas silvestres. De manera similar, cuando se comparó el desarrollo de pelos radicales, las plántulas *amp1* presentaron pelos más cortos y con bifurcaciones anormales, pero no se vio afectada la densidad de pelos radicales. Estas observaciones evidencian una función pleiotrópica de *AMP1* sobre los programas de diferenciación epidérmica. Lin y Schiefelbein (2001) encontraron que la expresión de *GL2* inicia en el protodermo durante el desarrollo del embrión y concluyeron que el patrón celular de los tricomas y pelos radicales se establece desde la embriogénesis. De hecho *GL2* y *TTG1* son requeridos para la biosíntesis de mucílago y formación de la columela. Con esta evidencia, proponemos que *AMP1* podría regular la expresión o actividad de *GL2* y/o *TTG* impactando en los procesos epidérmicos durante la embriogénesis y el desarrollo post-embriionario.

La germinación comienza con la captación de agua y procede la emergencia de la radícula a través de la testa. El embrión, la testa y el endospermo coordinan la regulación de la dormancia y germinación de manera independiente o sinérgica dependiendo la especie de la planta (Bewley, 1997), por lo cual alteraciones en la

estructura de la semilla repercuten sobre la germinación. En un reporte previo, *amp1* mostró una demora en la germinación que mejoraba en un 60% en el tratamiento con GA (Griffits *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestros datos indican que el GA no restaura la germinación de la semilla en las clases “rugosa”, “irregular” y “protrusiva”, sugiriendo que los defectos en la testa en estas mutantes ocurren de una manera independiente a la vía de señalización de GA y que la germinación no procede debido a posibles fallas en el desarrollo del embrión.

El fenotipo de semillas encontrado en *amp1* fue comparado con 27 líneas mutantes alteradas en las principales vías de señalización hormonales para buscar una posible relación del efecto observado con algún regulador del crecimiento. Sin embargo ninguna de las 27 líneas mostró similitudes con el fenotipo de *amp1*, lo que sugiere que *AMP1* controla el desarrollo de la semilla de una manera independiente de las vías hormonales clásicas y que además regula otros aspectos relacionados con la morfología de la semilla como son la dormancia y la germinación. Las observaciones del fenotipo de semillas de *amp1* sugieren un posible vínculo con la vía de señalización de las MAP cinasas (MAPK), específicamente con la vía que involucra la participación de las cinasas MPKKK4 (YDA), MKK4/MKK5, MPK3/MPK6 que ha mostrado ser activada por moléculas de origen peptídico (Xu y Zhang, 2015). Mutaciones en la cinasa YDA y MPK6 causan defectos en el desarrollo del embrión resultando en la propulsión del embrión fuera de la testa, efecto similar al encontrado en la mutante *amp1* (Lukowitz *et al.*, 2004). Además, YDA y MPK6 son componentes de la cascada MAPK involucrada en la regulación del desarrollo del embrión (Bush y Krysan, 2007), estomas (Wang *et al.*, 2007) y de la raíz (López-Bucio *et al.*, 2014) indicando su importante papel en los programas de desarrollo epidérmicos. Finalmente, se sugiere que *AMP1* regula el desarrollo embrionario y los procesos de diferenciación epidérmicos en raíz y hoja al estar involucrada en el procesamiento de reguladores del crecimiento de origen peptídico que probablemente activan la cascada de señalización de YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 para regular la expresión y/o actividad de GL2 y TTG (Fig. 27).

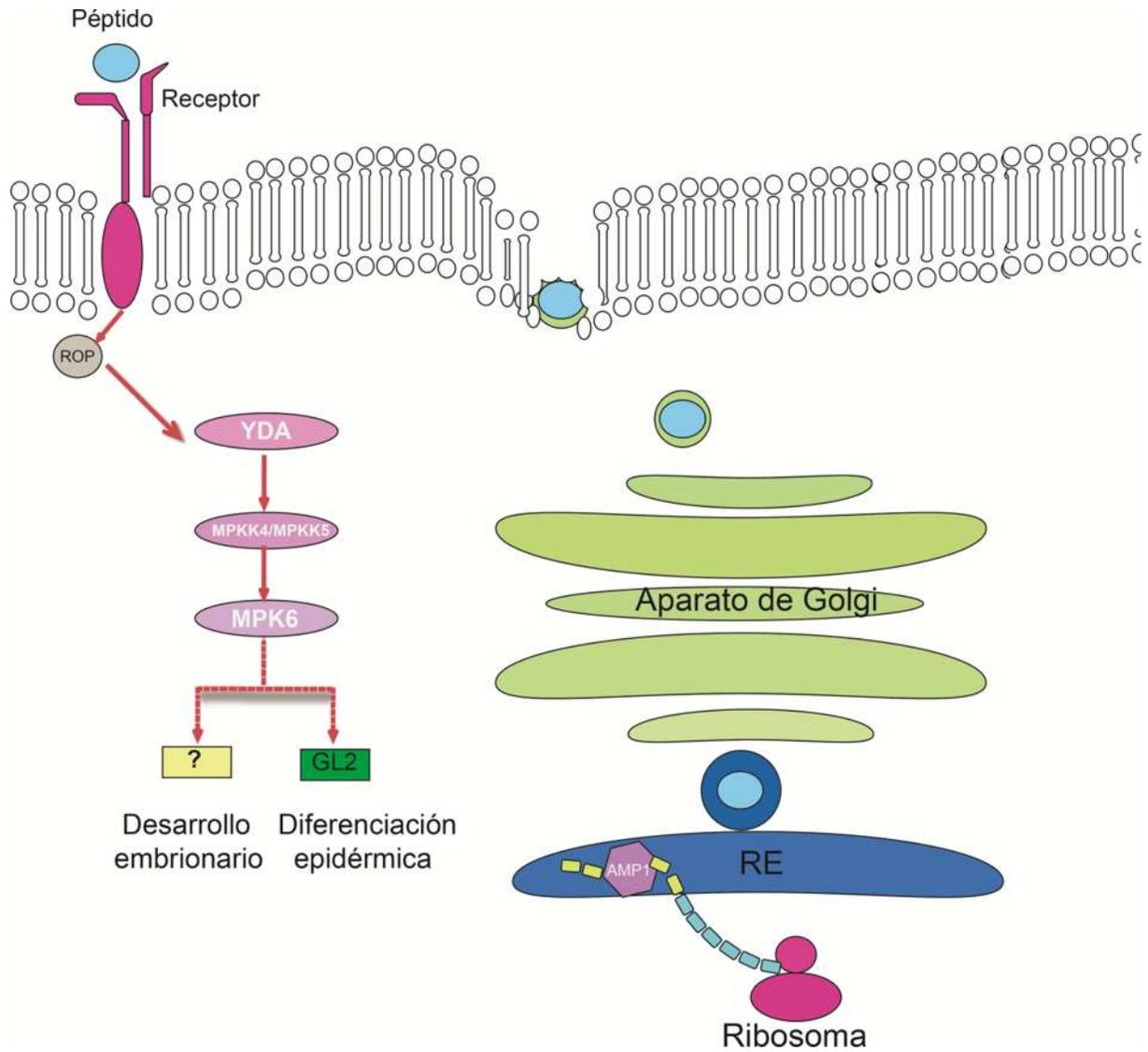


FIGURA 27. Modelo propuesto para la participación de *AMP1* en la regulación del desarrollo de la semilla y diferenciación epidérmica. *AMP1* al ser una glutamato-carboxipeptidasa presente en el retículo endoplásmico participa en el procesamiento de péptidos de secreción involucrados en la regulación de procesos del desarrollo que son secretados para activar la cascada de señalización de YDA-MKK4/MKK5-MPK6 para regular el desarrollo de la semilla, mediante componentes aun desconocidos y también la actividad GL2 influenciando de esta manera la diferenciación de la epidermis en raíz y follaje.

9. LITERATURA CITADA

- Ali-Rachedi S., Bouinot D., Wagner M.H., Bonnet M., Sotta B., Grappin P. y Jullien M. 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219: 479-488.
- Arc E., Sechet J., Corbineau F., Rajjou L. y Marion-Poll A. 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* 4: 1-19.
- Arsovski A.A., Haughn G.W. y Western T.L. 2010. Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research. *Plant Signal & Behavior* 5: 1-6.
- Arsovski A.A., Popma T.M., Haughn G., W. Carpita N.C., McCann M. C. y Western T.L. 2009. AtBXL1 encodes a bifunctional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase required for pectic arabinan modification in *Arabidopsis* mucilage secretory cells. *Plant Physiology* 150: 1219-1234.
- Barton M.K. y Poethig R.S. 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in wildtype and in the shoot meristemless mutant. *Development* 119: 823-831.
- Baum S.F. y Rost T.L. 1996. Root apical organization in *Arabidopsis thaliana*. Root cap and protoderm. *Protoplasma* 192: 178-188.
- Bäumlein H., Miséra S., Luerssen H., Kölle K., Horstmann C., Wobus U. y Müller A.J. 1994. The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis. *Plant Journal* 6: 379-387.
- Beaudoin N., Serizet C., Gosti F. y Giraudat J. 2000. Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Becraft P.W. y Asuncion-Crabb Y. 2000. Positional cues specify and maintain aleurone cell fate in maize endosperm development. *Development* 127: 4039-4048.
- Becraft P.W. y Yi G. 2011. Regulation of aleurone development in cereal grains. *Journal of Experimental Botany* 62: 1669-1675.
- Belmonte M.F., Kirkbride R.C., Stone S.L., Pelletier J.M., Bui A.Q., Yeung E.C., Hashimoto M., Fei J., Harada C.M., Munoz M.D., et. al. 2013 Comprehensive developmental profiles of gene activity in regions and subregions of the

- Arabidopsis* seed. Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America 110: E435-E444.
- Benjamins R., y Scheres B. 2008. Auxin: the looping star in plant development. Annual Reviews Plant Biology 59: 443-465.
- Bentsink L. y Koornneef M. 2008. Seed dormancy and germination. The *Arabidopsis* Book/American Society of Plant Biologists 6.
- Berger F., Grini P.E. y Schnittger A. 2006. Endosperm: an integrator of seed growth and development. Current Opinion in Plant Biology 9: 664–670.
- Berleth T. y Jurgens G. 1993. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. Development 118: 575–587.
- Bernhardt C., Lee M.M., Gonzalez A., Zhang F., Lloyd A. y Schiefelbein J. 2003. The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. Development 130: 64319.
- Bethke P.C., Libourel I.G., Aoyama N., Chung Y.Y., Still D.W. y 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 Physiology 143: 1173-11.
- Bewley J.D. y Black M. 1994. Seeds; Physiology of development and germination. New York: Plenum Press.
- Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell 9: 1055-1066.
- Bewley J.D., Bradford K.J., Hilhorst H.W. y Nonogaki H. 2013. Seeds. Springer New York. pp. 392
- Bleecker A.B., Estelle M.A., Somerville C y Kende H. 1988. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. Science 241: 1086-1089.
- Boisnard-Lorig C., Colon-Carmona A., Bauch M., Hodge S., Doerner P., Bancharel E., Dumas C., Haseloff J. y Berger F. 2001. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE: YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. Plant Cell 13: 495–509.
- Bowman J.L. y Floyd S.K. 2008. Patterning and polarity in seed plant shoots. Annual Reviews Plant Biology 59: 67-88.

- Boyes D.C., Zayed A.M., Ascenzi R., McCaskill A.J., Hoffman N.E., Davis K.R. y Görlach J. 2001. Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis* a model for high through put functional genomics in plants. *Plant Cell Online* 13: 1499-1510.
- Braybrook S.A., Stone S.L., Park S., Bui A.Q., Le B.H., Fischer R.L., Goldberg R.B. y Harada J.J. 2006. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 3468-3473
- Brett C. y Waldron K. 1990. Cell wall structure and the skeletal functions of the wall. En: *Physiology and Biochemistry of plant cell walls*. Springer Netherlands. pp. 4-57.
- Brown R.C., Lemmon B.E., Nguyen H., y Olsen O.A. 1999. Development of endosperm in *Arabidopsis thaliana*. *Sexual Plant Reproduction* 12: 32-34.
- Bunning E. 1951. Über die Differenzierungsvorgänge in der Cruciferenwurzel. *Planta* 39: 126-153.
- Bush S.M. y Krysan P.J. 2007. Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* 58: 2181-2191.
- Capron A., Chatfield S., Provart N. y Berleth T. 2009. Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists* 7.
- Carrera E., Holman T., Medhurst A., Peer, W., Schmutz H., Footitt S., Theodoulou F.L. y Holdsworth M.J. 2007. Gene expression profiling reveals defined functions of the ABC transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiology* 143: 1669–1679.
- Cernac A. y Benning C. 2004. WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 40: 575–585.
- Chakrabortee S., Tripathi R., Watson M., Schierle G.S. y Kurniawan D.P. 2012. Intrinsically disordered proteins as molecular shields. *Molecular Biosystems* 8: 210-219.
- Chaudhury A.M., Letham S., Craig S. y Dennis E.S. 1993. *amp1* a mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth,

- constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant Journal* 4: 907-916.
- Chaudhury A.M., Ming L., Miller C., Craig S., Dennis E. S. y Peacock W. J. 1997. Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 4223-4228.
- Chen M., Wang Z., Zhu Y., Li Z., Hussain N., Xuan L. y Jiang L. 2012. The effect of transparent TESTA2 on seed fatty acid biosynthesis and tolerance to environmental stresses during young seedling establishment in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 160: 1023-1036.
- Chiu R.S., Nahal H., Provart N.J. y Gazzarrini S. 2012. The role of the *Arabidopsis* FUSCA3 transcription factor during inhibition of seed germination at high temperature. *BMC Plant Biology* 12:15.
- Chory J., Nagpal P. y Peto C.A. 1991. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3: 445-459.
- Cooley M.B., Yang H., Dahal P., Mella R.A., Downie A.B., Haigh A.M. y Bradford K.J. 1999. Vacuolar H⁺-ATPase is expressed in response to gibberellins during tomato seed germination. *Plant Physiology* 121: 1339–1347.
- Cormack R.G.H. 1949. The development of root hairs in angiosperms. *Botanical Review* 15: 583-612.
- Cosgrove D.J. 1994. Photomodulation of growth. En RE Kendrick, GHM Kronenberg, eds, *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands pp 631-658
- Day R.C., Herridge R.P., Ambrose B.A. y Macknight R.C. 2008. Transcriptome analysis of proliferating *Arabidopsis* endosperm reveals bio-logical implications for the control of syncytial division, cytokinin signaling, and gene expression regulation. *Plant Physiology* 148: 1964–1984.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M. y Koornneef M. 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 403-414.
- Debeaujon I., Nesi N., Perez P., Devic M., Grandjean O., Caboche M. y Lepiniec L. 2003. Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* 15: 2514-2531.

- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. y Scheres B. 1993. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Dorcey E., Urbez C., Blazquez M.A., Carbonell J. y Perez-Amador M.A. 2009. Fertilization-dependent auxin response in ovules triggers fruit development through the modulation of gibberellin metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 58: 318–332.
- Doughty J., Aljabri M. y Scott R.J. 2014. Flavonoids and the regulation of seed size in *Arabidopsis*. *Biochemical Society Transactions* 42: 364–369.
- Edlund T. y Jessell T.M. 1999. Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96: 211–224.
- Estruch J.J, Prinsen E., Van Onckelen H., Schell J. y Spena A. 1991. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science* 254: 1364-1367.
- Evans A.S. y Cabin R.J. 1995. Can dormancy affect the evolution of post-germination traits? The case of *Lesquerella fendleri*. *Ecology* 76: 344–356.
- Ezcurra I., Ellerstrom M., Wycliffe P., Stalberg K. y Rask L. 1999. Interaction between composite elements in the napA promoter: both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Molecular Biology* 40: 699-709.
- Faure J.E., Rotman N., Fortuné P. y Dumas C. 2002. Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course. *Plant Journal* 30: 481–488.
- Feurtado J.A., Huang D., Wicki-Stordeur L., Hemstock L.E., Potentier M.S., Tsang E.W. y Cutler A.J. 2011. The *Arabidopsis* C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* 23: 1772-1794.
- Finch-Savage W.E. y Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–23
- Finkelstein R. 1994. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5: 765-771.
- Finkelstein R.R., Wang M.L., Lynch T.J., Rao S. y Goodman H.M. 1998. The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.

- Finkelstein R., Reeves W., Ariizumi T. y Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Reviews Plant Biology* 59: 387-415.
- Focks N. y Benning C. 1998. *wrinkled1*: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiology* 118: 91–101.
- Forestan C., Meda S. y Varotto S. 2010. ZmPIN1-mediated auxin transport is related to cellular differentiation during maize embryogenesis and endosperm development. *Plant Physiology* 152: 1373–1390.
- Fujioka S. y Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Reviews Plant Biology* 54: 137–164.
- Fukaki H., Tameda S., Masuda H. y Tasaka M. 2002. Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29: 153-168.
- Galland M., Huguet R., Arc E., Cueff G., Job D. y Rajjou L. 2014. Dynamic proteomics emphasizes the importance of selective mRNA translation and protein turnover during *Arabidopsis* seed germination. *Molecular & Cellular Proteomics* 13: 252-268.
- Galway M.E., Masucci J.D., Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W. y Schiefelbein J.W. 1994. The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology* 166: 740-754.
- Garcia D., Saingery V., Chambrier P., Mayer U., Jürgens G. y Berger F. 2003. *Arabidopsis* haiku mutants reveal new controls of seed size by endosperm. *Plant physiology* 131: 1661-1670.
- Garcia D., Fitz Gerald J.N. y Berger F. 2005. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 52–60.
- Garcarrubio A., Legaria J.P. y Covarrubias A.A. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203: 182–187.
- Gersani M., Z. Abramsky y O. Falik. 1998. Density-dependent habitat selection in plants. *Evolutionary Ecology* 12: 223-234.
- Goldberg R.B., Paiva G. y Yadegari R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614.

- Grierson C., Nielsen E., Ketelaarc, T. y Schiefelbein J. 2014. Root hairs. The *Arabidopsis* book/American Society of Plant Biologists 12.
- Griffiths J., Murase K., Rieu I., Zentella R., Zhang Z. L., Powers S. J., Gong F., Phillips A.L., Hedden P., Sun T. y Thomas S.G. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 3399-3414.
- Griffiths J., Barrero J.M., Taylor J., Helliwell C.A. y Gubler F. 2011. ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 is involved in development of seed dormancy in *Arabidopsis*. *PLoS One* 6: e20408-e20408.
- Grossniklaus U., Vielle-Calzada J.P., Hoepfner M.A. y Gagliano W.B. 1998. Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280:446–450
- Guo F.Q., Okamoto M. y Crawford N.M. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100-103.
- Gutierrez L., Van Wuytswinkel O., Castelain M. y Bellini C. 2007. Combined networks regulating seed maturation. *Trends in Plant Science* 12: 294-300.
- Guzman P. y Ecker J.R. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523.
- Hanke D.E. y Northcote D.H. 1975. Molecular visualization of pectin and DNA by ruthenium red. *Biopolymers* 14: 1-17.
- Hardtke C.S. y Berleth T. 1998. The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO Journal* 17: 1405–1411.
- Hashimoto Y., Kondo T. y Kageyama Y. 2008. Lilliputians get into the limelight: novel class of small peptide genes in morphogenesis. *Developmental Growth and Differentiation* 50: S269–S276.
- Haughn G.W. y Western T.L. 2012. *Arabidopsis* seed coat mucilage is a specialized cell wall that can be used as a model for genetic analysis of plant cell wall structure and function. *Frontiers in Plant Science*: 3.
- Helliwell C.A., Chin-Atkins A.N., Wilson I.W., Chapple R., Dennis E.S. y Chaudhury A. 2001. The *Arabidopsis AMP1* gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* 13: 2115-2125.

- Hermann K., Meinhard J., Dobrev P., Linkies A., Pesek B., Hes B., Machackova I., Fischer U. y Leubner-Metzger G. 2007. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid and abscisic acid during the germination of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) – A comparative study of fruits and seeds. *Journal of Experimental Botany* 58: 3047–3060.
- Higashiyama T., Yabe S., Sasaki N., Nishimura Y., Miyagishima S., Kuroiwa H. y Kuroiwa T. 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* 293: 1480–1483
- Hill L.M., Morley-Smith E.R. y Rawsthorne S. 2003. Metabolism of sugars in the endosperm of developing seeds of oilseed rape. *Plant Physiology* 131: 228-236.
- Hlouchova K., Navratil V., Tykvart J., Sacha P. y Konvalinka J. 2012. GCPII variants, paralogs and orthologs. *Current Medicinal Chemistry* 19: 1316-1322.
- Hofer R. M. 1991. Root hairs. En: *Plant Roots The Hidden Half*, Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, eds. pp 129-148.
- Hoffmann M.H. 2002. Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography* 29: 125-134.
- Holdsworth M.J., Bentsink L. y Soppe W.J. 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33-54.
- Huang H.C., Erickson R.S., y Hsieh T.F. 2007. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. *Crop Protection* 26: 1055-1061.
- Huang J., Bowles D., Esfandiari E., Dean G., Carpita N.C., y Haughn G.W. 2011. The *Arabidopsis* transcription factor LUH/MUM1 is required for extrusion of seed coat mucilage. *Plant Physiology* 156: 491–502.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. y Kakimoto T. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Irish V.F. 2010. The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant Journal* 61: 1014-1028.
- Jiang W.B., Huang H.Y., Hu Y.W., Zhu S.W., Wang Z.Y. y Lin W.H. 2013. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 162: 1965-1977.

- Jofuku D., den Boer B.G.W. Van Montagu M. y Okamoto J.K. 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA 2*. *Plant Cell* 6: 1211-1225.
- Kamisugi Y. y Cuming A.C. 2005. The evolution of the abscisic acid response in land plants: comparative analysis of group 1 LEA gene expression in moss and cereals. *Plant Molecular Biology* 59: 723-737.
- Kang Y.H., Song S.K., Schiefelbein J. y Lee M.M. 2013. Nuclear trapping controls the position-dependent localization of CAPRICE in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163: 193-204.
- Katsir L., Davies K. A., Bergmann D. C. y Laux T. 2011. Peptide signaling in plant development. *Current Biology* 21: 356–364.
- Kegge W. y Pierik R. 2010. Biogenic volatile organic compounds and plant competition. *Trends in Plant Science* 15: 126-132.
- Kelley D.R., Arreola A., Gallagher T.L. y Gasser C.S. 2012. ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in *Arabidopsis*. *Development* 139: 1105–1109.
- Kieber J.J. y Ecker J.R. 1993. Ethylene gas: it's not just for ripening any more!. *Trends in Genetics* 9: 356-362.
- Kieber J.J., Rotheberg M., Roman G., Feldmann K.A. y Ecker J.R. 1993. CTR a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 1-20.
- Kim I. y Zambryski P. 2005. Cell-to-cell communication via plasmodesmata during *Arabidopsis* embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 593- 599.
- Kiyosue T., Ohad N., Yadegari R., Hannon M., Dinneny J., Wells D., Katz A., Margossian L., Harada J. J., Goldberg R. B. y Fischer R.L. 1999. Control of fertilization in dependent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 4186–4191
- Klein T. y Bischoff R. 2011. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 41: 271–290.
- Knetsch M. L. W., Wang M., Snaar-Jagalska B. E. y Heimovaara-Dijkstra S. 1996. Abscisic acid induces mitogen activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8: 1061–1067.

- Koornneef M. y Vanderveen J.H. 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theoretical and Applied Genetics* 58: 257–263.
- Koornneef M. 1981. The complex syndrome of the *ttg* mutants. *Arabidopsis Information Service* 18: 45-51
- Koornneef M., Dellaert L.W.M. y Vanderveen J.H. 1982. EMS-induced and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis-thaliana* (L) heyneh. *Mutation Research* 93: 109-123.
- Koornneef M., Reuling G. y Karssen C.M. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377–383.
- Koornneef M., Bentsink L. y Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 33-36.
- Kucera B., Cohn M.A. y Leubner-Metzger G. 2006. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Scienc Research* 15: 281-307.
- Lalonde L. y Bewley J.D. 1986. Patterns of protein synthesis during the germination of pea axes, and the effects of an interrupting desiccation period. *Planta* 167: 504–510.
- Laux T. y Jurgens G. 1997. Embryogenesis: a new start in life. *Plant Cell* 9: 989.
- Lee K.P., Piskurewicz U., Tureckova V., Strnad M. y Lopez-Molina L. 2010. A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in *Arabidopsis* dormant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 19108–19113.
- Lee S., Cheng H., King K.E., Wang W., He Y., Hussain A. y Peng J. 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes and Development* 16: 646-658.
- León-Kloosterziel K.M., Keijzer C.J. y Koornneef M. 1994. A seed shape mutant of *Arabidopsis* that is affected in integument development. *Plant Cell* 6: 385–392
- Leprince O., Deltour R., Thorpe P.C., Atherton N. M. y Hendry G.A.F. 1990. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist* 116: 573–580.

- Leung J., Merlot S. y Giraudat J. 1997. The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771.
- Li H., Johnson P., Stepanova A., Alonso J.M. y Ecker J.R. 2004. Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Developmental cell* 7: 193-204.
- Lin Y. y Schiefelbein J. 2001. Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of *Arabidopsis*. *Development* 128: 3697-3705.
- Liu C.M., Xu Z.H. y Chua N.H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621-630.
- Liu P.P., Koizuka N., Homrichhausen T.M., Hewitt J.R., Martin R.C. y Nonogaki H. 2005. Large-scale screening of *Arabidopsis* enhancer-traplines for seed germination-associated genes. *Plant Journal* 41: 936–944.
- Liu P.P., Montgomery T.A., Fahlgren N., Kasschau K.D., Nonogaki H. y Carrington J.C. 2007. Repression of AUXINRESPONSE FACTOR 10 by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant Journal* 52: 133–146.
- Liu X., Zhang H., Zhao Y., Feng Z., Li Q., Yang H.Q., Luan S., Li J. y He ZH. 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 15485–15490.
- Lopes M.A. y Larkins B.A. 1993. Endosperm origin, development, and function. *Plant Cell* 5: 1383–1399.
- López-Bucio J., de Luna-Valdez L.A., Ramos-Vega M., León P. y Guevara-García A.A. 2014. *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* 65: 169-183.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D. y Somerville C. 2004. A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116: 109–119.
- Luo M., Dennis E.S., Berger F., Peacock W.J. y Chaudhury A. 2005. MINISEED3 (MINI3), a WRKY family gene, and HAIKU2 (IKU2), a leucine-rich repeat (LRR)

- KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 17531–17536.
- Macquet A., Ralet M.C., Kronenberger J., Marion-Poll A. y North H. M. 2007. In situ chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage. Plant Cell Physiology 48: 984–999.
- Makarevich G., Villar C.B.R., Erilova A. y Köhler C. 2008. Mechanism of PHERES1 imprinting in *Arabidopsis*. Journal of Cell Science 121: 906–912.
- Mansfield S.G. y Briarty L.G. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*: I. The developing embryo. Canadian Journal of Botany 69: 461-476.
- Mansfield S.G. y Briarty L.G. 1992. Cotyledon cell-development in *Arabidopsis thaliana* during reserve deposition. Canadian Journal of Botany 70: 151-164.
- Mansfield S.G. y Briarty L.G. 1996. The dynamics of seedling and cotyledon cell development in *Arabidopsis thaliana* during reserve mobilization. International Journal of Plant Sciences 157: 280–295.
- Martinez-Zapater J., Coupland G., Dean C. y Koornneef M. 1994. The transition to flowering in *Arabidopsis*. En: *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 403-433
- Masucci J.D. y Schiefelbein J.W. 1996. Hormones act downstream of *TTG* and *GL2* to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. Plant Cell 8: 1505–1517
- Matilla A.J. y Matilla-Vazquez M.A. 2008. Involvement of ethylene in seed physiology. Plant Science 175: 87-97.
- Matsubayashi Y. 2011. Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. Plant Cell Physiology 52: 5–13.
- Matsubayashi Y. 2012. Recent progress in research on small post-translationally modified peptide signals in plants. Genes Cells 17: 1–10.
- Matsuzaki Y., Ogawa-Ohnishi M., Mori A. y Matsubayashi Y. 2010. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. Science 329: 1065–1067.
- McCarty D.R. 1995. Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 46: 71–93.

- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D. y Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
- Mellado-Rojas ME, Santillán-Mendoza R y Beltrán-Peña E. 2013. Proteínas reguladoras del crecimiento y desarrollo vegetal. En: Fronteras en la bioquímica del desarrollo de las plantas. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas pp. 79-80.
- Méndez-Ferreira G.D., Covarrubias-Robles A. y Beltrán-Peña E. 2013. Procesos moleculares involucrados en la protección de las semillas a la desecación. *Biológicas* 15: 42-48.
- Meng L., Buchanan B.B., Feldman L.J. y Luan S. 2012. CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 1760–1765.
- Miransari M. y Smith D.L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121.
- Mordhorst A.P., Voerman K.J., Hartog M.V., Meijer E.A., van Went J., Koornneef M. y de Vries S.C. 1998. Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* 149: 549-563.
- Mohamed-Yasseen Y., Barringer S.A., Splittstoesser W.E. y Costanza S. 1994. The role of seed coats in seed viability. *Botanical Review* 60: 426–439
- Moreno N. P. 1984. Glosario botánico ilustrado (No. 581.03 M843g).
- Morinaka Y., Sakamoto T., Inukai Y., Agetsuma M., Kitano H., Ashikari M. y Matsuoka M. 2006. Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice. *Plant Physiology* 141: 924–93.
- Morquecho-Contreras A., Méndez-Bravo A., Pelagio-Flores R., Raya-González J., Ortiz-Castro R. y López-Bucio J. 2010. Characterization of *drr1*, an alkamide-resistant mutant of *Arabidopsis*, reveals an important role for small lipid amides in lateral root development and plant senescence. *Plant Physiology* 152: 1659-1673.
- Murphy E., Smith S. y De Smet I. 2012. Small signaling peptides in *Arabidopsis* development: how cells communicate over a short distance. *Plant Cell* 24: 3198-3217.

- Müller K., Tintelnot S. y Leubner-Metzger G. 2006. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 47: 864–877.
- Nambara E., Naito S. y McCourt P. 1992. A mutant of *Arabidopsis* which is defective in seed development and storage protein accumulation is a new *abi3* allele. *Plant Journal* 2: 435-441.
- Nambara E., Keith K., McCourt P. y Naito S. 1995. A regulatory role for the ABI3 gene in the establishment of embryo maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 121: 629–636.
- Naran R., Chen G. y Carpita N.C. 2008. Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylanpolysaccharides of flax seed mucilage. *Plant Physiology* 148: 132–141.
- Ni D.A., Wang L.J., Ding C.H. y Xu Z.H. 2001. Auxin distribution and transport during embryogenesis and seed germination of *Arabidopsis*. *Cell Research* 11: 273–278.
- Nogué F., Grandjean O., Craig S., Dennis E. y Chaudhury A.M. 2000a. Higher level of cell proliferation rate and cyclin CycD3 expression in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation* 32: 275-283.
- Nogué F., Hocart C., Letham D.S., Dennis E.S. y Chaudhury A.M. 2000b. Cytokinin synthesis is higher in the *Arabidopsis amp1* mutant. *Plant Growth Regulation* 32: 267-273.
- Nomura T., Ueno M., Yamada Y., Takatsuto S., Takeuchi Y. y Yokota T. 2007. Roles of brassinosteroids and related mRNAs in pea seed growth and germination. *Plant Physiology* 143: 1680–1688.
- Ohto M.A., Floyd S.K., Fischer R.L., Goldberg R.B. y Harada J.J. 2009. Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in *Arabidopsis*. *Sexual Plant Reproduction* 22: 277-289.
- Okushima Y., Fukaki H., Onada M., Theologis A. y Tasaka M. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 118-1340.
- Olsen O.A. 2004. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: S214-S227.

- Orozco-Arroyo G., Paolo D., Ezquer I. y Colombo L. 2015. Networks controlling seed size in *Arabidopsis*. *Plant Reproduction* 28: 17-32.
- Parcy F., Valon C., Kohara A., Miséra S. y Giraudat J. 1997. The ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3), FUSCA 3 (FUS3) and LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *Plant Cell* 9: 1265–1277.
- Parry G., Calderon-Villalobos L.I., Prigge M., Peret B., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W.M., Bennett M. y Estelle M. 2009. Complex regulation of the TIR/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 106: 22540-22545.
- Penfield S., Meissner R.C., Shoue D.A., Carpita N.C. y Bevan M.W. 2001. MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* 13: 2777–2791.
- Pickett F.B., Wilson A.K. y Estelle M. 1990. The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94: 1462-1466.
- Poethig R.S. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923-929.
- Popko J., Hansch R., Mendel R., Polle A. y Teichmann T. 2010. The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biology* 12: 242–258.
- Quail P.H., Boylan M.T., Parks B.M., Short T.W., Xu Y. y Wagner D. 1995. Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-680.
- Rashotte A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J. y Muday G.K. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in root of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 122: 481–490.
- Rashotte A.M., Mason M.G., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E. y Kieber J.J. 2006. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 11081–11085.
- Rawlings N.D. y Salvesen G. 2013. *Hand book of Proteolytic Enzymes* [Electronic Resource] 3rd edn. Academic Press, Waltham, MA.

- Raya-González J., Ortiz-Castro R., Ruíz-Herrera L.F., Kazan K. y López-Bucio J. 2014. PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1/MEDIATOR25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 165: 880-894.
- Raz V., Bergervoet J.H.W. y Koornneef M. 2001. Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243–252.
- Reidt W., Wohlfarth T., Ellerstrom M., Czihal A., Tewes A., Ezcurra I., Rask L. y Bäumlein H. 2000. Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *Plant Journal* 21: 401–408.
- Rerie W.G., Feldmann K.A. y Marks M.D. 1994. The *GLABRA 2* gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 8: 1388–1399
- Rijavec T. y Dermastia M. 2010. Cytokinins and their function in developing seeds. *Acta Chimica Slovenica* 57: 617–629.
- Ritchie S. y Gilroy S. 1998. Gibberellins: regulating genes and germination. *New phytologist* 140: 363-383.
- Robinson M.B., Blakely R.D., Couto R. y Coyle J.T. 1987. Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-Laspartyl-L-glutamate. Identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* 262: 14498-14506
- Rozzak P. y Köhler C. 2011. Polycomb group proteins are required to couple seed coat initiation to fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 20826–20831.
- Sanchez M., Gurusinghe S., Bradford K.J., Vazquez-Ramos J. 2005. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany* 56: 515–523.
- Santos-Mendoza M., Dubreucq B., Miquel M., Caboche M. y Lepiniec L. 2005. LEAFY COTYLEDON2 activation is sufficient to trigger the accumulation of oil and seed specific mRNAs in *Arabidopsis* leaves. *FEBS Letters* 579: 4666-4670.
- Saussem H., Sadok B., Habib K. y Mayer P.M. 2009. Fatty acid accumulation in the different fraction soft developing corn kernel. *Food Chemistry* 117: 432–437.

- Sbardella D., Fasciglione G.F., Gioia M., Ciaccio C., Tundo G.R., Marini S. y Coletta M. 2012. Human matrix metallo proteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 119–208.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C. y Weisbeek P. 1994. Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120: 2475-2487.
- Schruff M.C., Spielman M., Tiwari S., Adams S., Fenby N. y Scott R.J. 2006. The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development* 133: 251–261
- Schultz E. A. y Haughn G. W. 1993. Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* 119: 745-765.
- Schuettengruber B. y Cavalli G. 2009. Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* 136: 3531–3542.
- Schneitz K., Hülskamp M. y Pruitt R.E. 1995. Wild-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant Journal* 7: 731–749
- Scott R.J., Spielman M., Bailey J. y Dickinson H.G. 1998. Parent-oforigin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 3329–3341.
- Scott R., Tratt J. y Bolbol A. 2013. Polyploid and hybrid genomics. Wiley Oxford.
- Shan X., Yan J. y Xie D. 2012. Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current opinion in plant biology* 15: 84-91.
- Shi H., Ye T., Wang Y. y Chan Z. 2013a. *Arabidopsis* ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 negatively modulates plant responses to abscisic acid and dehydration stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 67: 209-216.
- Shi Y., Wang Z., Meng P., Tian S., ZhangX. y Yang S. 2013b. The glutamate carboxypeptidase AMP1 mediates abscisic acid and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 199: 135–150.
- Shu K., Zhang H., Wang S., Chen M., Wu Y., Tang S. y Xie Q. 2013. ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 9: e1003577.

- Skoog F. y Miller C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology Journal* 11: 118-130.
- Smalle J., Kurepa J., Yang P., Babiychuk E., Kushnir S., Durski A. y Vierstra R.D. 2002. Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell* 14: 17-32.
- Soderman E.M., Brocard I.M., Lynch T.J. y Finkelstein R.R. 2000. Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive 4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* 124: 1752–1765.
- Song S.K., Ryu K.H., Kang Y.H., Song J.H., Cho Y.H., Yoo S.D., Schiefelbein J. y Lee M.M. 2011. Cell fate in the *Arabidopsis* root epidermis is determined by competition between WEREWOLF and CAPRICE. *Plant Physiology* 157: 1196-1208.
- Sorensen M.B., Mayer U., Lukowitz W., Robert H., Chambrier P., Jurgens G., Somerville C., Lepiniec L. y Berger F. 2002. Cellularisation in the endosperm of *Arabidopsis thaliana* is coupled to mitosis and shares multiple components with cytokinesis. *Development* 129: 5567–5576.
- Stenvik G.E., Tandstad N.M., Guo Y., Shi C.L., Kristiansen W., Holmgren A., Clack S.E., Alen R.B. y Butenko M.A. 2008. The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *Plant Cell* 20: 1805–1817.
- Sultan S.E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* 5: 537–542.
- Sun X., Shantharaj D., Kang X. y Ni M. 2010. Transcriptional and hormonal signaling control of *Arabidopsis* seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 611–620.
- Taiz L. y E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd Ed. Sinauer Associates Inc. 690 pp.
- Tan L., Chen S., Wang T. y Dai S. 2013. Proteomic insights into seed germination in response to environmental factors. *Proteomics* 13: 1850-1870.
- Telfer A., Bollman M. y Poethig R.S. 1997. Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 645-654.
- Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Lee O.R., Richards E.L., Murphy A.S., Soto F. y Yazaki K. 2005.

- PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17: 2922–2939.
- Thomas T.L. 1993. Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell* 5: 1401–1410.
- Tiryaki I. y Staswick P. 2002. An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiology* 130: 887-894.
- Tominaga R., Iwata M., Okada K. y Wada T. 2007. Functional analysis of the epidermal-specific MYB genes CAPRICE and WEREWOLF in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2264-77.
- Tyler L., Thomas S.G., Hu J., Dill A., Alonso J.M., Ecker J.R. y Sun T.P. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 1008–1019.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T. y Mizuno T. 2001. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42: 231-235.
- Ullah H., Chen J.G., Wang S. y Jones A.M. 2002. Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiology* 129: 897-907.
- Vidaurre D.P., Ploense S., Krogan N.T. y Berleth T. 2007. AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in *Arabidopsis*. *Development* 134: 2561-2567.
- Voegele A., Linkies A., Müller K. y 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. *Journal of Experimental Botany* 62: 5131–5147.
- Voiniciuc C., Yang B., Schmidt M.H. W., Günl M. y Usadel B. 2015. Starting to gel: how *Arabidopsis* seed coat epidermal cells produce specialized secondary cell walls. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 3452-3473.
- Von Arnim A., y Deng X.W. 1996. Light control of seedling development. *Annual Review of Plant Biology* 47: 215-243.
- Wada T., Tachibana T., Shimura Y. y Okada K. 1997. Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC. *Science* 277: 1113-1116.
- Wagner G.J., Wang E. y Shepherd R.W. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3–11.

- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D. y Gray J.C. 1999. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* 11: 1337-1349.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C. y Zhang S. 2007. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Wang A., Garcia D., Zhang H., Feng K., Chaudhury A., Berger F., Peacock W.J., Dennis E.S. y Luo M. 2010. The VQ motif protein IKU1 regulates endosperm growth and seed size in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 63: 670–679.
- Weber H., Borisjuk L. y Wobus U. 1996. Controlling seed development and seed size in *Vicia faba*: a role for seed coat-associated invertases and carbohydrate state. *Plant Journal* 10: 823–834.
- Weinhofer I., Hehenberger E., Roszak P., Hennig L. y Köhler C. 2010. H3K27me3 profiling of the endosperm implies exclusion of polycomb group protein targeting by DNA methylation.
- Western T.L., Skinner D.J. y Haughn G.W. 2000. Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology* 122: 345-356.
- Western T.L., Burn J., Skinner D.J., Martin-McCaffrey L., Moffatt B.A. y Haughn G.W. 2001. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 998-1011.
- Western T.L., Young D.S., Dean G.H., Tan W.L., Samuels A.L. y Haughn G.W. 2004. MUCILAGE-MODIFIED4 encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by APETALA2, TRANSPARENT TESTA GLABRA1, and GLABRA2 in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiology* 134:296-306.
- Western T.L. 2012. The sticky tale of seed coat mucilages: production, genetics, and role in seed germination and dispersal. *Seed Science Research* 22: 1–25.
- Wilkinson J.Q. y Crawford N.M. 1993. Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Molecular and General Genetics* 239: 289-297.
- Wilson A.K., Pickett F.B., Turner J.C. y Estelle M. 1990. A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Molecular and General Genetics* 222: 377-383.

- Windsor J.B., Symonds V.V., Mendenhall J. y Lloyd A.M. 2000. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant Journal* 22: 483-493.
- Wixon J. 2001. Featured organism: *Arabidopsis thaliana*. *Comparative and Functional Genomics* 2: 91-98.
- Woeste K.E., Ye C. y Kieber J.J. 1999. Two *Arabidopsis* mutant that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiology* 119: 521-530.
- Wolkers W.F., McCready S., Brandt W.F., Lindsey G.G. y Hoekstra F.A. 2001. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 1544: 196–206
- Xi W., Liu C., Hou X. y 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.
- Xu Z. y Ni D. 1999. Modifications of leaf morphogenesis induced by inhibition of auxin polar transport. En: Altman, A. (Ed.), *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21th Century*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht pp. 97.
- Xu J. y Zhang S. 2015. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20: 56-64.
- Ye Q., Zhu W., Li L., Zhang S., Yin Y., Ma H. y Wang X. 2010. Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 6100–6.
- Zhang L.Y., Bai M.Y., Wu J., Zhu J.Y., Wang H., Zhang Z., Wang W., Sun T., Zho J., Sun X., Yang H., Xu Y., Kim S.H., Fujioka S., Lin W.H., Chang K., Lu T. y Wang Z.H. 2009. Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3767–3780.