



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



# La ruta FUL-AP2 y la longevidad de los meristemos en *Arabidopsis thaliana*. Bases moleculares y potencial biotecnológico

Memoria presentada por

IRENE MARTÍNEZ FERNÁNDEZ

para optar al grado de DOCTOR  
por la Universitat Politècnica de València

Directora:

CRISTINA FERRÁNDIZ MAESTRE

Tutor:

CARMELO LÓPEZ DEL RINCÓN

Valencia, Julio 2017.



**A mis padres**





## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas las personas que me han acompañado durante esta etapa de mi vida, y que de una forma u otra, me han ayudado a acercarme día a día a conseguir este sueño llamado tesis.

Cristina, gracias por tu gran apoyo y dirección, por guiarme y enseñarme en cada momento con infinita paciencia, por animarme a embarcarme en nuevos proyectos, por haber soportado mis lágrimas y enfados. Son demasiadas cosas las que debo agradecerte, pero sobre todo, que confiaras en mí cuando nadie más lo habría hecho. Muchísimas gracias por haberme dado la oportunidad de hacer el doctorado. Gracias también a ti Paco, por tus correcciones y comentarios, por tu paciencia y por animarme en esta última fase. Gracias a los dos por haberme permitido trabajar todos estos años en el laboratorio.

Todavía recuerdo el día que empecé a hacer las prácticas. No sabía hacer nada. Vicente, no me extraña que pusieras esa cara de menuda me ha caído encima. Una de las primeras cosas que hiciste fue echarme la bronca. Desde entonces me has enseñado gran parte de lo que sé y me has transmitido tu entusiasmo y pasión por la ciencia, y por FUL. Muchas gracias por la paciencia que has tenido conmigo, por ser mi jefecillo y mi ejemplo a seguir.

Patri, te había prometido una hoja para ti sola, pero no va a poder ser. Son tantas las cosas que te tengo que agradecer que necesitaría más espacio. Has estado a mi lado todos estos años, apoyándome en los buenos y malos momentos. Has clonado mis genes sin que te lo pidiera, me has acompañado en mis periplos por el mundo, sabes lo que pienso sin que te lo diga. Para mí has sido mucho más que una compañera de laboratorio. Gracias a ti y a Manu por cuidarme.

Carol, gracias por tu trabajo, por comenzar con la selección de líneas de la mutagénesis y otros tantos proyectos. Pero sobre todo, gracias por tu alegría y por ayudarme a desconectar. Nunca olvidaré las tardes saltando a la comba en la terraza del IBMCP.

No me puedo olvidar de vosotras, Ana B. y Majo. Si no hubierais estado ahí, mi vida habría sido bastante más complicada. Gracias por enseñarme diferentes técnicas sin desesperar por mis prisas, por conseguirme reactivos de última hora, por regalarme medios y por supuesto, por vuestra inestimable compañía.

Gracias a todos los compañeros con los que he trabajado en el laboratorio. Chloe, de quien heredé el trabajo de FUL en guisante y me permitió participar en otros de sus proyectos; Antonio y su promotor de TFL1, gracias por tu ayuda y compañía, te he echado de menos estos años que has estado de postdoc y ahora soy yo la que se tiene que ir; Nacielle, fueron muchas las horas que pasamos en el confocal mirando carpelitos, contigo gané una gran amiga y me enseñaste que aparte de trabajar hay que disfrutar de la vida que hay fuera del laboratorio; Mariana, siempre tan alegre y positiva, muchísimas gracias por tu apoyo, sobre todo estos últimos meses que lo veía todo oscuro; Pedro, gracias por defenderme en mis inicio; Mónica; M<sup>a</sup> Ángeles; Víctor; África; Pepe; Verónica; Ana; Miguel; José Alfredo; Marina;... Y no me puedo olvidar de los estudiantes que han sufrido mis enseñanzas, en especial de Marcos y Sofía.

Gracias a todas las personas que han colaborado en mi trabajo: Carlota Vaz Patto, por el análisis de la composición de las semillas; Tom Warkentin por los ensayos de campo; James Weller; Gerar Duc; y muchos otros.

A Stephan de Folter y Marcio Alves Ferreira, por acogerme en sus grupos durante mis estancias en Irapuato y Rio de Janeiro.

No puedo olvidarme de Roberto, Joana y sobre todo de sus padres (Richard y Elsbieta). No sé qué habría sido de mí si no los hubiera conocido. Era la primera vez que salía de España y no creo que, con mi gallinica debajo del brazo, hubiera durado mucho en Méjico.

A Priscilla y Stefanie les estaré eternamente agradecida por cómo me cuidaron en Rio, todo lo que me enseñaron y todos los lugares a los que me llevaron.

Volviendo al IBMCP, no sería justa si no agradeciera el trabajo que realiza todo el personal de los diferentes servicios y que ha permitido que pueda avanzar en mi investigación. En especial a Marisol, Eugenio, Javier Forment, Victoria, Rafa, Primitivo, Lorena, y por supuesto Alexis.

Tampoco habría conseguido alcanzar mis objetivos sin todas esas personas que en algún momento han resuelto mis dudas, me han dejado equipos, reactivos, cámaras de cultivo, etc. Gracias a Concha, M<sup>a</sup> Cruz, Edelín, Pilar, MD, Begoña, Paco Vera, Jesús, Edu, Bea que tanto me has ayudado estas ultimas semanas, y muchos otros.

A los compañeros del máster del COMAV, por los dos intensos años que vivimos. Javi, Julia, Oreto, Elena... os echo de menos. Y a Flor y Alberto por seguir a mi lado y animarme en los peores días. A los masters del IBMCP, Félix, Ceci, Laura, Rafi..., por compartir conmigo tantas comidas y alguna que otra noche. Y a la gente de VSN.

Por último quiero dar las gracias a la familia Torrecilla, que siempre me ha acogido como si fuera uno más. Y a toda mi familia, que son mi sustento y pase lo que pase sé que estarán ahí para ayudarme.

Nada de esto habría sido posible sin mi madre, que siempre nos ha apoyado de forma incondicional y ha luchado por sacarnos adelante. Y a mi padre, que aunque no pueda estar para verlo, con su ejemplo me enseño que con esfuerzo y buena voluntad se pueden alcanzar todas las metas. Sin vosotros nunca habría llegado a ser lo que soy. Gracias por haber hecho todo lo posible para que tenga la libertad de buscar mi propio camino.

# RESÚMENES



# La ruta FUL-AP2 y la longevidad de los meristemos en *Arabidopsis thaliana*. Bases moleculares y potencial biotecnológico.

## RESUMEN

El desarrollo de todos los órganos de la planta depende de la actividad de los meristemos y regiones adyacentes. Las plantas monocárpicas presentan un único ciclo reproductivo antes de su senescencia y muerte. La senescencia y muerte de estas plantas está precedida por una parada global de la proliferación de sus meristemos (GPA). De este modo, el número de flores/frutos que producen durante su vida depende de la actividad proliferativa de los meristemos apicales de las ramas y de cuando se produzca el GPA. El estudio de los mecanismos que controlan el GPA, así como un mayor conocimiento de los genes implicados en el mantenimiento de las células meristemáticas durante este proceso, proporcionaría herramientas muy útiles en los programas de mejora de cultivos para la obtención de variedades más productivas.

EL GPA es un fenómeno descrito hace más de un siglo para varias plantas monocárpicas, y se han planteado diferentes hipótesis sobre los factores que lo desencadenan. Entre los factores propuestos se encuentran la existencia de relaciones fuente-sumidero o la regulación de la actividad meristemática por parte de los órganos reproductivos en desarrollo. Respecto al papel de los órganos reproductivos está bien definido un papel señalizador de las semillas en desarrollo, ya que la esterilidad de la planta o la poda de los frutos retrasan considerablemente el GPA. Por otro lado, en nuestro grupo se ha desvelado recientemente la que es probablemente la primera ruta genética propuesta de regulación de la longevidad del meristemo en plantas monocárpicas, y que incluye a los factores transcripcionales FRUITFULL (FUL) y APETALA2 (AP2) en el control temporal de este proceso en *Arabidopsis thaliana*. Esta ruta propone que con la edad los niveles de expresión del miR172 y de *FUL* aumentan como consecuencia de la reducción del miR156 y aumento de los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs), que regulan la expresión de *FUL*. El aumento de la expresión de *FUL* y del miR172 produce la reducción de los niveles de *AP2*, que ocasiona la progresiva disminución de la expresión del gen de mantenimiento meristemático *WUSCHEL (WUS)*, y por tanto, el cese de la actividad meristemática y aparición del GPA.

En el capítulo 1 de esta tesis doctoral se ha pretendido profundizar en el estudio del control de la longevidad de los meristemos mediante la ruta FUL-AP2, identificando dianas moleculares o interactores de AP2.

En el capítulo 2 hemos llevado a cabo el rastreo de diferentes poblaciones mutagenizadas buscando mutantes que a pesar de ser estériles tuvieran un GPA temprano, como punto de partida a la identificación de factores implicados en la vía de señalización entre semillas en desarrollo y meristemo apical, otra de las posibles rutas de regulación del GPA.

En el capítulo 3 hemos desarrollado una serie de estrategias biotecnológicas que permiten aumentar la producción de frutos y semillas en *Arabidopsis thaliana*. Estas estrategias tratan de aplicar el conocimiento sobre la ruta FUL-AP2 de mantenimiento de la actividad meristemática para retrasar el GPA. Todas las estrategias convergen en elevar el nivel de expresión de *AP2* únicamente en el SAM. Para ello, se han empleado promotores específicos de este tejido, dirigiendo el silenciamiento de *FUL* o la desregulación de la actividad del miR172. Mediante estas estrategias hemos conseguido incrementar la producción de frutos en la inflorescencia principal de *Arabidopsis* hasta en un 40%.

Por último en el capítulo 4 hemos analizado la conservación funcional de *FUL* en *Pisum sativum*. Tras la caracterización de los mutantes *fula* y *fulb*, observamos como en el mutante *fulb* se retrasa el GPA, incrementando la producción de nudos reproductivos, y por tanto de vainas sin que estas muestren defectos en su desarrollo. Los resultados obtenidos indican una clara conservación del papel de *FUL* en el GPA entre brásicas y leguminosas. El papel conservado de *FUL* en el control del GPA de las leguminosas proporciona un valioso recurso genético para incrementar la producción de estos cultivos.

# La ruta FUL-AP2 i la longevitat dels meristemes en *Arabidopsis thaliana*. Bases moleculars i potencial biotecnològic.

## RESUM

El desenvolupament de tots els òrgans de la planta depèn de l'activitat dels meristemes i regions adjacents. Les plantes monocàrpiques presenten un únic cicle reproductiu abans de la seua senescència i mort. La senescència i mort d'aquestes plantes està precedida per una parada global de la proliferació dels seus meristemes (GPA). D'aquesta manera, el nombre de flors/fruits que produeixen durant la seua vida depèn de l'activitat proliferativa del meristem apical de la tija i de quan es produeix el GPA. L'estudi dels mecanismes que controlen el GPA, així com un major coneixement dels gens implicats al manteniment de les cèl·lules meristemàtiques durant aquest procés, proporcionaria eines molt útils en els programes de millora de cultius per a l'obtenció de varietats més productives.

EL GPA és un fenomen descrit fa més d'un segle per a diverses plantes monocàrpiques, i s'han plantejat diferents hipòtesis sobre els factors que el desencadenen. Entre els factors proposats es troben l'existència de relacions font-sumider o la regulació de l'activitat meristemàtica per part dels òrgans reproductius en desenvolupament. Pel que fa al paper dels òrgans reproductius està ben definit un paper senyalitzador de les llavors en desenvolupament, ja que l'esterilitat de la planta o la poda dels fruits retarda considerablement el GPA. D'altra banda, en el nostre laboratori s'ha revelat recentment la que és probablement la primera ruta genètica proposta de regulació de la longevitat del meristem en plantes monocàrpiques, i que inclou els factors transcripcionals FRUITFULL (FUL) i APETALA2 (AP2) en el control temporal d'aquest procés en *Arabidopsis thaliana*. Aquesta ruta proposa que amb l'edat els nivells d'expressió del miR172 i de *FUL* augmenten com a conseqüència de la reducció del miR156 i augment dels factors de transcripció SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs), que regulen l'expressió de *FUL*. L'augment de l'expressió de *FUL* i del miR172 produeix la reducció dels nivells de *AP2*, que ocasiona la progressiva disminució de l'expressió del gen de manteniment meristemàtic *WUSCHEL (WUS)*, i per tant, el cessament de l'activitat meristemàtica i aparició del GPA.

En el capítol 1 d'aquesta tesi doctoral s'ha pretès aprofundir en l'estudi del control de la longevitat dels meristemes mitjançant la ruta FUL-AP2, identificant dianes moleculars o interactors de AP2.

En el capítol 2 hem dut a terme el rastreig de diferents poblacions mutageneitzades buscant mutants que tot i ser estèrils tingueren un GPA temprà, com a punt de partida a la identificació de factors implicats en la via de senyalització entre llavors en desenvolupament i meristem apical, una altra de les possibles rutes de regulació del GPA.

En el capítol 3 hem desenvolupat una serie d'estratègies biotecnològiques que permeten augmentar la producció de fruits i llavors en *Arabidopsis thaliana*. Aquestes estratègies intenten aplicar el coneixement sobre la ruta *FUL-AP2* de manteniment de l'activitat meristemàtica per retardar el GPA. Totes les estratègies convergeixen en elevar el nivell d'expressió de *AP2* únicament en el SAM. Per açò, s'han emprat promotors específics d'aquest teixit, dirigint el silenciament de *FUL* o la desregulació de l'activitat del miR172. Mitjançant aquestes estratègies hem aconseguit incrementar la producció de fruits en la inflorescència principal d'*Arabidopsis* fins un 40%.

Finalment en el capítol 4 hem analitzat la conservació funcional de *FUL* en *Pisum sativum*. Després de la caracterització dels mutants *fula* i *fulb*, observarem com en el mutant *fulb* es retardava el GPA, incrementant la producció de nusos reproductius, i per tant de baines, sense que aquestes mostraren defectes en el seu desenvolupament. Els resultats obtinguts indiquen una clara conservació del paper de *FUL* al GPA entre brassicas i lleguminoses. El paper conservat de *FUL* en el control de GPA de les lleguminoses proporciona un valuós recurs genètic per incrementar la producció d'aquestos cultius.



# The FUL-AP2 pathway and the longevity of the meristems in *Arabidopsis thaliana*. Molecular bases and biotechnological potential.

## ABSTRACT

The development of all organs of the plant depends on the activity of the meristems and adjacent areas. Monocarpic plants show only one reproductive cycle before they senescence and die. The senescence and death of these plants is preceded by a global proliferative arrest of meristems (GPA). That way, the number of fruits/flowers that they produce during their lives depends on the proliferative activity of apical meristems of the branches and on the time GPA occurs. The study of the mechanisms that control GPA, as well as a better knowledge of genes involved in the maintenance of merismatic cells during this process, can provide useful tools for crop breeding programs in order to obtain more productive varieties.

The GPA is a phenomenon described more than a century ago for some monocarpic plants. Different hypothesis have been set out about the factors that trigger it. Among the factors that might be involved, the existence of source-sink relationships or the regulation of the meristem activity by the reproductive organs in development have been proposed. Regarding reproductive organs, a signalling role of developing seeds is well established, as in sterile plants or in plants where fruits are continuously pruned the GPA is significantly delayed. In our group, it has been recently described the first genetic pathway proposed to regulate the longevity of the meristem in monocarpic plants. This pathway includes transcription factors such as FRUITFULL (FUL) and APETALA2 (AP2) to control the temporal onset of this process in *Arabidopsis thaliana*. Our model proposes that levels of expression of miR172 and *FUL* increase with the age of the plant as consequence of the decrease of miR156 and the upregulation of SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs) transcription factors. The increase of the expression of *FUL* and miR172 causes the downregulation of *AP2*, which causes the progressive decrease of WUSCHEL (*WUS*) expression, and therefore, the cessation of meristematic activity and appearance of GPA.

In the first chapter of this PhD thesis, we have aimed to gain further knowledge in the study of longevity control of the meristems by the FUL-AP2 pathway, identifying molecular targets or interactors of AP2.

In the second chapter, we have screened different mutagenized populations for mutants that show early GPA while been sterile, as a starting point to the identification of factors potentially involved in the signalling mechanism between developing seeds and the apical meristem, one the proposed pathways for GPA regulation.

In the third chapter, we have developed several biotechnological strategies to increase the production of fruits and seeds in *Arabidopsis thaliana*. These strategies aim to apply the knowledge we have gained about the FUL-AP2 pathway for the control of meristem activity to delay GPA. All the strategies converge in increasing AP2 expression specifically in the SAM. For this, specific promoters of this tissue have been used to either to silence *FUL* or to impair miR172 activity. Through these strategies, we have achieved to increase fruit production in Arabidopsis up to 40%.

Finally, in the fourth chapter we have analysed the functional conservation of *FUL* in *Pisum sativum*. After the characterization of the *fula* and *fulb* mutants, we have observed that in *fulb* mutant, GPA is delayed, increasing the production of reproductive nodes and therefore of pods without any additional developmental defects. Our results show the conservation of *FUL* role in GPA regulation between brassica and legumes. This conserved role of *FUL* in GPA control in legumes also provides a valuable genetic resource to increase production in these crops.

# ÍNDICE



# ÍNDICE

Pág.

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Origen del hábito de vida monocárpico.....	3
Plantas monocárpicas .....	4
Parada global de la proliferación o GPA.....	5
Regulación de la actividad meristemática.....	6
Regulación de los cambios de fase a lo largo del desarrollo de la planta.....	10
Regulación del GPA .....	12
Importancia del control del GPA a nivel agronómico .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1:</b>	
<b>LA RUTA FUL-AP2 DE MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA</b> .....	25
Antecedentes .....	27
FUL regula la expresión de AP2 en el SAM.....	28
Regulación del mantenimiento de la indeterminación del SAM .....	34
La sobreexpresión de AP2 en el SAM es capaz de revertir el GPA.....	36
Búsqueda de nuevos genes implicados en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática .....	41
Identificación de dianas moleculares de AP2 en el SAM .....	41
Identificación de interactores de AP2 .....	46
Busqueda bibliográfica de genes candidatos relacionados con la regulación del cese de la actividad meristemática .....	50
<b>DISCUSIÓN</b> .....	57
La ruta FUL/AP2-like, como modelo de regulación de la actividad meristemática .....	57
FUL promovería la formación de la flor terminal mediante la regulación de AG u otros genes de identidad floral en el SAM .....	60
La sobreexpresión de AP2 en el meristemo apical en estadios próximos al GPA es capaz de reactivar la actividad meristemática .....	62
Otros posibles genes identificados con un papel potencial en la regulación del GPA.....	63
<b>CAPÍTULO 2:</b>	
<b>ESTUDIO DEL CONTROL DEL GPA MEDIANTE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN ENTRE SEMILLAS Y MERISTEMO INFLORESCENTE</b> .....	73
Mutantes en la biosíntesis o degradación de azúcares: .....	75
Búsqueda de nuevos mutantes con alteración en el GPA .....	79

Mutagénesis de EMS .....	80
Mutagénesis de <i>Activation tagging</i> : .....	84
<b>DISCUSIÓN</b> .....	91
Cambios en el metabolismo de almidón afectan al GPA .....	92
La identificación de nuevos mutantes podría facilitar el estudio de la ruta de señalización entre semillas y meristemo .....	93
<b>CAPÍTULO 3:</b>	
<b>ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE FRUTOS Y SEMILLAS EN PLANTAS MONOCÁRPICAS</b> .....	
	97
ESTRATEGIA 1:	
Silenciamiento o modificación de la actividad de ful en el SAM.....	102
pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL .....	102
pFD::FUL:VP16.....	107
ESTRATEGIA 2:	
Sobreexpresión de ap2 en el SAM .....	110
pTFL1::AP2 <sup>170</sup> y pFD::AP2 <sup>170</sup> .....	110
pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 .....	115
Validación de la estrategia más efectiva .....	120
Efecto aditivo de la sobreexpresión de AP2 y silenciamiento de FUL en el SAM sobre la producción de flores y frutos .....	123
<b>DISCUSIÓN</b> .....	125
El silenciamiento postranscripcional de <i>FUL</i> en el SAM incrementa la producción de frutos sin alterar su desarrollo. ....	126
FUL como activador transcripcional en el SAM no produce cambios en el rendimiento de frutos .....	127
Reduciendo la represión del miR172 se consigue aumentar el rendimiento en frutos de las plantas hasta en un 41%. ....	128
La estrategia más efectiva para incrementar el rendimiento en frutos en plantas monocárpicas ha sido reducir la represión del miR172 .....	129
Aplicación a otros cultivos de importancia económica.....	131
<b>CAPÍTULO 4:</b>	
Estudio de la conservación funcional de la ruta FUL-AP2 en otras especies y posible aplicación para la mejora genética de los cultivos.....	133
Caracterización fenotípica de los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> en <i>Pisum sativum</i> .....	138

Efecto del estrés hídrico sobre la producción de los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> .....	148
Ensayos de campo con los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> .....	152
Introgresión de los alelos <i>fula</i> y <i>fulb</i> en variedades de élite.....	155
<b>DISCUSIÓN</b> .....	157
<b>CONCLUSIONES</b> .....	163
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	169
Material biológico y condiciones de cultivo.....	171
Metodologías .....	174
Métodos de biología molecular. ....	174
Técnicas microscópicas .....	184
Análisis fenotípico .....	185
Estudios de expresión .....	186
Análisis estadístico .....	186
<b>ANEXOS</b> .....	189
<b>ABREVIATURAS</b> .....	204
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	205





# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## INTRODUCCIÓN:

<b>Figura I-1:</b> Tipos de hábitos de vida. ....	5
<b>Figura I-2:</b> Parada de la actividad meristemática. ....	5
<b>Figura I-3:</b> Organización estructural y funcional del meristemo apical del tallo. ....	7
<b>Figura I-4:</b> Regulación de la actividad meristemática. ....	9
<b>Figura I-5:</b> El miR156 y miR172 regulan el cambio de fase de estado vegetativo a estado reproductivo mediante la ruta de la edad. ....	11
<b>Figura I-6:</b> Rutas de transducción de señales dependientes de la degradación de azúcares que controlan la senescencia. ....	13
<b>Figura I-7:</b> Parada global de la proliferación (GPA). ....	14
<b>Figura I-8:</b> En el mutante <i>ful</i> se retrasa el GPA. ....	16
<b>Figura I-9:</b> La expresión de <i>WUS</i> se mantiene durante más tiempo en el SAM del mutante <i>ful</i> . ...	17
<b>Figura I-10:</b> El mutante <i>ap2-170</i> ....	18
<b>Figura I-11:</b> La Ruta FUL-AP2: un posible modelo. ....	19

## CAPÍTULO 1:

<b>Figura 1-1:</b> La ruta FUL-AP2, modelo de control del mantenimiento meristemático ....	27
<b>Figura 1-2:</b> <i>AP2</i> presenta mayor nivel de expresión en ausencia de FUL o cuando FUL actúa como un activador transcripcional. ....	30
<b>Figura 1-3:</b> La expresión de <i>AP2</i> solo se detecta en el SAM en ausencia de FUL o cuando FUL actúa como un activador transcripcional. ....	31
<b>Figura 1-4:</b> FUL controla el GPA a través de la represión de la familia de factores de transcripción <i>AP2</i> . ....	32
<b>Figura 1-5:</b> Serie temporal de expresión de los factores de transcripción de tipo <i>AP2</i> regulados por FUL. ....	33
<b>Figura 1-6:</b> Tipos de parada meristemática observados en los mutantes caracterizados. ....	35
<b>Figura 1-7:</b> <i>AG</i> se expresa ectópicamente en el SAM antes de formarse la flor terminal. ....	37
<b>Figura 1-8:</b> Esquema de las construcciones pOpON: <i>AP2</i> <sup>170</sup> y pOpON: <i>AP2m3</i> . ....	38
<b>Figura 1-9:</b> Fenotipos observados en las plantas pOpON: <i>AP2</i> <sup>170</sup> y pOpON: <i>AP2m3</i> tras tratar las inflorescencias laterales con dexametasona. ....	39
<b>Figura 1-10:</b> La sobreexpresión de <i>AP2</i> es capaz de revertir el GPA. ....	40
<b>Figura 1-11:</b> Esquema de trabajo en el experimento de RNA-seq. ....	42
<b>Figura 1-12:</b> GO Procesos Biológicos. ....	44
<b>Tabla 1-1:</b> Selección de genes candidatos a regular el GPA. ....	44
<b>Figura 1-16:</b> El rastreo de doble híbrido con una genoteca de factores de transcripción muestra la interacción proteína-proteína entre <i>AP2</i> y <i>BP</i> . ....	47
<b>Figura 1-17:</b> <i>AP2</i> y <i>BP</i> interactúan proteína-proteína y el dímero se localiza en el núcleo. ....	48
<b>Figura 1-19:</b> Los mutantes se adelantan el GPA. ....	51
<b>Figura 1-20:</b> La proteína <i>ARF3</i> se localiza en el SAM y en los meristemos florales (FMs). ....	52

<b>Figura 1-21:</b> Incorporación de ARF3 a la ruta FUL-AP2 de control del mantenimiento de la actividad meristemática en el SAM. ....	53
<b>Figura 1-22:</b> FUL promueve de forma indirecta la expresión de <i>ETT</i> a través de la represión de un represor intermedio. ....	53
<b>Figura 1-23:</b> Caracterización de diferentes alelos mutantes de <i>ETT</i> . ....	54
<b>Figura 1-24:</b> Modificación del modelo de regulación de la actividad meristemática propuesto previamente. ....	57
<b>Figura 1-25:</b> AG podría mediar la determinación del SAM al igual que hace en el meristemo floral. ....	61
<b>Figura 1-26:</b> Hipótesis sobre una posible conexión de la ruta de la edad-AP2 con la ruta de regulación proveniente de la fertilidad/esterilidad de la planta en el control del mantenimiento de la actividad meristemática. ....	63
<b>Figura 1-27:</b> Hipótesis sobre la posible regulación de la actividad meristemática por parte de BP. ....	68
<b>Figura 1-28:</b> Ruta FUL-AP2-(ETT)-WUS. ....	70

## CAPÍTULO 2:

<b>Figura 2-1:</b> Metabolismo del almidón. ....	77
<b>Figura 2-2:</b> Algunos mutantes deficientes en la biosíntesis o degradación de almidón adelantan el GPA, produciendo menos flores en la inflorescencia principal. ....	78
<b>Figura 2-3:</b> Comparación del fenotipo de plantas Ler y <i>cer6-2</i> . ....	79
<b>Figura 2-4:</b> Rastreo primario. ....	81
<b>Figura 2-5:</b> Rastreo secundario. ....	82
<b>Tabla 2-1:</b> Resultados del escrutinio primario. ....	85
<b>Figura 2-6:</b> Escrutinio secundario. ....	86
<b>Figura 2-7:</b> Fenotipo de la línea transgénica 191. ....	87
<b>Figura 2-8:</b> Localización de la inserción del T-DNA en el gen <i>IDM2</i> . ....	88
<b>Figura 2-9:</b> RT-PCR semicuantitativa de los genes localizados alrededor de la inserción del T-DNA. ....	88

## CAPÍTULO 3:

<b>Figura 3-1:</b> Patrón de expresión de <i>TFL1</i> y <i>FD</i> en plantas silvestres de <i>Arabidopsis</i> . ....	100
<b>Figura 3-2:</b> Resumen del proceso de selección y caracterización fenotípica de las líneas transgénicas generadas durante este trabajo. ....	101
<b>Figura 3-3:</b> Tiempo de floración de las líneas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL. ....	103
<b>Figura 3-4:</b> Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL. ....	104
<b>Figura 3-5:</b> A) Producción de semillas en las líneas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL. ....	105
<b>Figura 3-6:</b> Fenotipos presentados por las plantas 35S::amiR-FUL. ....	106
<b>Figura 3-7:</b> Fenotipos observados en las líneas pFD::FUL:VP16. ....	108
<b>Figura 3-8:</b> Tiempo de floración y producción de frutos de la línea pFD::FUL:VP16 #3. ....	108
<b>Figura 3-9:</b> Tiempo de floración de las líneas pFD::FUL:VP16. ....	109

<b>Figura 3-10:</b> Producción de frutos de las líneas FD::FUL:VP16 .....	109
<b>Figura 3-11:</b> Fenotipos observados en la generación T1 de las líneas pFD::AP2 <sup>170</sup> .....	111
<b>Figura 3-13:</b> Tiempo de floración de las líneas pTFL1::AP2 <sup>170</sup> .....	113
<b>Figura 3-14:</b> Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::AP2 <sup>170</sup> .....	114
<b>Figura 3-15:</b> Producción de semillas de algunas de las líneas pTFL1::AP2 <sup>170</sup> .....	115
<b>Figura 3-16:</b> Indeterminación del meristemo floral en algunas líneas transgénicas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 .....	116
<b>Figura 3-17:</b> Tiempo de floración de las líneas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 .....	117
<b>Figura 3-18:</b> Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 .....	118
<b>Figura 3-19:</b> Producción de semillas de las líneas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 .....	120
<b>Figura 3- 22:</b> Producción de frutos en la inflorescencia principal.....	123
<b>Tabla 3-2:</b> Resumen de las líneas seleccionadas .....	130

#### **CAPÍTULO 4:**

<b>Figura 4-1:</b> Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la familia AP1/FUL .....	136
<b>Figura 4-2:</b> Mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> en <i>Pisum sativum</i> .....	138
<b>Figura 4-3:</b> Esquema de retrocruces para la eliminación de otras mutaciones presentes en las plantas <i>fula</i> y <i>fulb</i> procedentes de una población mutagenizada con EMS. ....	139
<b>Figura 4-4:</b> La inflorescencia de <i>Pisum sativum</i> .....	140
<b>Figura 4-5:</b> Caracterización fenotípica de los mutantes <i>fula</i> , <i>fulb</i> y <i>fula fulb</i> procedentes del RC2-F2 .....	143
<b>Figura 4-6:</b> Resumen de la caracterización fenotípica de los mutantes <i>fula</i> , <i>fulb</i> y <i>fula fulb</i> procedentes del RC2 .....	146
<b>Figura 4-7:</b> Comparación del desarrollo radicular de plantas silvestres y mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> ....	149
<b>Figura 4-8:</b> Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de plantas silvestres de <i>P. sativum</i> cv. <i>Caméor</i> .....	149
<b>Figura 4-9:</b> Caracterización fenotípica del efecto de ausencia de riego durante cinco días sobre el desarrollo y producción de los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> .....	151
<b>Figura 4-10:</b> Caracterización fenotípica de los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> crecidos en invernadero en Saskatchewan. ....	153
<b>Figura 4-11:</b> Caracterización fenotípica de los mutantes <i>fula</i> y <i>fulb</i> crecidos en campo. ....	154
<b>Figura 4-12:</b> Esquema de introgresión de los alelos <i>fula</i> y <i>fulb</i> en variedades de élite.....	155

#### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

<b>Tabla M-1:</b> Cepas bacterianas empleadas durante la realización de este trabajo.....	171
<b>Tabla M-2:</b> Genotipos y líneas transgénicas utilizadas es este trabajo. ....	172
<b>Tabla M-3:</b> Variedades de <i>Pisum sativum</i> utilizadas es este trabajo.....	173
<b>Tabla M-4:</b> Vectores utilizados durante este trabajo. ....	179
<b>Figura M-1:</b> Sustitución del miRNA319 del plásmido R300 por el microRNA específico para el gen FUL.....	181



# **INTRODUCCIÓN**



A lo largo de la historia evolutiva, tanto animales como plantas han desarrollado diversos hábitos de vida para adaptarse al medio ambiente que les rodea y aportar descendencia suficiente para permitir la supervivencia de la especie.

La duración del ciclo de vida de los organismos superiores puede variar desde días a cientos de años y puede incluir uno o más eventos reproductivos. Una clasificación general podría dividir a las diferentes especies en dos estrategias: iteroparidad, cuando los individuos se reproducen múltiples veces a lo largo de su ciclo de vida y semelparidad, cuando tras un único evento reproductivo el organismo completa su ciclo de vida y muere poco tiempo después de haber dejado descendencia. En plantas estas estrategias de vida se conocen también como polycarpia y monocarpia respectivamente (Amasino, 2009; Bleecker and Patterson, 1997; Thomas, 2013).

Una de las diferencias entre ambos grupos radica en el momento en el que los meristemos apicales adquieren la competencia para florecer. Mientras en las plantas monocárpicas todos los meristemos apicales del tallo realizan la transición floral a la vez, senescen y mueren tras la floración y producción de semillas, en las plantas policárpicas coexisten meristemos que adquieren la competencia para florecer tras responder a señales endógenas y ambientales y meristemos que permanecen en estado latente. La presencia de meristemos en diferente estado de desarrollo es lo que les permite pasar de forma cíclica por periodos de desarrollo vegetativo y reproductivo (Albani and Coupland, 2010; Amasino, 2009).

En el reino vegetal, hay ejemplos extremos de ambas estrategias. Podemos encontrar plantas policárpicas que son capaces de vivir hasta varios cientos e incluso miles de años, con cientos de ciclos reproductivos, como por ejemplo algunas secuoyas. En cambio, existen plantas monocárpicas, como *Arabidopsis thaliana*, que completan su ciclo de vida en unos pocos meses, y una vez que produce un cierto número de descendientes rápidamente senesce y muere, incluso en condiciones óptimas de crecimiento (Amasino, 2009).

## Origen del hábito de vida monocárpico

Algunos estudios filogenéticos sugieren que las plantas monocárpicas derivan de ancestros perennes o con hábito de vida policárpico y que el cambio de estrategia se ha producido en varias ocasiones de forma independiente a lo largo de la evolución de las angiospermas, por lo que la senescencia monocárpica tiene un origen polifilético (Datson *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 1988; Watkinson, 1992). Esta hipótesis estaría soportada por el fenotipo presentado por la descendencia híbrida del cruce entre especies monocárpicas y policárpicas relacionadas, que por lo general tiende hacia un fenotipo perenne. Estas observaciones sugieren que el origen de la anualidad podría deberse a la pérdida de función de un hábito perenne ancestral (Thomas *et al.*, 2000).

Se ha propuesto, mediante modelos teóricos así como por datos empíricos, que la aparición de hábitos de vida monocárpicos está relacionada con la adaptación a ambientes de crecimiento desfavorables, en los que plantas perennes no son capaces de mantener su crecimiento vegetativo de una generación a otra (Barbier *et al.*, 1991; Bleecker and Patterson, 1997; Cruz-Mazo *et al.*, 2009; Friedman and Rubin, 2015).

## INTRODUCCIÓN

Independientemente del origen de los hábitos de vida monocárpicas, se ha descrito que a lo largo de la evolución de las angiospermas se han producido transiciones entre ambos tipos de hábito de vida, al menos en especies herbáceas (Barrett *et al.*, 1996; Bena *et al.*, 1998; Tank and Olmstead, 2008). Además, hay algunos ejemplos de mutantes en *Arabidopsis thaliana* donde la pérdida de función de unos pocos genes pueden mimetizar esta transición, como por ejemplo el doble mutante *ful soc1*, donde la pérdida de función de los genes *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1)* y *FRUITFULL (FUL)* produce la reversión a un estado de crecimiento vegetativo en algunos meristemos inflorescentes, mientras que otros no llegan a florecer, por lo que estas plantas no senescen tras la floración debido a que los SAMs vegetativos continúan creciendo (Melzer *et al.*, 2008).

### Plantas monocárpicas

En el grupo de las plantas angiospermas se incluyen numerosos ejemplos de plantas monocárpicas, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas. Podemos destacar cultivos de gran importancia en la economía mundial como la colza, leguminosas o cereales, así como especies modelo empleadas ampliamente en investigación, como *Arabidopsis thaliana* o *Medicago truncatula*.

Las plantas monocárpicas se pueden subdividir en función de la duración de su periodo vegetativo en (Fig. I-1):

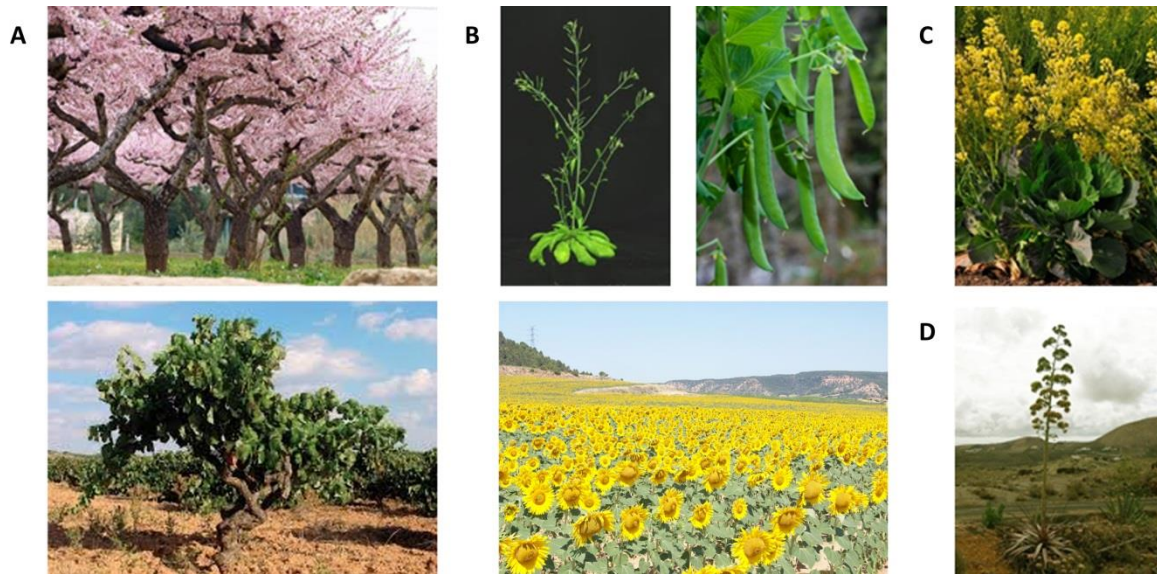
Anuales: Estas plantas tan solo viven una temporada durante la cual desarrollan un periodo de crecimiento vegetativo corto, tras el que florecen y mueren. La mayoría germinan, pasan por el estado vegetativo y florecen durante la primavera y verano y terminan de desarrollar las semillas a finales de verano o en otoño. Posteriormente la planta senesce, aunque ya se ha asegurado la continuidad del próximo ciclo con la producción de un gran número de semillas. Ejemplos de este grupo son el cultivo de cereales, leguminosas, girasol, muchas plantas ornamentales, etc.

Bianuales: En estos casos el desarrollo vegetativo se prolonga durante toda una temporada y la floración se produce a la temporada siguiente, tras la cual la planta muere. Algunos ejemplos podrían ser algunas variedades de *Brassica oleracea*, que durante el primer año forman las hojas de la roseta basal, que es la parte comestible y si no se arranca, durante la segunda temporada desarrolla un tallo vertical y florece.

Perennes: El periodo de crecimiento vegetativo se extiende en el tiempo, llegando a pasar incluso hasta 50 años en los casos más extremos antes de florecer. Sin embargo, tras la floración y la producción de semillas se desencadenan los procesos de senescencia que llevan a la muerte de toda la planta. Ejemplos de este grupo son yucas y ágaves (Young and Augspurger, 1991) o algunos bambús (Keeley and Bond, 1999).

En todos estos tipos de plantas, tras la floración se activan una serie de procesos que finalmente desencadenan en la senescencia de toda la planta.





**Figura I-1: Tipos de hábitos de vida.** A) Plantas policárpicas (*Prunus dulcis*, *Vitis vinifera*). B) Plantas monocárpicas anuales (*Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum*, *Helianthus annuus*). C) Plantas monocárpicas bianuales (*Brassica oleracea* var. *capitata*) D) Plantas monocárpicas perennes (*Agave*).

## Parada global de la proliferación o GPA

La senescencia monocárpica incluye tres procesos coordinados: cese de la actividad meristemática; senescencia de los órganos somáticos y tejidos como las hojas; y la prevención de la reactivación del crecimiento por la supresión de los meristemos axilares (Davies and Gan, 2012). En algunas especies la actividad meristemática cesa debido a que los meristemos inflorescentes indeterminados se transforman en meristemos florales, consumiéndose las células madres en la formación de una flor, mientras que en otras, simplemente se suprime la actividad proliferativa, quedando el meristemo en un estado latente (Fig. I-2). Por otro lado la senescencia de los tejidos somáticos es debida a un proceso de muerte celular programada, que conlleva la movilización de reservas hacia los órganos reproductivos en desarrollo.



**Figura I-2: Parada de la actividad meristemática.** A) Inflorescencia en desarrollo. B) Meristemo apical parado en estado latente. C) Meristemo apical agotado en la formación de una flor terminal. Imagen tomada de Balanzà, 2011.

Si no se produjeran esos tres procesos, el crecimiento de la planta continuaría y esto pondría en peligro el correcto desarrollo de las semillas, puesto que existiría competencia entre los diferentes órganos en crecimiento por los nutrientes disponibles (Davies and Gan, 2012).

## INTRODUCCIÓN

En *Arabidopsis*, se ha descrito que tras el cese de la actividad meristemática del meristemo apical del tallo de la inflorescencia principal, también se detiene la proliferación de todos los meristemas presentes en la planta poco tiempo después. Este fenómeno fue denominado por primera vez por Hensel y colaboradores como GPA, del inglés Global Proliferative Arrest (Hensel *et al.*, 1994).

No se conoce muy bien cuáles son los factores que desencadenan el GPA. Ya en trabajos de la primera mitad del siglo XX se hipotetizaba que debía haber algún sistema de comunicación entre los frutos en desarrollo y los tejidos de la planta madre, porque la eliminación de los frutos retrasaba la senescencia de la planta (Hildebrand, 1881; Molisch, 1938; Murneek, 1926). Como sistema de comunicación entre frutos en desarrollo y meristemo apical se propusieron la participación de las hormonas conocidas (Woolhouse, 1983), una hormona de la muerte aun no identificada (Engvild, 1989; Noodén, 1988) o relaciones fuente-sumidero (Kelly and Davies, 1988; Molisch, 1938; Sinclair and de Wit, 1975). Woolhouse apuntaba que debido al posible origen polifilético de la senescencia monocárpica, en cada grupo de plantas podría estar interviniendo un mecanismo de control diferente (Woolhouse, 1983).

### **Regulación de la actividad meristemática**

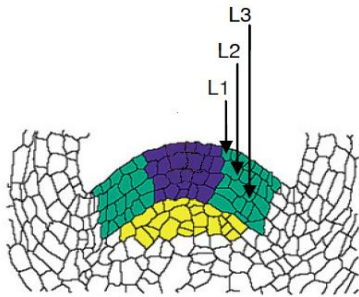
Para explorar los mecanismos que podrían estar implicados en la parada de la actividad meristemática y por tanto desencadenar la aparición del GPA, primero es necesario conocer la regulación del meristemo apical del tallo (SAM), los cambios que sufre a lo largo de las diferentes fases del desarrollo de la planta y las señales que promueven dichos cambios.

Durante la embriogénesis se establecen los meristemas apicales del tallo y de la raíz, que tras la germinación se encargarán de generar todos los órganos de la planta. Para ello deben ser capaces de mantener su estructura y función durante todo el ciclo de vida.

El SAM está compuesto a nivel estructural por tres capas celulares (L1-L3). La capa epidérmica-L1 y subepidérmica-L2 están compuestas por una capa de células que se dividen de forma anticlinal. El conjunto de capas celulares localizadas debajo de la capa L2 se consideran parte de la capa L3, con división tanto anticlinal como periclinal. La capa L1, que dará lugar a la epidermis, junto a la capa L2 o subepidérmica, que dará lugar al mesodermo, constituyen la túnica. La capa L3, de la cual se originarán los tejidos vasculares, constituye el corpus (Barton, 2010; Bowman and Eshed, 2000; Fletcher, 2002; Hobe *et al.*, 2001; Vernoux *et al.*, 2010) (Fig. I-3).

A nivel funcional, el meristemo también se puede dividir en tres zonas: zona central, zona periférica y zona medular. La zona central es la responsable del mantenimiento del meristemo. Esta región está compuesta por las células madre pluripotentes (aproximadamente nueve células, tres por capa celular meristemática) y presenta una baja tasa de actividad mitótica, para reducir la posibilidad de introducir mutaciones asociadas a la replicación del DNA (Furner I and Pumfrey, 1992; Irish and Sussex, 1992; Steeves, 1989; Vernoux *et al.*, 2010). A ambos lados de la zona central se encuentra la zona periférica, donde se inician los primordios de órganos laterales, mientras que por debajo de ella se encuentra la zona medular, que dará lugar a tejido interno del tallo (Steeves, 1989; Vernoux *et al.*, 2010) (Fig. I-3). Tanto la zona periférica como la zona medular presentan una alta tasa de división, que permite aportar el número de células necesario para la

iniciación de nuevos órganos (Bowman and Eshed, 2000; Fletcher, 2002; Hobe *et al.*, 2001; Weigel and Jurgens, 2002). Para mantener esta separación funcional y por tanto la integridad del meristemo, cada célula debe captar señales acerca de su posición exacta en cada momento en el meristemo y asegurar una alta coordinación entre diferenciación y proliferación (Barton, 2010).



**Figura I-3: Organización estructural y funcional del meristemo apical del tallo.** A nivel estructural el SAM está compuesto por tres capas celulares (L1-L3). Las células localizadas en las capas L1 y L2 se dividen de forma anticlinal. El resto de capas celulares inferiores se incluyen dentro de la capa L3 y se dividen de forma anticlinal y periclinal. A nivel funcional el SAM se divide en tres zonas: zona central (azul), zona periférica (verde) y zona medular (amarillo). Las células madre pluripotentes se localizan en la zona central y se dividen lentamente. Las células de la zona periférica se dividen más rápidamente para generar el número de células necesario para la formación de los órganos laterales en flancos del meristemo. A partir de la zona medular se inicia la diferenciación de tejidos internos. Imagen modificada a partir de Haecker and Laux, 2001 .

Numerosos estudios en *Arabidopsis* han mostrado que la actividad del SAM está controlada por complejas redes de regulación en las que participan factores de transcripción, miRNAs, pequeños péptidos, hormonas, enzimas y marcas epigenéticas (Bustamante *et al.*, 2016).

*WUSCHEL (WUS)* (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998) y *SHOOTMERISTEMLESS (STM)* (Long *et al.*, 1996) son dos genes clave para la correcta actividad y mantenimiento de los meristemos, ya que la pérdida de función de estos genes ocasiona la desaparición de los meristemos (Laux *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996). *WUS* es un factor de transcripción con homeodominio perteneciente a la familia *WOX* (*WUSCHEL*-like homeobox), específico de plantas (Haecker *et al.*, 2004; Kieffer *et al.*, 2006), mientras que *STM* es un factor de transcripción también con homeodominio, pero de la familia *KNOX* (*Knotted1*-like homeobox), y que presenta gran similitud con los factores de transcripción con homeodominio tipo *TALE* de animales (Hake *et al.*, 1995).

*WUS* y *STM* actúan a través de rutas independientes y ejercen funciones complementarias en el SAM (Lenhard *et al.*, 2002). *WUS* se expresa en el centro organizador, un pequeño dominio justo por debajo de la población de células madre, y es imprescindible para el mantenimiento de su integridad, mientras que *STM* se expresa en una región más amplia, ocupando todo el meristemo, y permite que las células de la zona periférica y zona medular se mantengan en un estado desdiferenciado y proliferativo (Lenhard *et al.*, 2002), para que se dividan el número de veces necesario antes de iniciar la organogénesis en los primordios de órganos (Fig. I-3).

La expresión de *WUS* está controlada principalmente por un bucle de autorregulación en el que participan los complejos *CLAVATA (CLV)* (Brand *et al.*, 2000; Fletcher *et al.*, 1999; Mayer *et al.*, 1998). Esta ruta mantiene la expresión espacial de *WUS* confinada al centro organizador, controlando de esta manera el tamaño de la población de células madre del meristemo. El factor de transcripción *WUS* se desplaza a través de plasmodesmos desde el centro organizador, donde se sintetiza, hasta diferentes zonas del meristemo, estableciéndose un gradiente de proteína

## INTRODUCCIÓN

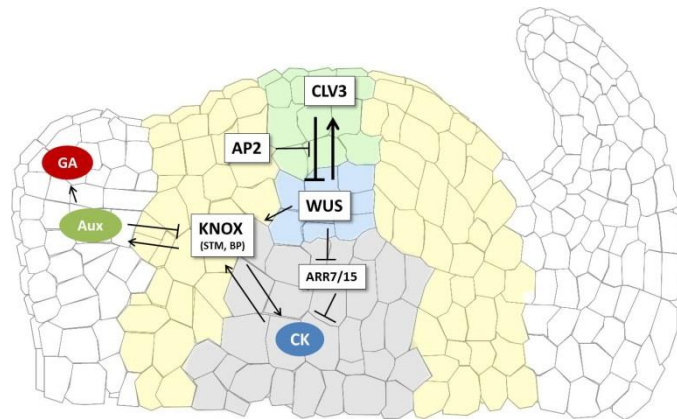
(Yadav *et al.*, 2011). Según si existen altos o bajos niveles de acumulación de proteína, WUS es capaz de activar o reprimir la expresión del gen *CLAVATA3 (CLV3)*. Cuando existen altos niveles de acumulación de proteína, WUS se une en forma de dímero a elementos reguladores de la transcripción en la secuencia genómica de *CLV3*, reprimiendo su expresión, como ocurre en las capas celulares cercanas al centro organizador (L3 y zona medular). Sin embargo, cuando el nivel de acumulación de WUS es bajo, en las capas celulares L1 y L2, se une a las secuencias reguladoras de *CLV3* en forma de monómero, activando su expresión (Perales *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2016). *CLV3* es un gen que codifica un pequeño glicopéptido extracelular que producen las células madre meristemáticas (Fletcher *et al.*, 1999; Ohyama *et al.*, 2009) y funciona como una molécula de señalización. *CLV3* difunde hacia las capas inferiores y es captado por diferentes complejos receptores de membrana tipo LRRRK (Leucine Rich Repeat Receptor Kinase) (Brand *et al.*, 2000; Ogawa *et al.*, 2008) formados por las proteínas *CLV1* o *CLV2/CORYNE (CRN)* (Clark *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 2010; Jeong *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2008) localizados en las capas celulares L2 y L3 del meristemo. Estos complejos, tras la percepción de *CLV3*, inician la transducción de una señal que finaliza en la represión transcripcional de *WUS*. De esta forma se establece una retroalimentación entre la activación de *CLV3* por *WUS* y la represión de éste por la ruta *CLV* que mantiene los niveles de *WUS* controlados espacialmente en el centro organizador del meristemo (Fig. I-4).

Se han propuesto otros factores adicionales que median la regulación de la ruta *CLV*. Como, por ejemplo, el *miR394*, que se expresa en la capa L1, desde donde se desplaza hacia las capas inferiores, donde promueve la expresión de *WUS* a través de la represión de la proteína F-box *LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR)* (Knauer *et al.*, 2013); o factores de transcripción, como *HANABA TARANU (HAN)* (Zhao *et al.*, 2004), *STIMPY (STIP)* (Wu *et al.*, 2005), *ULTRAPETALA1 (ULT1)* (Carles *et al.*, 2005), *SPLAYED (SYD)* (Kwon *et al.*, 2005) y *APETALA2 (AP2)* (Wurschum *et al.*, 2006).

*AP2*, pertenece a la subfamilia de factores de transcripción de tipo *AP2*, junto a *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMUTZE (SMZ)* y *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*. Todos ellos están regulados por el *miR172*, que actúa sobre el RNA mensajero mediando su degradación (Chen, 2004; Kasschau *et al.*, 2003) y/o impidiendo su traducción (Aukerman and Sakai, 2003). *AP2* está implicado en múltiples procesos, como el desarrollo floral (Bowman *et al.*, 1991; Drews *et al.*, 1991), la formación de las semillas (Jofuku *et al.*, 1994; Jofuku *et al.*, 2005), la regulación del tiempo de floración (Aukerman and Sakai, 2003), o el mantenimiento de la actividad meristemática (Wurschum *et al.*, 2006). Su función más conocida es la de regulador del desarrollo floral, donde junto a *APETALA 1 (AP1)* confiere la identidad de órganos florales externos, sépalos y pétalos, y establece una relación antagónica con *AGAMOUS (AG)*. Mientras que *AP2* restringe la expresión de *AG* a los dominios internos del meristemo floral, *AG* restringe la expresión de *AP2* a los dominios externos, permitiendo el correcto desarrollo de todos los órganos florales y la determinación del meristemo floral con la formación del carpelo (Bowman *et al.*, 1991; Drews *et al.*, 1991). También se ha propuesto su función como regulador de la actividad del meristemo inflorescente, tras la identificación de un alelo mutante dominante negativo de *AP2* (mutante *I28*) que mostraba la terminación prematura de la actividad del SAM. Estudios genéticos indicaban que el fenotipo de este mutante en cuanto a la terminación del SAM dependían de la presencia de *CLV3*, sugiriendo que *AP2* podría estar regulando el ciclo de retroalimentación entre *WUS* y *CLV3*,

reprimiendo la señalización de CLV y promoviendo de esta manera la expresión de *WUS* (Wurschum *et al.*, 2006).

Diferentes hormonas vegetales, como citoquininas (CKs), giberelinas (GAs) y auxinas (Aux), también son claves en la regulación meristemática. *WUS* y los genes *KNOX I* mantienen elevados los niveles de CKs en el SAM, promoviendo la proliferación celular, mientras que el establecimiento de máximos de Aux y GAs promueven la iniciación de órganos laterales y diferenciación celular (Shani *et al.*, 2006).



**Figura I-4: Regulación de la actividad meristemática.** *WUS* se expresa en la base de la zona central e interactúa con la vía de receptor quinasa CLAVATA para establecer un ciclo de retroalimentación que regula el tamaño del meristemo. Existen otros factores que intervienen en la regulación de la ruta CLV, como por ejemplo *AP2*, que reprime la regulación negativa de *CLV3* sobre *WUS*, manteniendo de esta manera su expresión. *WUS* genera una zona de alta respuesta o sensibilidad a CKs, al reprimir la expresión de *ARR7* y *ARR15*, reguladores negativos de la señalización de CKs, mientras que los genes *KNOX*, mantienen elevados niveles de CKs. Todo ello permite que las células de la zona periférica se mantengan en un estado desdiferenciado y se dividan el número de veces adecuado como para aportar las suficientes células requeridas para la iniciación de los órganos laterales. Los genes *KNOXs* están reprimidos en los primordios de órganos para permitir la diferenciación celular a través de la acción de las Auxinas.

Las CKs promueven la proliferación e inhiben la diferenciación de las células madre en el SAM (Kurakawa *et al.*, 2007; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Existe una señal de retroalimentación entre *WUS* y la señalización de CKs. *WUS* promueve la síntesis y respuesta a CKs y las CKs activan la expresión de *WUS*: *WUS* por un lado genera una zona de alta respuesta o sensibilidad a CKs, al reprimir la expresión de *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de tipo A (ARR) 7* y *ARR15*, reguladores negativos de la señalización de CKs (Leibfried *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010); por otro, promueve la expresión de *STM*, el cual activa la expresión de *ISOPENTENYLTRANSFERASE 7 (IPT7)*, un enzima implicado en la ruta de biosíntesis de CKs (Kyojuka, 2007). A su vez, las CKs activan la expresión de *WUS* a través de mecanismos tanto dependiente como independientes de CLV (Chickarmane *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2009).

Las auxinas, gracias a la acción de *STM*, se acumulan en los primordios de órganos laterales y promueven la diferenciación celular (Barkoulas *et al.*, 2008; Heisler *et al.*, 2005; Reinhardt *et al.*, 2003). También las Aux reprimen a *STM* (Barkoulas *et al.*, 2008; Byrne *et al.*, 2000) y a reguladores negativos de la señalización de CKs como *ARR7*, *ARR15* o *ARABIDOPSIS HISTIDINE*

## INTRODUCCIÓN

*PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6 (AHP6)*, permitiendo establecer los límites entre la zona periférica y los primordios (Besnard *et al.*, 2014; Bhatia *et al.*; Zhao *et al.*, 2010).

Las GAs promueven la elongación celular, un rasgo característico de células diferenciadas, (Shani *et al.*, 2006). Se acumulan en los primordios de órganos y presentan muy bajos niveles en el meristemo, debido en parte a la acción de STM, que reprime la expresión de la *GIBBERELLIN 20-OXIDASE (GA20ox)* un gen implicado en la biosíntesis de GAs activas (Jasinski *et al.*, 2005). Las Aux también incrementan los niveles de GAs (Jasinski *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005) permitiendo la diferenciación celular para generar los diferentes tejidos de los órganos laterales en formación.

### **Regulación de los cambios de fase a lo largo del desarrollo de la planta**

Durante el ciclo de vida de las angiospermas se distinguen diferentes cambios de fase que delimitan los estadios del desarrollo de la planta: adquisición de la competencia para florecer, transición floral, iniciación floral, desarrollo de los órganos florales (Weigel and Nilsson, 1995) y, para las plantas monocárpicas en particular, senescencia de la planta entera.

A lo largo de la vida de la planta se van a desarrollar distintos tipos de órganos a partir de las células pluripotentes del SAM. Durante la fase vegetativa, que se puede dividir en una fase juvenil y una fase adulta (Hackett, 1985; Poethig, 1990), tan solo se forman hojas. El cambio de una fase a otra está marcado por la adquisición de la competencia para florecer, ya que las plantas en estadio juvenil no son capaces de florecer, aunque crezcan bajo condiciones inductivas de la floración. Cuando las plantas han alcanzado la fase vegetativa adulta cuentan con las características morfológicas y fisiológicas necesarias para responder a señales inductoras de la floración que desencadenarán la transición floral. En este cambio de fase el meristemo vegetativo se transforma en un meristemo inflorescente, y comienza a generar en sus flancos meristemas florales, a partir de los cuales se desarrollarán los diferentes órganos florales (Amasino, 2009; Bergonzi and Albani, 2011).

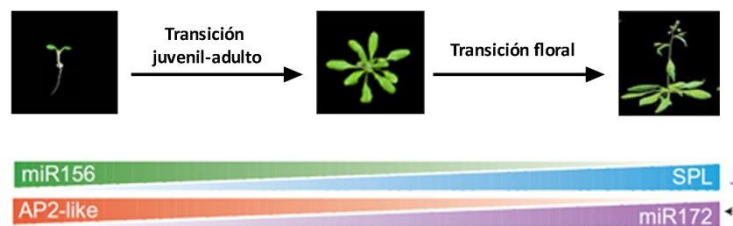
Para que la planta se desarrolle con normalidad y se adapte al medio en el que crece, el SAM debe ser capaz de captar señales endógenas y exógenas. Todas estas señales activarán una compleja red de regulación génica.

La edad de la planta es una de los principales condicionantes endógenos que regulan los cambios de fase durante su ciclo vital, y su efecto está mediado en gran medida por la acción de diferentes microRNAs, que, al menos en la transición de fase vegetativa a fase reproductiva, parece estar conservada en las angiospermas (Bergonzi *et al.*, 2013; Bhogale *et al.*, 2014; Eviatar-Ribak *et al.*, 2013; Wang, 2014; Zhou *et al.*, 2013). En concreto, se ha comprobado que en diferentes especies alejadas filogenéticamente, dos microRNAs, el miR156 y miR172, actúan de forma antagónica en el control de la transición de estado vegetativo a reproductivo, regulando la expresión de diferentes familias de factores de transcripción (Wu *et al.*, 2009).

En estudios realizados con *Arabidopsis* se ha comprobado que durante el crecimiento vegetativo los niveles del miR156 son altos, reprimiendo la actividad de los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) (Wu and Poethig, 2006). Sin embargo, conforme avanza la edad de la planta, la expresión del miR156 se reduce paulatinamente,



permitiendo la acción de las proteínas SPL, que median el cambio de fase de juvenil a adulto y la transición floral, al activar la expresión del miR172 y de otros factores de transcripción que promueven dicha transición, como FRUITFULL (FUL) (Gandikota *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2008; Usami *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008; Wu and Poethig, 2006; Zhu and Helliwell, 2011). Esto permite que el miR172, que se expresa a bajos niveles en la etapa inicial de la vida de *Arabidopsis*, aumente paulatinamente con la edad de la planta (Sung *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006), reprimiendo con mayor eficiencia la actividad de los factores de transcripción tipo AP2-like (Mylne *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006). En etapas tempranas de desarrollo, los altos niveles de expresión de los factores de transcripción AP2-like evitan la transición floral a través de la represión directa de *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *SOC1*, genes clave para la transición floral que integran señales procedentes de múltiples rutas genéticas (Mathieu *et al.*, 2009; Mylne *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2006; Yant *et al.*, 2010). Con el paso del tiempo, al aumentar los niveles del miR172, se reduce la expresión de los genes *AP2-like*, lo que unido al aumento de expresión de los genes *SPL*, que ya no son reprimidos por el miR156, permite el desencadenamiento de la transición floral mediante la activación directa de *SOC1* y *FUL* entre otras proteínas (Fornara and Coupland, 2009; Mathieu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009) (Fig. I-5).



**Figura I-5: El miR156 y miR172 regulan el cambio de fase de estado vegetativo a estado reproductivo mediante la ruta de la edad.** Los niveles del miR156 son altos en estadio juvenil pero significativamente reducidos en los adultos. Como resultado el nivel de expresión de *SPLs* se eleva, lo que conduce a la activación de miR172 y por lo tanto, a la reducción de los genes *AP2-like*. En la fase juvenil, las proteínas *AP2-like*, reprimen la floración a través de la represión de *FT* en hojas. Imagen modificada a partir de Zhu and Helliwell, 2011 y Wang, 2014 .

Esta ruta además está finamente regulada a varios niveles. Por ejemplo, en *Arabidopsis*, los miR156A y miR156C son reprimidos transcripcionalmente mediante remodelación de la cromatina mediada por SWINGER y PICKLE, que se unen directamente a los genes precursores del miR156 y contribuyen a la acumulación de H3K27me3 (Xu *et al.*, 2015). También se ha sugerido que los azúcares, como la trehalosa-6-fosfato, median la represión del miR156 regulando su expresión a nivel transcripcional y postranscripcional, específicamente el de miR156A y miR156C (Wahl *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013).

### Regulación del GPA

El GPA podría considerarse otro cambio de fase en el desarrollo de la planta. Representa el paso de un crecimiento activo de la inflorescencia a la parada de la actividad de las células meristemáticas, que pasan a un estado latente mientras los órganos vegetativos de la planta senescen y se produce una redistribución de los nutrientes, que se movilizan hacia los órganos reproductivos para que completen correctamente su desarrollo. Al igual que para florecer, las plantas deben alcanzar la competencia para detectar las señales que activan el programa de senescencia (Thomas, 2013).

Aunque este cambio de fase tiene importantes consecuencias en el rendimiento de la planta, ya que representa el final de la etapa productiva y de la vida de las plantas monocárpicas, no se conoce con certeza cuál es la naturaleza de la señal que lo desencadena ni las redes genéticas que puedan estar regulando su aparición.

Existen principalmente dos hipótesis que han recibido mayor atención: la existencia de relaciones fuente-sumidero con la redistribución de nutrientes desde los tejidos somáticos hacia los tejidos reproductivos (Hildebrand, 1881; Kelly *et al.*, 1988; Molisch, 1938) y la existencia de señales desencadenadas por la formación de frutos y semillas que llevan a parar el crecimiento de la planta (Alvarez *et al.*, 1992; Hensel *et al.*, 1994; Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Wuest *et al.*, 2016). Ambas hipótesis están relacionadas, puesto que el control del crecimiento de la planta por parte de los tejidos reproductivos en las plantas monocárpicas, permitiría evitar el empleo de recursos en la formación de nuevas estructuras vegetativas e invertirlos en el buen desarrollo de las semillas en formación, aportando así semillas de calidad con las que comenzar un nuevo ciclo de vida.

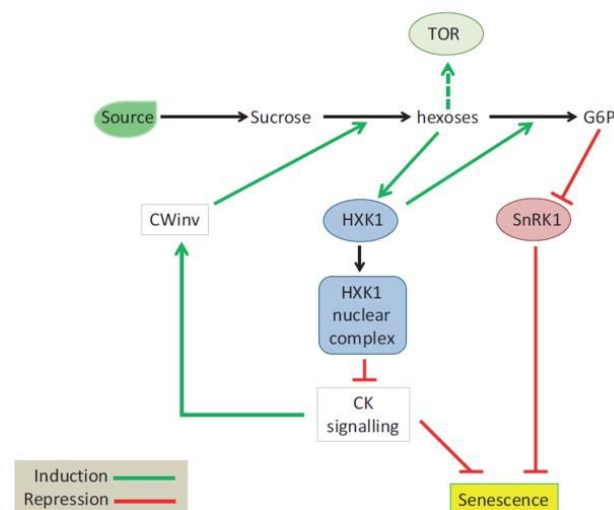
### Relaciones fuente sumidero

Se ha observado que en las plantas monocárpicas se induce la senescencia en respuesta a la relocalización de nutrientes. Sin embargo, no se conoce con precisión cuál es la comunicación entre los órganos fuente y los órganos sumidero que llevan a esta respuesta (Davies and Gan, 2012).

Existen evidencias de que los azúcares influyen en la senescencia de las hojas (Rolland *et al.*, 2006; Wingler and Roitsch, 2008). Estudios realizados hace ya varias décadas en soja indicaban una transferencia significativa de azúcar desde las hojas a las semillas en desarrollo a través del floema (Bennett *et al.*, 1984). Trabajos más recientes confirman que existen cambios en la proporción de sacarosa y hexosas que desencadenan diferentes rutas de transducción de señales que terminan induciendo o reprimiendo la senescencia (Smeekens *et al.*, 2010). Algunos de los integrantes de estas rutas de señalización son SUC-NON-FERMENTING-1-RELATED KINASE1 (SnRK1) (Baena-González *et al.*, 2007), distintas hexoquinazas (HXKs) o TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) (Aguilera-Alvarado and Sanchez-Nieto, 2017; Moore *et al.*, 2003; Smeekens *et al.*, 2010; Xiong and Sheen, 2012). *SnRK1* se activa cuando los niveles de energía son bajos, reprimiendo los procesos biosintéticos que consumen recursos y estimulando los procesos catabólicos productores de energía. *SnRK1* se induce, entre otros factores, por altas concentraciones celulares



de sacarosa y/o baja glucosa, condiciones asociadas con la inducción de la senescencia y también se ha reportado que interactúa con las HXKs, que actúan como sensores de glucosa (Thomas, 2013). Las HXKs son las únicas proteínas capaces de fosforilar a la glucosa en plantas, por lo que su actividad catalítica tiene un profundo impacto en el metabolismo celular y otras vías de señalización del azúcar que dependen de hexosas fosforiladas y productos glicolíticos intermedios. Además pueden reprimir la expresión de algunos genes implicados en la fotosíntesis, en respuesta a altas concentraciones internas de glucosa (Aguilera-Alvarado and Sanchez-Nieto, 2017). Se ha observado que plantas con menor expresión de *SnRK1* presentan diferentes irregularidades en el desarrollo, entre ellas una senescencia prematura, y que en el mutante *hvk1*, que es insensible a la glucosa, se retrasa la floración y la senescencia (Fig. I-6). Por su parte TOR, otra quinasa, parece ser un punto de convergencia en una red reguladora que coordina el estado energético, el contenido de azúcar, la disponibilidad de N, el destino celular y la longevidad en la planta (Thomas, 2013).

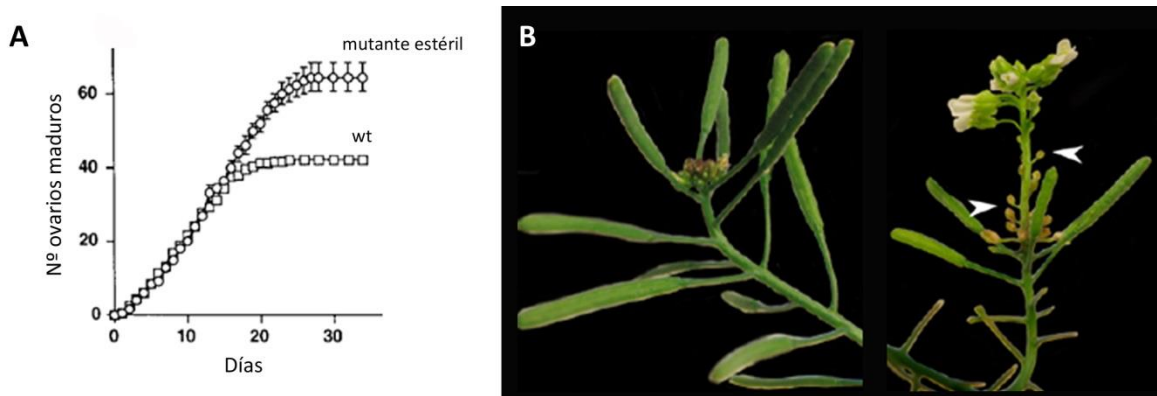


**Figura I-6: Rutas de transducción de señales dependientes de la degradación de azúcares que controlan la senescencia.** Imagen tomada de Thomas, 2013.

### Regulación por parte de las semillas en desarrollo y posible control hormonal del GPA

Se ha comprobado en diferentes estudios realizados en *Arabidopsis*, soja, guisante y otras plantas, que la inflorescencia primaria produce un número predecible de flores antes de detener su actividad (Alvarez *et al.*, 1992; Hensel *et al.*, 1994; Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Wuest *et al.*, 2016), y que la eliminación de las vainas (Noodén and Murray, 1982) o la restricción física de su crecimiento mediante la colocación de estructuras rígidas alrededor de las vainas en desarrollo (Miceli *et al.*, 1995) previene la senescencia foliar y prolonga la fase productiva. Cuando se ha alcanzado un número de frutos determinado, dependiente de cada especie y de la variedad estudiada, el meristemo no senesce, sino que adquiere un estado quiescente, del cual puede reactivar su actividad proliferativa si se dan las condiciones adecuadas, como por ejemplo, si se eliminan los frutos que se estaban desarrollando (Bleecker and Patterson, 1997; Hensel *et al.*, 1994; Wuest *et al.*, 2016) (Fig. I-7).

## INTRODUCCIÓN



**Figura I-7: Parada global de la proliferación (GPA).** A) El GPA se produce tras el desarrollo de un número concreto de frutos y la eliminación de los frutos o la esterilidad de los mismos prolonga la etapa productiva y retrasa su aparición. Modificado a partir de Hensel *et al.*, 1994 . B) Con la aparición del GPA, el meristemo pasa a un estado quiescente del que puede reiniciar su actividad si se eliminan todos o la mayoría de los frutos. Tomado de Wuest *et al.*, 2016 .

Se han propuesto diferentes explicaciones a este proceso. El agotamiento de un nutriente clave es una posibilidad, pero no se puede descartar la producción de una señal inhibitoria ligada al desarrollo de los frutos. Las señales que se han propuesto han sido de tipo hormonal, bien las hormonas conocidas (Noodén, 1988) o tal vez alguna hormona “de la muerte” no identificada (Engvild, 1989; Wilson, 1997). Según la hipótesis de la hormona de la muerte, se propone que los órganos sumideros en desarrollo exportan un factor que desencadena la senescencia en las hojas para conseguir la removilización de nutrientes y el GPA (Engvild, 1989; Wilson, 1997).

Aunque en trabajos antiguos se detectó que los niveles de hormonas como GAs y auxinas se mostraban afectados durante la senescencia monocárpica en guisante (Leopold *et al.*, 1959; Lindoo and Noodén, 1977; Zhu and Davies, 1997), en el trabajo realizado por Hensel *et al.* (1994), donde se estudió el efecto sobre el GPA de diversos mutantes deficientes o insensibles a éstas y otras hormonas (Aux, GAs, Etileno y ABA), no se observó ningún efecto claro de los mutantes con alteraciones hormonales sobre el momento de aparición del GPA, a excepción del mutante auxin resistant 2 (*axr2*), que codifica un miembro de la familia INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA7) cuya mutación lo hace resistente a la degradación mediada por auxinas (Timpste *et al.*, 1994) y *ga requiring 1-2* (*ga1-2*), deficiente en la biosíntesis de GAs (Sun *et al.*, 1992). Sin embargo, aunque *axr2* y *ga1-2* mostraron una reducción del 30% en la producción de frutos en la inflorescencia principal, estas plantas también mostraban una serie de aberraciones morfológicas tales como tamaño reducido y aumento de ramificación que pueden haber influido indirectamente en la capacidad proliferativa de la inflorescencia. Por tanto, el análisis de los mutantes hormonales no proporcionó evidencias convincentes de un papel directo de las Auxinas, GAs, ABA o etileno en la regulación del GPA. Sin embargo, otros trabajos han aportado evidencias de que las CKs podrían retrasar la senescencia regulando las relaciones fuente sumidero (Davies and Gan, 2012; Moore *et al.*, 2003). En algunos casos, la aplicación de CKs es suficiente para retrasar casi indefinidamente la expresión completa del síndrome de senescencia (Grbić and Bleeker, 1995; Noodén, 1988; Woolhouse, 1983). Mutantes que son deficientes en la degradación de CKs incrementan la producción de flores y frutos, pero este efecto no parece ser debido a un retraso en el momento en el que se produce el GPA, sino a que se aumenta el tamaño del meristemo y la iniciación de las flores tiene lugar a un ritmo más alto (Bartrina *et al.*, 2011).

Sin embargo, recientemente se han descrito mutantes de ganancia de función en dos de los receptores de CKs, ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2 (AHK2) y AHK3, que afectan a la longevidad de la planta. Estos mutantes (*rock2* y *rock3*) presentan floración temprana; menor desarrollo radicular al elongar menos la raíz principal e inhibirse la formación de raíces laterales; mayor tamaño de los órganos (hojas, órganos florales, tallo, etc.) asociado a una mayor proliferación celular; retraso en la senescencia de las hojas; y una fase reproductiva de mayor duración, que permite la producción de más frutos, con lo cual el rendimiento en semillas de la planta se incrementa (Bartrina *et al.*, 2017). Los autores de este trabajo sugieren que las CKs podrían impedir el GPA manteniendo la división celular en el SAM: en condiciones normales, se requeriría una caída en la actividad de las CKs para que se detenga la actividad meristemática durante el GPA; sin embargo, en los mutantes *rock2* y *rock3*, donde está activada de forma constitutiva la señalización de CKs, el GPA se retrasa. No obstante, muchos aspectos de esta hipótesis no están demostrados y siguen sin conocerse los mecanismos moleculares que estarían mediando esta respuesta (Bartrina *et al.*, 2017).

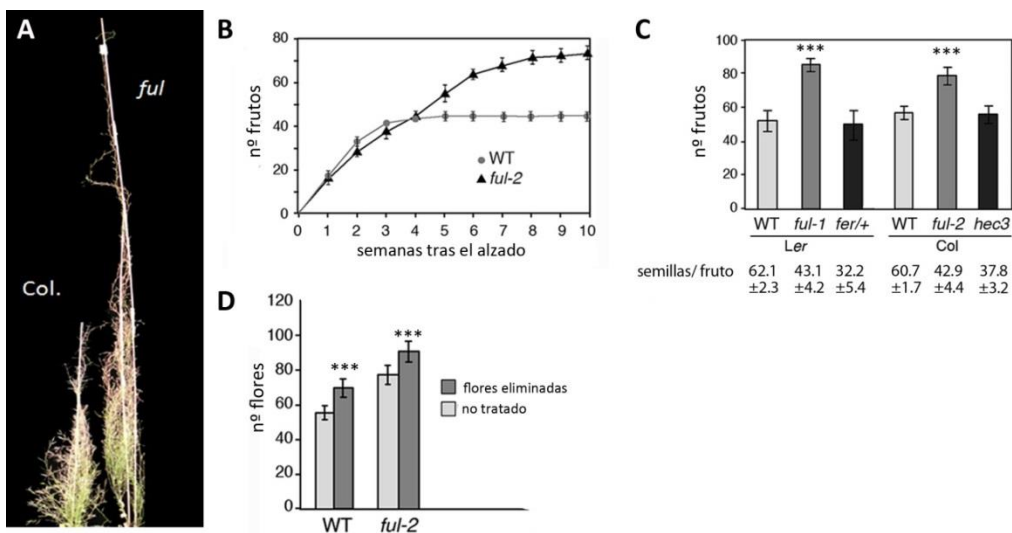
Para ayudar a desentrañar las bases moleculares del GPA, Wuest y colaboradores realizaron un estudio comparativo del transcriptoma en el SAM de Arabidopsis de plantas en crecimiento, plantas en GPA y plantas donde se había inducido la reactivación del SAM eliminando todos los frutos producidos. Mediante hibridación de micromatrices y secuenciación de RNAs analizaron el perfil de expresión génica en ápices de inflorescencias de plantas en crecimiento, plantas en GPA y plantas con meristemos parados a las 6, 24 y 48 horas de haber eliminado todos los frutos. Tras la comparación de los resultados de las diferentes muestras observaron que las inflorescencias paradas mostraban un perfil transcriptómico diferente a las inflorescencias en crecimiento, mientras que la eliminación de los frutos hacía que el perfil transcriptómico volviera a ser similar al de las inflorescencias en crecimiento. En general, la expresión de genes del ciclo celular se detectaba a bajos niveles en inflorescencias detenidas, a niveles ligeramente elevados a las 6 horas después de la eliminación de los frutos y a niveles altos a las 24 y 48 horas. En conjunto, estos resultados sugerían que el GPA conduce a un estado de latencia en la actividad mitótica más que a la senescencia de los meristemos, ya que son totalmente reversibles a meristemos en crecimiento al eliminar los frutos. Para examinar con mayor precisión la expresión en el meristemo, aislaron las células del SAM de plantas en desarrollo, plantas en GPA y plantas reactivadas a las 48 horas de haber eliminado los frutos mediante microdissección asistida por láser (LAM), y analizaron los transcriptomas correspondientes mediante RNA-seq. El análisis de los resultados del RNA-seq comparando los transcriptomas del SAM de plantas en crecimiento frente a plantas en GPA o de plantas en GPA frente a SAMs reactivados mostraba que el GPA está asociado a la acumulación en el SAM de factores propios de la respuesta a estrés y de respuesta al ácido abscísico (ABA), así como que los componentes celulares necesarios para la actividad mitótica están reprimidos, pero no aporta más evidencias sobre la naturaleza de la posible señal implicada o de sus reguladores clave (Wuest *et al.*, 2016).

Control genético

Además de la señal procedente de los frutos en desarrollo, se ha propuesto que el momento de aparición del GPA está genéticamente controlado por una ruta dependiente de la edad, ya que, por ejemplo, en los trabajos realizados en Arabidopsis, el momento en el que acaece la parada de la actividad meristemática es dependiente del ecotipo estudiado (Hensel *et al.*, 1994).

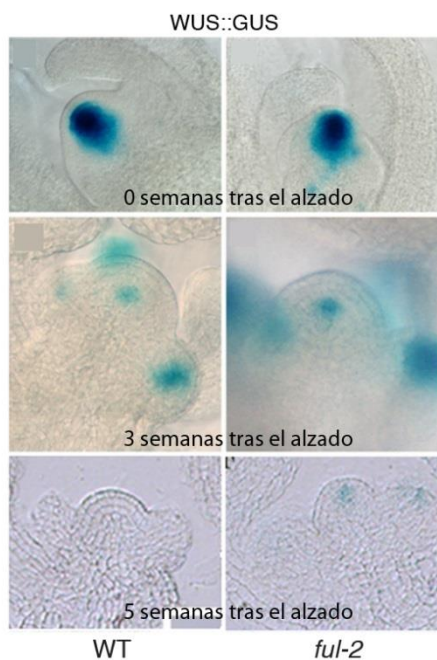
Balanzà, en su tesis doctoral, realizada en el mismo laboratorio que este trabajo, propuso una ruta genética de regulación del GPA en Arabidopsis, la ruta FUL-AP2 (Balanzà, 2011). Esta ruta estaría regulada por señales dependientes de la edad y actuaría en paralelo con factores dependientes de la producción de semillas para regular el tiempo de vida de la planta y por tanto la producción de frutos.

*FRUITFULL (FUL)*, un factor de transcripción de tipo MADS-box, además de estar implicado en el control del tiempo de floración y el desarrollo del fruto, podría estar promoviendo la parada de la actividad meristemática en estadios tardíos del desarrollo de la inflorescencia, ya que se observó que en los mutantes *ful* se retrasa la aparición del GPA (Balanzà, 2011). El retraso no es debido a una menor tasa de producción de semillas, puesto que los mutantes *ful* tan solo reducen el número de semillas producidas a un 70% respecto a las plantas silvestres, mientras que los efectos descritos de la esterilidad sobre el GPA aparecerían cuando se reduce la producción de semillas a valores del 30-40% (Hensel *et al.*, 1994). Además, otros mutantes con una tasa de producción de semillas similar a *ful*, como *hecate3 (hec3)* o *feronia (fer)*, no presentan ningún efecto en el GPA. Por otro lado, cuando a plantas silvestres y plantas mutantes *ful* se les eliminan todas las flores, se retrasa la aparición del GPA en ambas, pero en los mutantes *ful* éste sigue produciéndose más tarde que en el silvestre, lo que indica que el aumento del número de flores en el mutante *ful* está específicamente relacionada con pérdida de función de este gen y no a los defectos de fertilidad (Balanzà, 2011) (Fig. I-8).



**Figura I-8: En el mutante *ful* se retrasa el GPA.** A-B) *ful* produce muchos más frutos que el silvestre debido a que se prolonga la actividad del SAM en el tiempo. C) El retraso del GPA en el mutante *ful* no es debido a problemas de fertilidad. D) *ful* responde a la ausencia de semillas, retrasando más aun la aparición del GPA. Imagen modificada a partir de Balanzà, 2011 y Balanzà *et al.*, 2017 .

Analizando la expresión de *WUS* en el meristemo inflorescente mediante el empleo de una línea reportera *WUS::GUS*, se observó que en plantas silvestres la expresión de *WUS*, localizada en el centro organizador del SAM, disminuía con la edad de los meristemos, dejando de detectarse una vez que se producía el GPA, aunque seguía estando presente en los óvulos de las flores en desarrollo de esas plantas. En los mutantes *ful*, la expresión de *WUS* fue similar a la del silvestre en los primeros estadios de desarrollo de la inflorescencia, aunque, sin embargo, se mantuvo durante más tiempo, lo cual correlacionaba con la fase extendida de producción de flores en *ful*. Mientras que en las plantas silvestres el GPA se producía unas cuatro semanas después del alzado de la inflorescencia, momento en el cual ya no se observaba señal GUS, en las plantas mutantes *ful* de la misma edad, la actividad GUS seguía detectándose, lo cual correlacionaba bien con el hecho de que en estas plantas la actividad meristemática continuara activa y siguieran produciendo flores (Fig. I-9). Esto sugería que *FUL* controlaría el GPA a través de la represión temporal de *WUS* en el SAM. Esta regulación no parecía ser directa, puesto que mediante un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina acoplado a secuenciación (ChIP-Seq) realizado con inflorescencias de plantas *FUL::FUL::GFP* para identificar las dianas directas de *FUL*, no se detectó unión de *FUL* al promotor de *WUS* (Balanzà, 2011), lo que sugería que la regulación ejercida por *FUL* sobre la expresión de *WUS* debía estar probablemente mediada por otros factores.



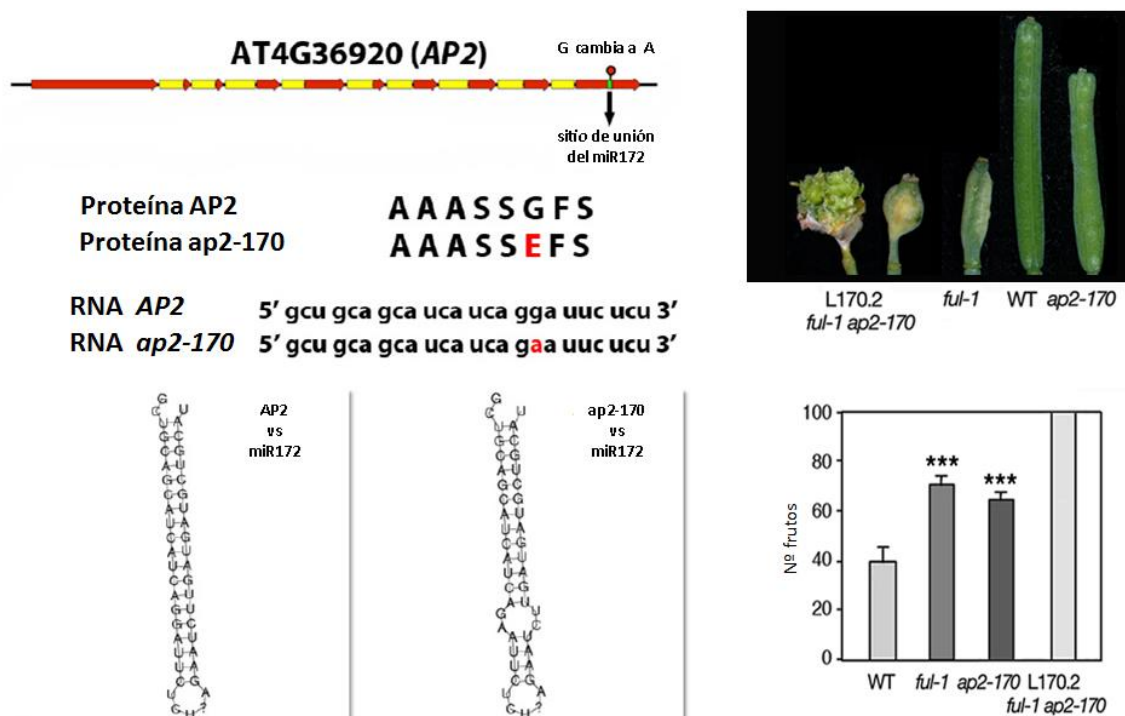
**Figura I-9: La expresión de *WUS* se mantiene durante más tiempo en el SAM del mutante *ful*.** Se muestra la expresión de una línea delatora *WUS::GUS* en plantas silvestres y mutantes *ful* al inicio de la transición floral y a las tres y cinco semanas de iniciarse el desarrollo de la inflorescencia. En el momento que se inicia el GPA en las plantas silvestres la expresión de *WUS* desaparece del SAM. La expresión de *WUS* sigue detectándose en el SAM de las plantas *ful* que han crecido durante el mismo tiempo que las silvestres. Imagen tomada de Balanzà, 2011.

APETALA2 (*AP2*) es un factor de transcripción homeótico de tipo AP2-like, que está regulado, junto al resto de miembros de esta familia, por el miR172. Además de participar en múltiples procesos del desarrollo de la planta, como la determinación de la identidad de los sépalos y pétalos, el tiempo de floración y el desarrollo de la semilla, *AP2* también se ha relacionado con el mantenimiento de la actividad meristemática (Drews *et al.*, 1991; Jofuku *et al.*, 1994; Jofuku *et al.*, 2005; Wurschum *et al.*, 2006). La identificación de una mutación dominante negativa en *AP2* que mostraba defectos en el mantenimiento del SAM, llevó a proponer que este factor de

## INTRODUCCIÓN

transcripción podría participar en el control de los niveles de *WUS* en el mismo, posiblemente a través de la regulación del ciclo de retroalimentación entre *WUS* y *CLV3*, favoreciendo la expresión de *WUS* (Wurschum *et al.*, 2006).

A partir de una mutagénesis de EMS sobre el fondo genético *ful-1* se identificó una mutación que generaba una fuerte indeterminación del meristemo floral, concretamente a partir de la zona interna del gineceo, que desarrollaba una proliferación extensa de órganos florales en su interior y afectaba fuertemente el desarrollo del fruto, así como un notable retraso en el GPA, mucho más severa que en plantas estériles. Esta mutación afectaba al gen *AP2*, en la posición +2037 (respecto al codón de inicio de la traducción) y coincidiendo con la región de reconocimiento del miR172, a la vez que generaba un cambio de base de guanina a adenina, que además producía el cambio de glicina a glutámico (G398E) en la proteína traducida. Este mutante se nombró como *ap2-170* (Fig. I-10). Cuando esta mutación se segregó del fondo genético *ful-1*, se comprobó que seguía retrasando el GPA, aunque este efecto era mucho menos marcado que en el doble mutante *ap2-170 ful-1*, y no presentaba defectos severos en el desarrollo de los frutos ni en la producción de semillas, por lo que la prolongación de la vida de la planta no dependía de problemas con la fertilidad (Fig. I-10).



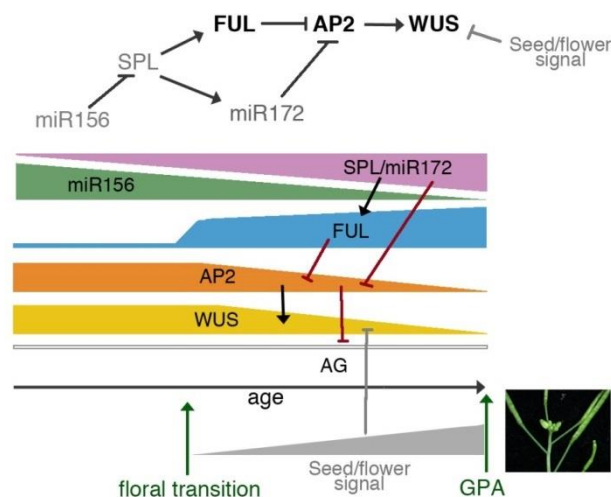
**Figura I-10: El mutante *ap2-170*.** A) El mutante *ap2-170* presenta un único cambio de base en el gen *AP2*, en la región de reconocimiento del miR172, que además introduce un cambio de aminoácido en la proteína (G a E). B) El doble mutante *ful-1 ap2-170* muestra una fuerte indeterminación en el desarrollo del fruto que no aparece en los mutantes simples *ful-1* o *ap2-170*. C) El doble mutante *ful-1 ap2-170* presenta un dramático retraso del GPA, produciendo más de 100 flores y normalmente acaba muriendo por diferentes causas antes de alcanzar el GPA, probablemente debido a que se suma la regulación genética por parte de la ruta FUL-AP2 y la regulación por parte de la fertilidad de la planta. Los mutantes simples *ful* y *ap2-170*, que no presentan defectos severos en la fertilidad también retrasan significativamente el GPA. Imagen modificada a partir de Balanzà, 2011 y Balanzà *et al.*, 2017 .



Este efecto posiblemente sea debido a que la mutación proporciona resistencia parcial a la represión por parte del miR172, permitiendo que los niveles de expresión de *AP2* se mantengan más elevados en este mutante que en el silvestre, y así, posiblemente, que la expresión de *WUS* permanezca activa durante más tiempo y retrase la parada de la actividad meristemática (Balanzà, 2011). Dado que el dramático retraso en el GPA y el fuerte fenotipo de indeterminación floral solo se observaba en fondo genético *ful*, era posible hipotetizar que *FUL* afectaba a la actividad de *AP2*. Experimentos adicionales de CHIP y CHIP-seq mostraron que *FUL* se unía a las regiones promotoras de *AP2* (Balanzà, 2011).

Tanto *FUL* como *AP2* están implicados en la ruta de la edad regulada por los miR156/miR172. *AP2* es reprimido por el miR172 y *FUL* es activado por proteínas SPLs, que son dianas del miR156. En los estadios iniciales de desarrollo los niveles del miR156 son elevados, mientras que los del miR172 son muy bajos, pero conforme avanza la edad de la planta, al menos hasta la transición floral, este balance se invierte progresivamente. La regulación entre estos microRNAs y sus dianas es compleja, ya que existen ciclos de retroalimentación entre ellos. De acuerdo con el modo de acción de esta ruta endógena de la edad los niveles de expresión de *FUL*, *AP2* y el miR172 irán cambiando paulatinamente con el paso del tiempo, sugiriendo que su efecto en el GPA pudiera depender de unos valores de expresión determinados o la proporción existente entre ellos.

Por tanto, la ruta *FUL-AP2* propone que cuando la planta está llegando al final de su ciclo aumentan los niveles de expresión del miR172 y de *FUL*, como consecuencia de la reducción del miR156 y aumento de los SPLs. El aumento de la expresión de *FUL* y del miR172 produciría la reducción de los niveles de *AP2*, y por tanto los de *WUS*, posiblemente también bajo el control de las posibles señales procedentes de las semillas en desarrollo, y, así, el cese de la actividad meristemática, apareciendo el GPA (Fig. I-11).



**Figura I-11: La Ruta FUL-AP2: un posible modelo.** Cuando la planta está llegando al final de su ciclo vital aumentan los niveles de expresión del miR172 y de *FUL* como consecuencia de la reducción del miR156 y aumento de la expresión de los SPLs. El aumento de la expresión de *FUL* y del miR172 producirá la reducción de los niveles de *AP2*, lo cual ocasionaría un descenso de los niveles de *WUS* y por tanto el cese de la actividad meristemática, apareciendo el GPA. Imagen tomada de Balanzà *et al.*, 2017 .

### **Importancia del control del GPA a nivel agronómico**

A lo largo de la historia de la humanidad, el aumento en la demanda de productos agrícolas se logró inicialmente con la domesticación de especies silvestres y posteriormente con la intensificación agrícola y la mejora genética vegetal (Meyer *et al.*, 2012). A pesar de los avances realizados y el aumento de la productividad de los cultivos, la agricultura sigue estando bajo presión. Cada vez existe una mayor demanda de productos agrícolas ocasionada por el crecimiento de la población mundial, cambios en los hábitos alimenticios y un mayor requerimiento de biomasa para la producción de energía. Por otro lado, el empleo de prácticas agrícolas intensivas que llevan a la consecución de un alto rendimiento en los cultivos tiene consecuencias ambientales negativas como la degradación de los suelos, sobreexplotación de los recursos hídricos o empobrecimiento de los ecosistemas al fomentar el monocultivo. Todo ello plantea la cuestión de cómo incrementar la producción reduciendo a su vez el impacto medioambiental (Godfray *et al.*, 2010).

Diversos trabajos han mostrado una posible relación entre la senescencia de las hojas o la planta entera y la productividad de los cultivos (Gregersen *et al.*, 2013). Se ha observado que diferentes cultivares, mutantes y líneas transgénicas con características de senescencia retardada de las hojas, presentan una mayor producción, como, por ejemplo, mutantes que presentan alteraciones en el catabolismo de la clorofila (Hortensteiner, 2006; Thomas and Smart, 1993; Thomas *et al.*, 2000).

Actualmente, la agricultura intensiva se basa en el empleo de cultivos anuales altamente productivos (Meyer *et al.*, 2012; Raun and Johnson, 1999). Conseguir prolongar la fase reproductiva en estos cultivos mediante el retraso del GPA y por tanto la senescencia de los meristemas, podría significar un considerable aumento de su productividad.



# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es obtener una mejor comprensión de las rutas genéticas que controlan el GPA en *Arabidopsis thaliana*, así como su posible aplicación para aumentar la producción en los cultivos monocárpicos.

Para ello se establecieron una serie de objetivos específicos:

- ✓ Profundizar en el estudio de la ruta FUL-AP2 de control de la parada de la actividad meristemática en *Arabidopsis thaliana* y búsqueda de nuevos genes candidatos a estar implicados en ella.
- ✓ Identificación de factores implicados en la señal de parada del SAM procedente de las semillas mediante diferentes abordajes.
- ✓ Desarrollo de aplicaciones biotecnológicas para incrementar la producción en *Arabidopsis* basados en el conocimiento adquirido sobre la ruta FUL-AP2 de control de la parada de la actividad meristemática.
- ✓ Aplicación en cultivos de importancia agronómica. Estudio de la conservación funcional de FUL en guisante (*Pisum sativum*).



# **CAPÍTULO 1:**

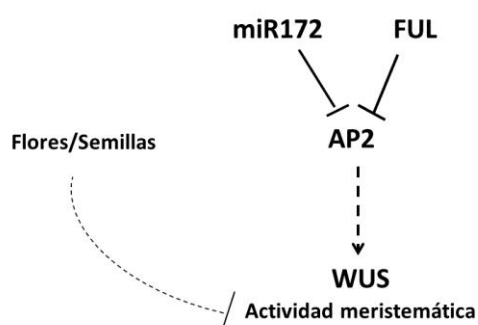
## **LA RUTA FUL-AP2 DE MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD MERISTEMÁTICA**



## Antecedentes

*ful* ha sido probablemente el primer mutante descrito en *Arabidopsis* que, sin presentar defectos severos en la fertilidad, retrasa el GPA (Balanzà, 2011), lo cual apoya la hipótesis de la existencia de un control genético del desencadenamiento de este fenómeno, relacionado o no con la señalización hormonal e independiente del posible efecto fuente-sumidero entre los órganos vegetativos y los frutos.

Como ya se ha descrito en el apartado de introducción, el estudio del papel de *FUL* en el control de la actividad meristemática, llevado a cabo por Vicente Balanzà en su trabajo de tesis doctoral, desveló su relación con *AP2* y *WUS* y llevó a proponer un modelo de control del mantenimiento meristemático mediado por una ruta genética que incluía estos factores y que denominó FUL-AP2. Se había observado que la expresión de *WUS*, cuya función es mantener las células madre del meristemo, iba disminuyendo con el desarrollo de la inflorescencia y acababa desapareciendo en plantas que habían sufrido el GPA (Balanzà, 2011; Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998). También había trabajos que indicaban que *AP2* podría estar regulando positivamente la expresión de *WUS* en el meristemo apical, participando de esta manera en el mantenimiento de los meristemos (Wurschum *et al.*, 2006). El control temporal de la acción de la ruta genética AP2-WUS podría estar mediado por *FUL* y el miR172, ambos reguladores negativos de la expresión de *AP2*. De esta manera, conforme avanza la edad de la planta, el nivel de expresión de *AP2* se vería reducido a causa de la represión creciente que ejercerían *FUL* y el miR172, cuyos niveles se van incrementando con el tiempo (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009) impidiendo de esta manera mantener la activación de *WUS* en estadios finales del desarrollo y causando finalmente el cese de la actividad meristemática y el desencadenamiento del GPA (Fig. 1-1) (Balanzà, 2011).



**Figura 1-1: La ruta FUL-AP2, modelo de control del mantenimiento meristemático:** La expresión de *WUS* en el SAM podría estar regulada, de forma directa o indirecta, por *AP2*. Conforme avanza la edad de la planta los niveles de expresión de *AP2* disminuyen a causa del aumento de expresión de dos de sus represores, *FUL* y el miR172. Simultáneamente la producción de semillas por parte de la planta desencadenaría una señal móvil que viajaría hasta el SAM donde ayudaría al apagado de *WUS*. Imagen modificada a partir de Balanzà, 2011.

Este modelo estaba sustentado en la observación de que tanto el mutante *ful* como el *ap2-170*, alelo de *AP2* parcialmente resistente a la represión del miR172, tardaban más tiempo en realizar el GPA y este retraso no se debía a problemas de fertilidad. Mientras que no se tienen datos sobre el posible mecanismo de acción de *AP2* sobre *WUS*, el modelo propone que la represión de *FUL* sobre *AP2* sería directa, ya que, entre otras evidencias, se observó que *FUL* se unía al promotor de *AP2* mediante un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Además, el modelo explicaba bien los fenotipos observados en los mutantes estudiados, ya que, al eliminar la

## CAPÍTULO 1

represión de FUL (en mutantes *ful*) o disminuir la del miR172 (en los mutantes *ap2-170*), la expresión de *AP2* se mantendría más tiempo y consecuentemente la de *WUS*, permitiendo que los meristemas también se mantuvieran activos durante más tiempo, y así las plantas mutantes continuarían generando más flores cuando las plantas silvestres ya habrían realizado el GPA.

Sin embargo, aunque respaldado por distintas evidencias, algunos aspectos del modelo no se habían validado experimentalmente. Por ejemplo, aunque se había detectado la expresión de *AP2* en el SAM inflorescente (Wurschum *et al.*, 2006), nunca se había llegado a determinar si ésta se mantenía en estadios tardíos del desarrollo de la inflorescencia. Por otro lado, datos genéticos apuntaban que la regulación de FUL sobre el mantenimiento del meristemo no era exclusivamente a través de *AP2*, ya que el doble mutante *ap2 ful* también mostraba un GPA tardío, sugiriendo que también podrían estar implicados otros factores, como por ejemplo, el resto de miembros de la familia de factores de transcripción AP2-like regulados por el miR172 (Aukerman and Sakai, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Yant *et al.*, 2010; Zumajo-Cardona and Pabón-Mora, 2016).

Por todo ello, propusimos como objetivo principal del primer capítulo de esta tesis doctoral la profundización en el estudio de la ruta FUL-AP2 de control de la parada de la actividad meristemática mediante una caracterización más detallada de la regulación de *AP2* por FUL, así como del posible papel de los factores de transcripción AP2-like en este proceso. También nos planteamos buscar otros genes implicados en la regulación del GPA a través de esta ruta o de otras rutas paralelas.

### **FUL regula la expresión de AP2 en el SAM**

Aunque disponíamos de resultados de ChIP que indicaban que FUL era capaz de unirse a las regiones promotoras del gen *AP2*, faltaban análisis de expresión que mostraran que, efectivamente, FUL regulaba la expresión de *AP2* en el SAM. Una de las herramientas que se han empleado tradicionalmente para estudios de expresión es el análisis de líneas reporteras. Por ello, nos propusimos observar el cambio de expresión de *AP2* mediante el uso de una línea reportera comparando su comportamiento en fondo silvestre, en un fondo *ful* mutante o en líneas transgénicas que portaban un alelo artificial de *FUL*, pFUL::FUL:VP16 (FUL:VP16), donde la proteína quimérica FUL:VP16 estaría expresándose en su dominio natural pero se comportaría como un activador transcripcional dominante (Balanzà, 2011; Balanzà *et al.*, 2017; Bemer *et al.*, 2017). La acción de FUL como activador transcripcional dominante en las líneas FUL:VP16 producía diferentes alteraciones en el desarrollo de la planta: un ligero adelanto de la floración; formación de hojas caulinares mucho más largas y estrechas que las generadas por la línea silvestre; menor elongación de los entrenudos, aportando un aspecto compacto a la inflorescencia; transformación del SAM, tras la generación de unas pocas flores, en un meristemo floral indeterminado, que en lugar de generar nuevas flores, inicia el desarrollo de estambres y posteriormente de estructuras carpelares con filotaxis espiral de forma indeterminada; reducción de la elongación de los frutos y ensanchamiento de la parte apical de las valvas, confiriéndole un aspecto acorazonado al fruto; y cierta indeterminación del meristemo floral que causa la formación de valvas extra en el fruto (Balanzà, 2011).



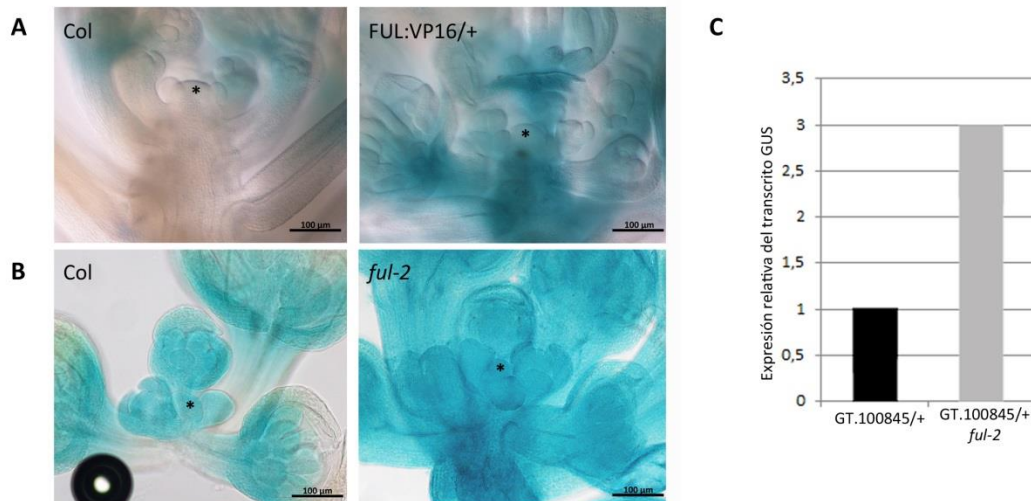
Como los niveles de mRNA de *AP2* están regulados por el miR172 y también por los propios niveles de la proteína AP2 (Aukerman and Sakai, 2003; Schmid *et al.*, 2003; Schwab *et al.*, 2005), podía ser difícil evaluar el efecto de FUL sobre el promotor de *AP2* en un contexto regulatorio tan complejo. Para minimizar este problema y conseguir visualizar cambios de expresión en *AP2* relativos a la acción de FUL sobre su promotor, empleamos una línea de la colección *gene trap* (FGT) que contiene la secuencia del marcador GUS insertada en la región 5' UTR de *AP2* (GT.100845) (Sundaresan *et al.*, 1995). En esta línea la expresión del marcador GUS está controlada por las regiones reguladoras del promotor de *AP2*, pero es independiente de la regulación postranscripcional ejercida por el miR172. Además, la inserción del elemento portador del GUS causa la inactivación del gen *AP2* y las plantas homocigóticas son mutantes nulos para este gen.

Generamos las combinaciones *ful-2* GT.100845/+ y FUL:VP16/+ GT.100845/+ para comparar la actividad GUS en estas líneas con la de las plantas GT.100845/+. En todas las líneas que generamos mantuvimos en heterocigosis el marcador GUS para evitar los fenotipos de pérdida de función de *AP2* que causa la inserción del elemento transponible. También mantuvimos la línea FUL:VP16 en heterocigosis para retrasar la transformación del SAM en un meristemo floral indeterminado, que en homocigosis se produce en estadios tempranos del desarrollo de la inflorescencia.

La actividad del marcador GUS en las plantas GT.100845/+ (Fig. 1-2 A y B) no reproducía el patrón de expresión descrito para *AP2*, un resultado esperable ya que, entre otros posibles elementos regulatorios, está ausente la regulación postranscripcional del miR172. Cuando se comparó esta actividad en los fondos mutantes analizados, se observó que la actividad GUS se incrementó en la inflorescencia cuando FUL actuaba como un activador transcripcional (FUL:VP16) (Fig. 1-2 A) o cuando FUL no estaba presente (mutante *ful*) (Fig. 1-2 B), indicando que FUL era capaz de regular la actividad del promotor de *AP2*.

Para confirmar estos resultados, cuantificamos el nivel de expresión de GUS mediante Q-RT-PCR (Fig. 1-2 C). Para este ensayo decidimos tomar muestras solo de inflorescencias silvestres e inflorescencias *ful* puesto que las FUL:VP16/+ tenían una morfología tan diferente que podía resultar artefactual. Las muestras se recogieron a las dos semanas tras el alzado de la inflorescencia, cuando ambas líneas se encontraban en la fase lineal de producción de flores, comprobándose que el nivel de expresión del gen GUS era mayor en el mutante *ful*.

Estos resultados apoyarían la hipótesis propuesta de que FUL estaría actuando como un regulador negativo de la actividad del promotor de *AP2*.



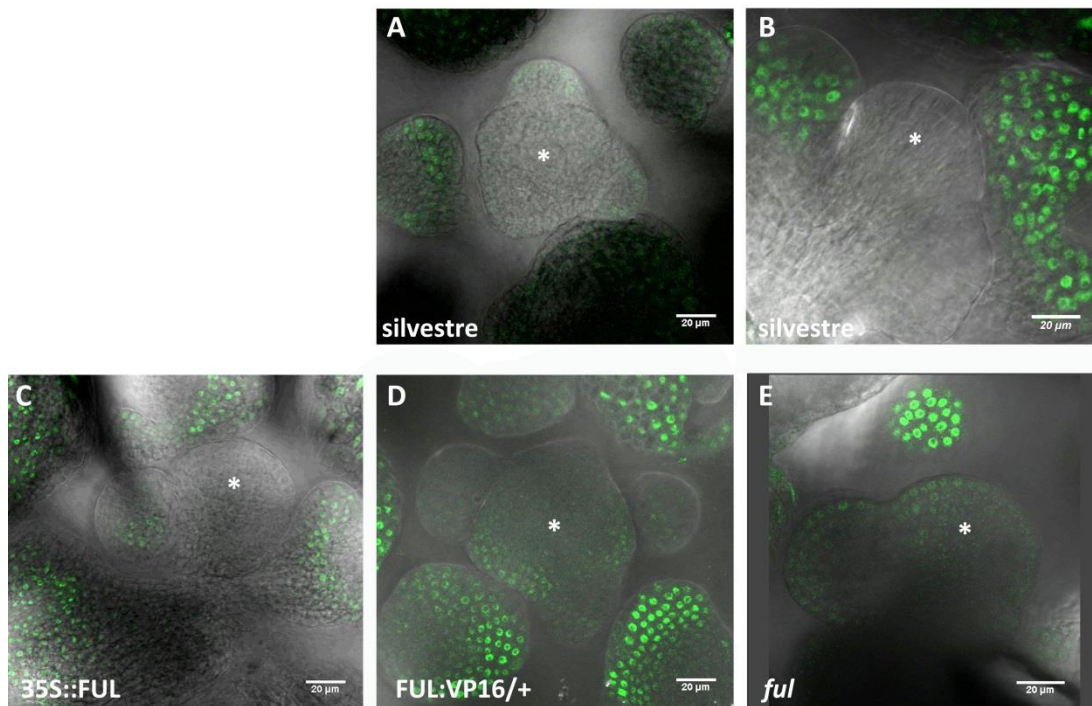
**Figura 1-2: AP2 presenta mayor nivel de expresión en ausencia de FUL o cuando FUL actúa como un activador transcripcional.** A y B) Expresión GUS de la línea de *gene trap* GT.100845/+, que contiene la inserción del gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa en la región 5' UTR del gen AP2 en heterocigosis, para evitar los defectos fenotípicos producidos por la pérdida de función de AP2 que genera la inserción del elemento transponible. En A se compara la actividad del reportero GUS en fondo Col y FUL:VP16/+ y en B se comparan el fondo Col y *ful-2*. Los experimentos reflejados en los paneles A y B se realizaron independientemente. Las muestras se recolectaron tras dos semanas del alzado de la inflorescencia. El SAM aparece marcado con \*. Barras de escala: 100  $\mu$ m. C) Cuantificación del nivel de expresión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa mediante Q-RT-PCR en ápices de plantas silvestres y mutantes *ful-2* a las 2 semanas tras el alzado de la inflorescencia. Se muestra el valor de expresión del gen  $\beta$ -glucuronidasa normalizado frente a la expresión del gen constitutivo *TIP41-like*. Los resultados mostrados corresponden a una réplica biológica.

Como ya se ha indicado, la línea reportera GT.100845 no reproduce el patrón de expresión descrito para AP2, aunque sí nos permitió determinar que FUL ejercía un efecto regulador sobre el promotor de AP2. Para estudiar si, además, FUL era importante para regular la actividad de AP2 en el SAM, decidimos emplear otra línea reportera que reprodujera más fielmente el patrón espacial de acumulación de AP2, en concreto, la línea pAP2::AP2:YFP descrita en Wollmann *et al.* (2010), que porta una fusión traduccional de dos copias de la YFP a AP2 en un vector TAC (de *Transformation-competent Artificial Chromosome*) con aproximadamente 32 kb de la secuencia genómica del gen AP2 y que complementa el fenotipo del mutante *ap2-2* (Wollmann *et al.*, 2010). Para ello, introdujimos esta línea en los fondos genéticos empleados anteriormente, *ful-1* y FUL:VP16, y, además, en la línea transgénica 35S::FUL. Esta línea expresa ectópicamente FUL, y presenta una serie de alteraciones relacionadas con los procesos biológicos en los que FUL participa como regulador transcripcional: un fuerte adelanto de la floración; en condiciones de crecimiento de día largo formación de una flor terminal tras haber producido tan solo unas pocas flores; y frutos indehiscentes (Balanzà, 2011; Balanzà *et al.*, 2014; Ferrandiz *et al.*, 2000b). Con estas combinaciones pretendíamos estudiar cual era la respuesta del marcador pAP2::AP2:YFP en el SAM en ausencia o ganancia de función de FUL o cuando se cambiaba el tipo de regulación ejercida, pasando a ser un activador transcripcional dominante.

En plantas silvestres no detectamos señal AP2:YFP en el SAM durante el desarrollo de la inflorescencia (Fig. 1-3 panel superior izquierda), ni cuando las plantas ya habían experimentado el GPA (Fig. 1-3 panel superior derecha), aunque sí en los primordios florales. Tampoco observamos señal en el SAM de las plantas 35S::FUL, que detienen la actividad meristemática

prematuramente. Sin embargo en la línea FUL:VP16/+ detectamos señal fluorescente en núcleos de algunas células del SAM, en una región anular, antes de que éste se transformara en un meristemo floral indeterminado. También detectamos la expresión de la proteína AP2 en el SAM del mutante *ful* en estadios equivalentes a los de plantas silvestres que habían alcanzado el GPA (Fig. 1-3). Por tanto, en nuestras condiciones, solo detectamos la expresión de la proteína AP2 en el SAM cuando no estaba presente la represión de FUL.

Este resultado corroboraría el papel represor de FUL sobre AP2, ya que mostraba que los niveles de AP2 en el SAM eran más altos cuando FUL no podía reprimirlo, es decir, tanto en los mutantes *ful* como en las líneas FUL:VP16.

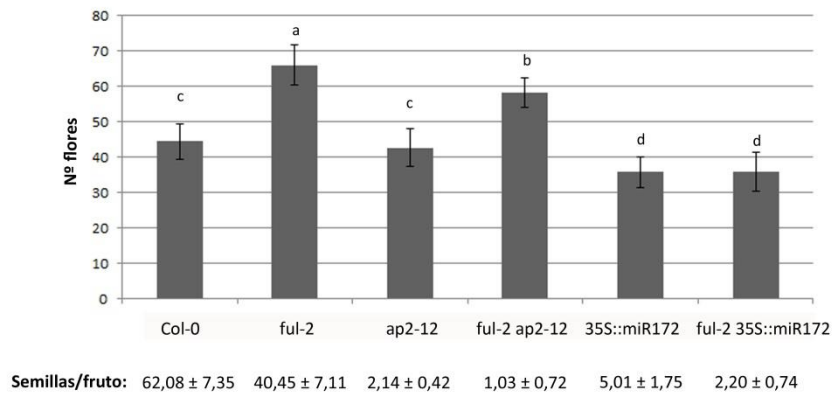


**Figura 1-3: La expresión de AP2 solo se detecta en el SAM en ausencia de FUL o cuando FUL actúa como un activador transcripcional.** Patrón de expresión de pAP2::AP2:YFP (señal YFP en verde) en ápices de plantas: A) silvestres ecotipo *Ler* aproximadamente tres semanas tras el alzado de la inflorescencia, y B) en GPA, cuatro semanas tras el alzado de la inflorescencia; C) 35S::FUL, aproximadamente a las dos semanas tras el alzado de la inflorescencia, antes de formar la flor terminal; D) FUL:VP16/+ y E) *ful-1* a las cuatro semanas tras el alzado de la inflorescencia. El SAM aparece marcado con \*. Barras de escala: 20 µm.

Aunque los resultados con las líneas reporteras mostraban que la expresión de AP2 en el SAM estaba controlada por la presencia de FUL, el control del mantenimiento meristemático mediante la ruta FUL-AP2 no debía depender únicamente de estos factores, puesto que la mutación *ap2* no suprimía por completo el GPA tardío provocado por la mutación *ful*, generando las plantas *ful ap2* un número intermedio de flores en la inflorescencia principal entre los de las plantas *ap2-12* y *ful* (Figura 1-4 C). Esto llevó a proponer que la expresión de *WUS* en el SAM no solo estaría regulada por AP2, sino que posiblemente también estarían participando el resto de miembros de la familia de factores de transcripción AP2 regulados por el miR172: TOE1, TOE2, TOE3, SMZ y SNZ

(Balanzà, 2011). Esta hipótesis se vio reforzada cuando se comprobaron los resultados de un experimento de ChIP-seq en plantas *pFUL::FUL:GFP* que mostraban que FUL se unía a las regiones reguladoras de *AP2*, *TOE1*, *TOE3* y *SNZ* (GEO accession number GSE79554) (Bemer *et al.*, 2017).

Si esta hipótesis fuera correcta, cabría esperar que las mutaciones en otros genes pertenecientes a esta subfamilia también tuvieran efecto sobre el GPA. Por ello, nos propusimos estudiar el fenotipo presentado por plantas *35S::miR172a* (Werner *et al.*, 2010; Yant *et al.*, 2010), que al sobreexpresar el mRNA del miR172 produce una reducción de los niveles de expresión de todos los miembros de la familia AP2 mencionados, generando un fenotipo similar al observado en el séxtuple mutante *ap2 smz snz toe1 toe2 toe3* (a partir de ahora denominado como *ap2-like*) (Fig. 1-4 A). Tras generar la línea *ful-2 35S::miR172* realizamos la caracterización fenotípica del momento de aparición del GPA, a través del recuento del número de flores producidas en la inflorescencia principal (Figura 1-4 B).



**Figura 1-4: FUL controla el GPA a través de la represión de la familia de factores de transcripción AP2. A)** La línea *35S::miR172* presenta fenotipos similares a los mostrados por el séxtuple mutante *ap2-like*. **B)** Número de flores producidas en la inflorescencia principal. *ap2-12* no es epistático sobre *ful-2* en cuanto al número de flores producidas antes del GPA, mientras que reduciendo los niveles de todos los genes *ap2-like* con la línea *35S::miR172*, la presencia o ausencia de FUL no altera el momento en el que se produce el GPA, y tanto *35S::miR172* como *ful-2 35S::miR172* producen el mismo número de flores. Se muestra la media ± SD (n= 10). Las columnas con la misma letra no muestran diferencias significativas con  $p \leq 0.05$ , test LSD. En la parte inferior de la gráfica se muestra la media ± SD de semillas/fruto en diez frutos de cinco plantas. Las plantas *35S::miR172* y *ful-2 35S::miR172* son casi estériles, al igual que *ap2-12* y *ful-2 ap2-12*; sin embargo, a pesar de su esterilidad, realizan el GPA antes que plantas fértiles silvestres.

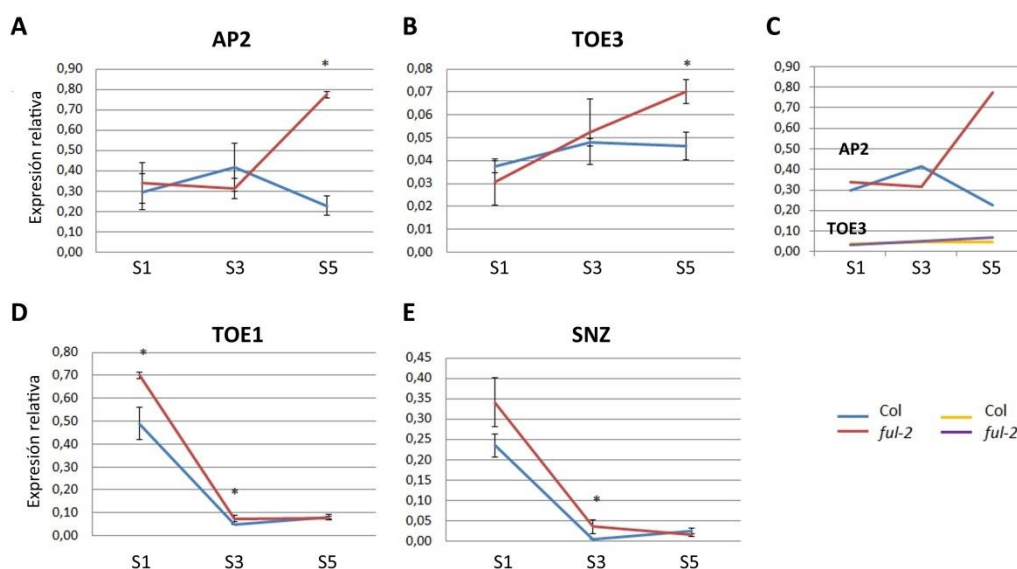
En las plantas *ap2* y *35S::miR172*, que presentaban esterilidad parcial al producir un número de semillas muy reducido en comparación al silvestre (Fig. 1-4 B parte inferior), el SAM se determinó en la estructura terminal de carácter carpelar típica de mutantes estériles (Fig. 1-6C y D). Sin embargo, la formación de la flor terminal en estas líneas ocurrió tras la formación de un número de flores similar o inferior al número de flores producidas por Col antes de alcanzar el GPA (Col: 44±5 flores, *ap2-12*: 42±5 flores y *35S::miR172*: 35±4 flores). Hensel y colaboradores (1994), tras analizar numerosos mutantes estériles, propusieron un umbral de entre 30 y 40% de producción de semillas a partir del cual el efecto de la esterilidad se veía reflejado en el retraso de la parada de la actividad meristemática. Los mutantes *ap2* o las líneas *35S::miR172* presentaban una tasa de producción de semillas muy inferior a ese umbral (Fig. 1-4 B) y sin embargo el GPA no

se retrasaba. Estos datos apoyaban la hipótesis de que el resto de factores AP2s-like podrían estar contribuyendo también al control temporal del GPA.

Por otro lado las líneas *ful-2* 35S::miR172 y 35S::miR172 produjeron un número similar de flores en la inflorescencia principal. Por tanto, la inactivación de todos los genes *AP2-like* conseguía suprimir el retraso del GPA causado por la mutación *ful* (Fig. 1-4B). Este resultado apoyaría la hipótesis propuesta de que FUL podría estar promoviendo el cese de la actividad meristemática en el SAM mediante la represión de miembros de la familia de factores de transcripción tipo AP2, probablemente a través de la regulación de *WUS*.

Sin embargo, quedaba por comprobar si todos los factores de transcripción AP2-like, o al menos los que hasta el momento se conocía que eran regulados por FUL, participaban de igual forma en el control del mantenimiento meristemático o si alguno de ellos ejercía un papel más preponderante que el resto.

Para tratar de responder a estas cuestiones nos propusimos estudiar el cambio de expresión a lo largo del desarrollo de la planta de los genes *AP2-like* regulados transcripcionalmente por FUL. Recogimos ápices de plantas silvestres y mutantes *ful*, a los que eliminamos manualmente en la medida de lo posible las yemas florales, en tres momentos diferentes del desarrollo (semana 1: desarrollo vegetativo; semana 3: desarrollo de la inflorescencia; semana 5: GPA en las plantas silvestres) y cuantificamos el nivel de expresión de *AP2*, *TOE1*, *TOE3* y *SNZ*, los genes para los que se detectaba unión de FUL a sus promotores, mediante Q-RT-PCR (Fig. 1-5).



**Figura 1-5: Serie temporal de expresión de los factores de transcripción de tipo AP2 regulados por FUL.** Las plantas fueron germinadas y mantenidas durante los primeros 20 días de desarrollo bajo condiciones de día corto, para igualar los estadios de desarrollo de todas las plantas de ambos genotipos, y posteriormente se transfirieron a condiciones de día largo, donde se comenzó a tomar muestras una, tres y cinco semanas después del cambio de condiciones de crecimiento. Los momentos de recogida de muestras equivalen a diferentes estadios de desarrollo de la planta: vegetativo (S1), desarrollo de la inflorescencia (S3) y GPA en plantas silvestres (S5). Se muestra el nivel de expresión de cada gen normalizado frente al nivel de expresión del gen constitutivo *TIP41-like* de tres réplicas biológicas pertenecientes a experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la SD de la media. \* diferencias significativas entre Col y *ful* con  $p \leq 0,05$  (test T-Student).

Se observó que, a lo largo del desarrollo de la planta, desde estadios vegetativos hasta que las plantas silvestres habían realizado el GPA, el nivel de expresión de los diferentes genes *AP2-like* fue variando. Según los resultados obtenidos tanto en las plantas silvestres como en los mutantes *ful*, *AP2* y *TOE1* fueron los genes que mayor nivel de expresión mostraron a lo largo del tiempo (Fig. 1-5 A y D), seguidos por *SNZ* (Fig. 1-5 E), mientras que el nivel de expresión de *TOE3* (Fig. 1-5 B) era mucho menor, en comparación con los genes anteriores (Fig. 1-5B). En cuanto a su evolución temporal, *AP2* y *TOE3* presentaban la misma tendencia. En plantas silvestres, sus niveles de expresión no diferían notablemente entre los tres estadios estudiados, mientras que en mutantes *ful*, los niveles a semana 1 y 3 eran similares a los de las plantas silvestres pero en semana 5 su nivel de expresión aumentaba significativamente (Figura 1-7 C). Para *TOE1* y *SNZ* la tendencia que obtuvimos fue distinta. Para ambos genotipos, en estadios iniciales del desarrollo de la planta el nivel de expresión era elevado, mientras que en estadios posteriores la expresión de *TOE1* y *SNZ* se reducía drásticamente. Solo observamos diferencias significativas entre ambos genotipos durante el desarrollo vegetativo, donde la expresión de *TOE1* en el mutante *ful* era mayor que en las plantas silvestres, y a semana 3, donde ambos genes se expresaban más en el mutante *ful* que en el silvestre, aunque las diferencias no eran muy elevadas. Estos resultados sugerían que *FUL* estaría regulando únicamente a *AP2* y *TOE3* en el SAM en estadios tardíos de su desarrollo y que serían estos dos genes los que jugaran un papel principal en el control del GPA. Sin embargo, las muestras utilizadas en estos experimentos, aunque diseccionadas para eliminar en la medida de lo posible tejidos distintos al SAM, incluyen una cierta cantidad de meristemas florales que podrían estar enmascarando los resultados de las cuantificaciones.

Por ello, sería necesario estudiar la expresión de los genes *AP2-like* tan solo en el meristemo apical, por ejemplo utilizando métodos de microdissección más precisos. Por otro lado, también sería de interés contar con estudios genéticos que mostraran el efecto fenotípico sobre el GPA de la ausencia de los diferentes factores *AP2-like* en presencia y ausencia de *FUL*. Para ello generamos combinaciones múltiples de mutantes dobles, triples y cuádruples entre los diferentes mutantes *ap2-like* y *ful*, que en futuros trabajos serán caracterizadas fenotípicamente para evaluar el momento de aparición del GPA. El estudio de estas líneas nos permitirá comprobar qué combinación de mutantes consigue revertir el retraso de GPA observado en los mutantes *ful*, si todos los *AP2-like* contribuyen a esta función, o por el contrario tan solo algunos de ellos participan en el control del proceso.

### **Regulación del mantenimiento de la indeterminación del SAM**

El SAM de *Arabidopsis* presenta un crecimiento indeterminado hasta que cesa la actividad meristemática y los primordios florales en formación detienen su desarrollo (Fig. 1-6 A). Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, se ha descrito que en mutantes con problemas de fertilidad (tasa de producción de semillas inferior al 30-40%) o en plantas silvestres a las que se les eliminan las flores, el SAM se determina con la formación de una estructura terminal de carácter carpelar (Hensel *et al.*, 1994), como ocurre por ejemplo en el mutante *ap2-12* (Fig. 1-6 C). En su tesis doctoral, V. Balanzà (Balanzà, 2011) comprobó que la formación de la flor terminal se correlacionaba con la expresión ectópica de *AG* en el SAM. Empleando una



línea reportera *AG::GUS* (Busch *et al.*, 1999), se observó que *AG* no se expresaba en el SAM de plantas silvestres, mientras que cuando se eliminaban todas las flores de la planta a medida que se iban generando, el GPA no llegaba a producirse y el desarrollo de flores cesaba cuando *AG* empezaba a detectarse el SAM, que finalmente formaba una flor terminal. Además, describió que en los mutantes *ful* a los que se les impedía la formación de semillas mediante la eliminación de las flores no se formaba la flor terminal típica de los mutantes estériles, sino un GPA tardío, y que, además, en el doble mutante *ful ap2*, solo ocasionalmente se formaba la flor terminal observada en los mutantes *ap2* (Fig. 1-6 F y G) (Balanzà, 2011). Por otro lado, durante la caracterización fenotípica de las líneas *35S::miR172* y *35S::miR172 ful* descrita en el apartado anterior, observamos unos fenotipos similares en cuanto al modo de terminación del crecimiento de la inflorescencia. La línea *35S::miR172*, con defectos severos en la fertilidad, producía la flor terminal típica de los mutantes estériles (Fig. 1-6 D) mientras que las líneas *35S::miR172 ful* se observó que solo en algunas ocasiones se producía la formación de la flor terminal (Fig. 1-6 H e I), al igual que ocurría en el doble mutante *ful ap2*.

Estas observaciones sugerían que *FUL* y los genes *AP2-like* podrían estar participando de forma conjunta no solo en el control del GPA, sino también en la regulación del mantenimiento de la indeterminación del SAM de *Arabidopsis*. Puesto que se ha descrito que tanto *AP2* como *FUL* son reguladores de *AG* (Balanzà, 2011; Drews *et al.*, 1991), también sugerían que podrían ejercer este papel mediante el control de la expresión de *AG* en el SAM.



**Figura 1-6: Tipos de parada meristemática observados en los mutantes caracterizados.** A) Col, B) *ful-2*, C) *ap2-12*, D) *35S::MIR172*, E) *ful-2 ap2-12* con GPA (se muestra una ampliación del ápice donde se aprecia el SAM), F) *ful-2 ap2-12* con flor terminal, G) *35S::MIR172 ful-2* con GPA y H) *35S::MIR172 ful-2* con flor terminal. Barras de escala: 2 mm.

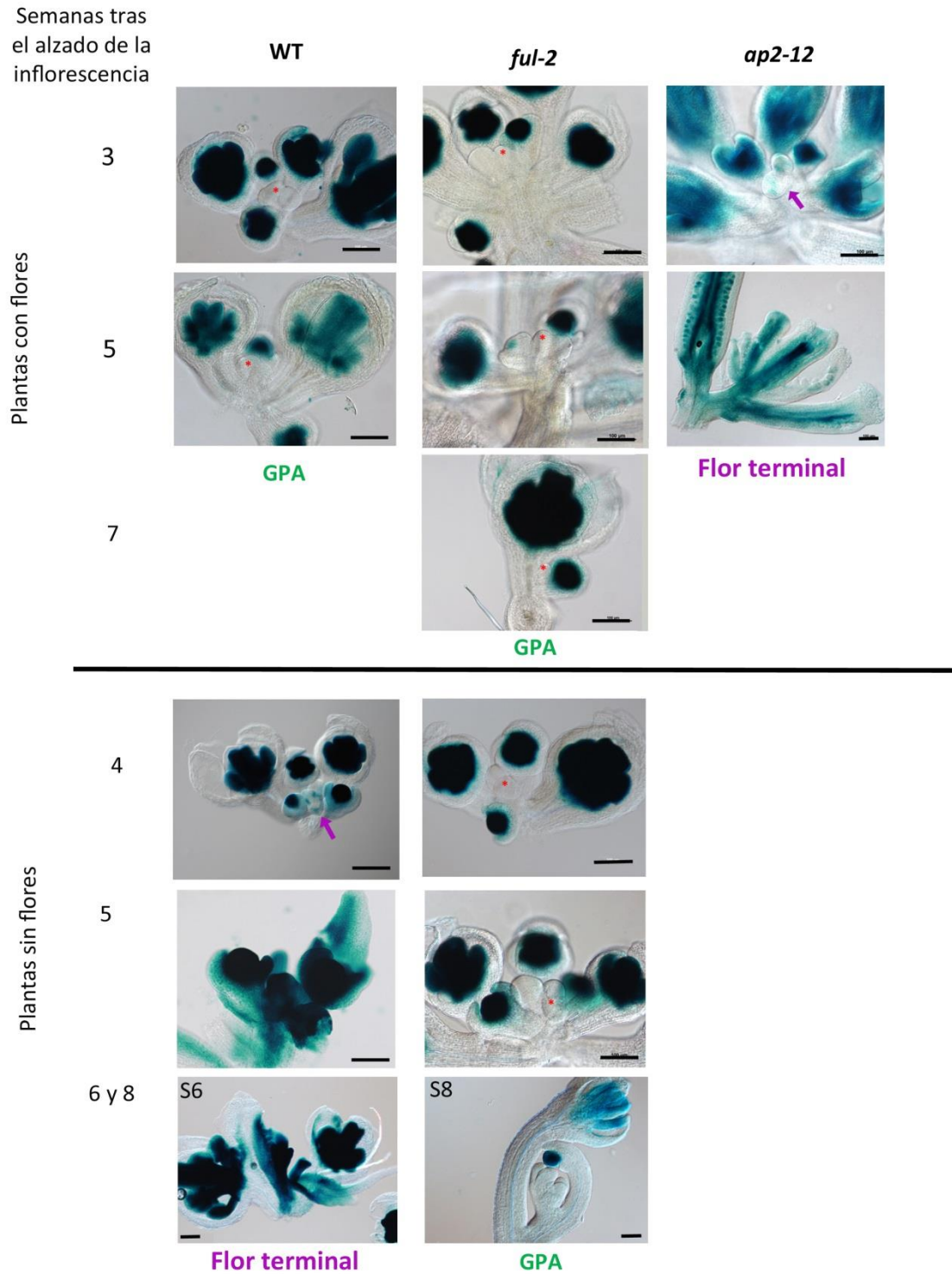
Para profundizar en el estudio de cómo se produce la expresión ectópica de *AG* en el SAM y de qué manera *FUL* y *AP2* podrían estar participando en su regulación, estudiamos la expresión de *AG* a lo largo del tiempo en diferentes fondos genéticos relevantes. Para ello comparamos el patrón de expresión de la línea delatora *AG::GUS* en fondo silvestre y en los fondos mutantes *ful* (*ful AG::GUS*) y *ap2* (*ap2 AG::GUS*), así como en plantas silvestres y plantas *ful* a las que les habíamos eliminado todas las flores y coflorescencias a medida que se iban formando, para simular el efecto de la esterilidad en estos fondos genéticos (Fig. 1-7). Las plantas silvestres no mostraron expresión de *AG* en el SAM en ningún momento durante el desarrollo de la inflorescencia, pero en plantas a las que se les eliminaron las flores, la actividad *GUS* empezó a detectarse en la periferia del SAM, posteriormente ocupando todo el domo del meristemo hasta que finalmente se formaba la flor terminal. En las plantas *ap2*, con defectos severos de la fertilidad, observamos el mismo patrón que en las plantas silvestres en las que se eliminaron las flores, aunque el momento de la formación de la flor terminal fue más prematuro. Sin embargo, en el mutante *ful* no se detectó la presencia de *AG* en el SAM en ninguna de las condiciones testadas (con o sin flores/semillas) (Fig. 1-7). Los resultados obtenidos indicaban que la formación de la flor terminal en el SAM de plantas estériles estaba correlacionada con la expresión ectópica en el mismo de *AG*. Así mismo, todo ello sugería que *AP2* podía ser un represor de *AG* en el SAM, al igual que lo es en las flores (Bowman *et al.*, 1991; Drews *et al.*, 1991), mientras que *FUL* podría ser necesario para la activación de *AG* en el SAM en estadios tardíos, ya que, en mutantes *ful*, incluso en condiciones de esterilidad inducida, esta activación no se producía.

### **La sobreexpresión de *AP2* en el SAM es capaz de revertir el GPA**

En *Arabidopsis*, cuando cesa la actividad meristemática en el SAM de todas las inflorescencias, produciéndose el GPA, el meristemo no degenera inmediatamente, sino que pasa a un estado quiescente, desde el cual puede volver a activarse y generar nuevas estructuras (Hensel *et al.*, 1994; Wuest *et al.*, 2016). Se ha descrito que las plantas silvestres son capaces de revertir el GPA en determinadas ocasiones, como, por ejemplo, cuando se eliminan manualmente las flores y los frutos una vez que el GPA ya se ha producido (Wuest *et al.*, 2016). En ocasiones, la reversión también puede ser espontánea, y ya Hensel y colaboradores (1994) describieron que, en sus condiciones de crecimiento, sin aplicar ningún tipo de tratamiento, tras dos semanas después de haberse dado el GPA, el 10-30% de las plantas volvían a producir nuevas yemas florales.

Según el modelo que habíamos propuesto, *AP2* sería capaz de mantener la actividad meristemática del SAM evitando que se produjera el GPA; la expresión de *AP2* en el SAM a lo largo del desarrollo de la inflorescencia iría disminuyendo, y con ella la de *WUS*, hasta la parada de la proliferación del meristemo. Aunque el modelo no asume que si se incrementaran los niveles de *AP2* en plantas que han experimentado el GPA se produzca una reactivación de la actividad meristemática, sí podría esperarse que los niveles de *AP2* estuvieran implicados en este fenómeno.





**Figura 1-7: AG se expresa ectópicamente en el SAM antes de formarse la flor terminal.** Se muestra la expresión temporal de AG en plantas silvestres, *ful-2* y *ap2-12*. En la parte superior de la figura aparecen plantas con flores y en la parte inferior plantas a las que se les ha eliminado todas las flores a medida que se iban formando. Los números indican semanas tras el alzado de la inflorescencia. Las flechas moradas marcan la expresión ectópica de AG en el SAM, mientras que los asteriscos rojos (\*) marcan la posición del SAM. Barras de escala: 100 µm.

## CAPÍTULO 1

Para estudiar esta posibilidad nos propusimos utilizar un sistema de expresión inducible que nos permitiera sobreexpresar controladamente a AP2 en distintos momentos del desarrollo de la inflorescencia y así comprobar el efecto de esta inducción en la actividad de los meristemas.

Generamos las construcciones pOpON:AP2<sup>170</sup> y pOpON:AP2m3, que contenían una unidad transcripcional compuesta por el factor de transcripción quimérico LhGR, cuya translocación al núcleo es inducible por dexametasona, bajo el control del promotor constitutivo 35S del CaMV y otra unidad transcripcional doble compuesta por el dominio de unión del factor de transcripción LhGR, pOp6, unido a dos secuencias mínimas del promotor 35S que dirigen la expresión de AP2<sup>170</sup> o AP2m3 (alelos parcial o totalmente resistentes a la represión del miR172) y la expresión del gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa (Fig. 1-8). En estas líneas transgénicas el factor de transcripción LhGR se estaría expresando de forma constitutiva, pero interactuaría con complejos citosólicos que contienen proteínas de choque térmico 90 (HSP90) impidiendo su translocación al núcleo celular. Tras el tratamiento con dexametasona, la interacción LhGR-HSP90 se disociaría, permitiendo que el factor de transcripción LhGR entrara al núcleo donde se uniría al promotor pOp6, activando de esta forma la expresión del gen de interés y del gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa (Craft *et al.*, 2005). Elegimos los alelos AP2<sup>170</sup> y AP2m3 para evitar la degradación de los transcritos correspondientes mediada por el miR172.



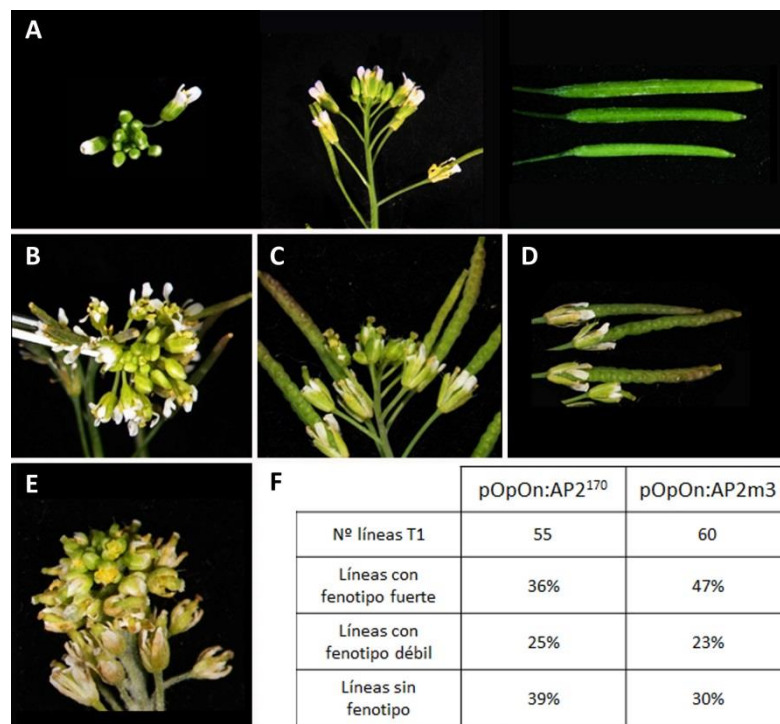
**Figura 1-8: Esquema de las construcciones pOpON:AP2<sup>170</sup> y pOpON:AP2m3.** Esta construcción contiene una unidad transcripcional compuesta por el factor de transcripción quimérico LhGR, cuya translocación al núcleo es inducible por dexametasona, bajo control del promotor constitutivo 35S del CaMV y otra unidad transcripcional doble compuesta por el dominio de unión al factor de transcripción LhGR, pOp6, unido a dos secuencias mínimas del promotor 35S que dirigen la expresión de AP2<sup>170</sup> ó AP2m3 y la expresión del gen marcador  $\beta$ -glucuronidasa. Imagen modificada a partir de Goh *et al.*, 2012 .

Para ambas construcciones seleccionamos al menos 50 líneas T1 independientes. Para comprobar que los tratamientos con dexametasona inducían los genes controlados por las secuencias pOp6 y descartar aquellas líneas transgénicas que no tuvieran el comportamiento esperado, se impregnó una hoja de roseta de cada planta T1 con dexametasona, a la que posteriormente se le realizó la detección histoquímica de la actividad GUS. El 96% de las líneas pOpON:AP2m3 y el 85% de las líneas pOpON:AP2<sup>170</sup> presentaron señal GUS, indicando la eficacia del sistema inducible empleado.

Adicionalmente, para comprobar que también se estaban expresando correctamente los alelos AP2<sup>170</sup> ó AP2m3 en dichas líneas, aplicamos el tratamiento con dexametasona en las inflorescencias laterales de las plantas T1 para las que se había detectado señal GUS en el experimento anterior. Realizamos dos tratamientos con una separación de cinco días entre ambos y observamos el efecto sobre el desarrollo de las inflorescencias una semana después del último tratamiento. Los efectos fenotípicos observados fueron similares para las plantas transformadas con cualquiera de las dos construcciones. En general, la inducción producía inflorescencias más

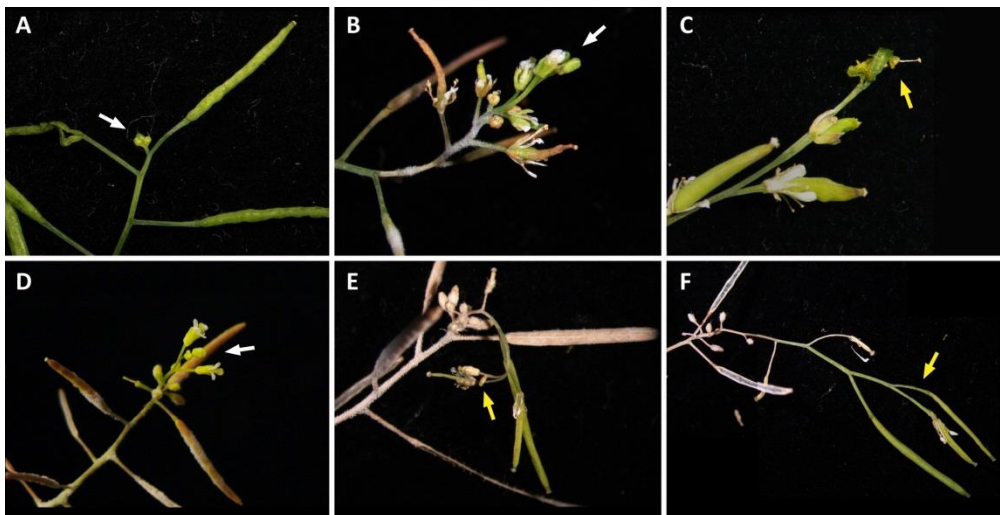
grandes, con mayor número de yemas florales; flores donde los órganos florales no senescían incluso cuando estaba finalizando el desarrollo del fruto; frutos con valvas de superficie irregular; o flores indeterminadas similares a las de las líneas 35S::AP2m3(Chen, 2004) (Fig. 1-9). Sin embargo, la severidad de dichos fenotipos variaba entre las diferentes líneas. Clasificamos las líneas T1 pOpON:AP2<sup>170</sup> y pOpON:AP2m3 en tres grupos según la severidad de las alteraciones fenotípicas observadas: sin alteraciones, fenotipo débil y fenotipo fuerte. El 36% de las líneas pOpON:AP2<sup>170</sup> presentaron fenotipos fuertes, el 25% fenotipos débiles y el 39% no presentaron alteraciones evidentes, mientras que el 47% de las líneas pOpON:AP2m3 presentaron fenotipos fuertes, 23% fenotipos débiles y 30% no mostraron alteraciones.

Según los resultados obtenidos, aunque ambos tipos de líneas transgénicas generaban el mismo tipo de alteraciones morfológicas tras la inducción de la sobreexpresión de AP2, con pOpON:AP2m3 conseguimos mayor número de líneas con defectos fenotípicos fuertes.



**Figura 1-9: Fenotipos observados en las plantas pOpON:AP2<sup>170</sup> y pOpON:AP2m3 tras tratar las inflorescencias laterales con dexametasona.** A) Col. B-E) pOpON:AP2<sup>170</sup> y pOpON:AP2m3: B) Inflorescencias con mayor número de flores en antesis, C) órganos florales que no senescen, D) Desarrollo irregular de la superficie de las valvas del fruto, E) flores similares a las de la línea 35S::AP2m3. F) Agrupación de las líneas transgénicas en función de la severidad de los defectos en el desarrollo de la inflorescencia y los frutos indicados previamente. Se indica el porcentaje de líneas con defectos severos (fenotipo fuerte), con ligeros defectos (fenotipo débil) o sin alteraciones.

Como estudio preliminar del efecto de la sobreexpresión de *AP2* sobre la reactivación del SAM, decidimos inducir la expresión del transgén en la inflorescencia principal de cada una de las líneas T1 para observar si se producía algún cambio en el GPA. Para ello dividimos las líneas T1 pOpON:*AP2*<sup>170</sup> y pOpON:*AP2m3* en dos grupos, independientemente de la severidad del fenotipo que habían mostrado en las inflorescencias secundarias. Uno de los grupos fue tratado con dexametasona para inducir la expresión del transgén y el otro grupo fue tratado con una solución control. Comenzamos a aplicar el tratamiento en las inflorescencias principales a las 4 semanas tras el alzado de la inflorescencia, momento en el cual, en nuestras condiciones, las plantas estaban llegando al final de su ciclo reproductivo y debían estar desarrollando el GPA, repitiendo el tratamiento siete días después. Tras una semana de la aplicación del último tratamiento observamos los efectos causados sobre el desarrollo de los ápices del tallo principal. Todas las plantas mostraban un cierto número de yemas florales que no habían completado su desarrollo y que se mostraban agrupadas sin apenas elongación entre sus entrenudos, con la apariencia típica de la parte apical de las inflorescencias en GPA. Ninguna de las plantas tratadas con la solución control presentaba indicios de actividad en el SAM (Fig. 1-10 A), mientras que varias de las líneas inducidas mostraban una reversión de la parada meristemática y volvieron a generar nuevas yemas florales que continuaron su desarrollo, independientemente del transgén (*AP2*<sup>170</sup> ó *AP2m3*) que portaban (Fig. 1-10 B-F). Estos resultados indicaban que la inducción de *AP2* era suficiente para producir la reactivación de la actividad meristemática incluso después de que las plantas hubieran experimentado el GPA y proporcionaba evidencias adicionales sobre el papel de *AP2* sobre el control del proceso.



**Figura 1-10: La sobreexpresión de *AP2* es capaz de revertir el GPA.** A) Plantas T1 control en GPA, donde no se ha inducido la expresión del transgén (tratadas con mock). B-F) Plantas T1 que han revertido el estado de GPA tras inducir la expresión de *AP2m3* (B y C) ó *AP2*<sup>170</sup> (D-F) con el tratamiento de dexametasona en el ápice del tallo principal. Las flechas blancas indican meristemos indeterminados y las flechas amarillas meristemos apicales determinados en una flor terminal.

## **Búsqueda de nuevos genes implicados en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática**

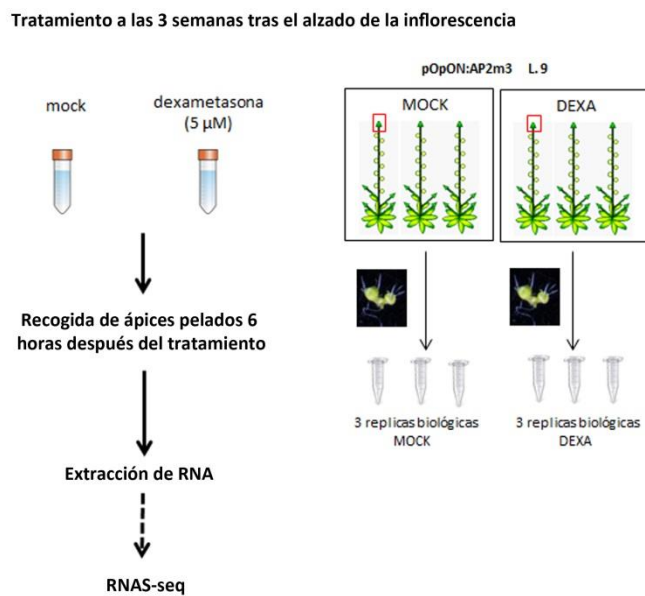
Con el objetivo de ampliar el conocimiento sobre las rutas genéticas que controlan la parada de la actividad meristemática en el meristemo apical del tallo, nos propusimos buscar otros genes que pudieran estar implicados en estos procesos. Para ello seguimos varias estrategias, como la búsqueda de interactores de AP2, la identificación de dianas moleculares de AP2 en el SAM, o el estudio de otros genes candidatos descritos en la bibliografía con una posible función de regulación meristemática.

### **Identificación de dianas moleculares de AP2 en el SAM**

Nuestro trabajo previo sugería que AP2 estaba involucrado en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática y su inducción era capaz de revertir el estado quiescente del SAM cuando la planta había realizado el GPA. La identificación de dianas moleculares de AP2 nos podría aportar más información sobre el control del mantenimiento meristemático y nos permitiría añadir nuevos elementos a la red genética regulatoria que proponemos. Con este fin, nos propusimos estudiar el efecto sobre el transcriptoma de la inducción de AP2 en inflorescencias próximas a desarrollar el GPA mediante RNA-seq, empleando las líneas de expresión inducible pOpON:AP2m3 que habíamos generado anteriormente.

De todas las líneas pOpON:AP2m3 disponibles, para realizar estos experimentos, seleccionamos la línea 9. Esta línea mostraba una única inserción del T-DNA, presentaba una buena expresión GUS y una respuesta fenotípica fuerte a la inducción del alelo AP2m3. Por ello procedimos a la selección de plantas homocigóticas en la generación T2 de las que recogimos semillas para realizar el experimento.

El procedimiento seguido para la inducción de la expresión del AP2m3, la recolección de las muestras y la realización del RNA-seq se muestra en la figura 1-11 y en el apartado de materiales y métodos. Brevemente, dejamos crecer las plantas T3 homocigóticas hasta que habían transcurrido tres semanas tras el alzado de la inflorescencia, aproximadamente una semana antes de que se desencadene el GPA, cuando las plantas han comenzado a disminuir notablemente el ritmo de producción de flores (Fig. I-8) y realizamos la inducción de la expresión de AP2m3 mediante la aplicación de un tratamiento con dexametasona 5  $\mu$ M (*DEXA*) o un tratamiento control (*MOCK*). A las seis horas del tratamiento *DEXA/MOCK* recogimos los ápices de las inflorescencias a los que se les había eliminado el mayor número posible de yemas florales, hasta obtener tres replicas biológicas del tratamiento *MOCK* y otras tres réplicas del tratamiento *DEXA*, de las que se extrajo el RNA.



**Figura 1-11: Esquema de trabajo en el experimento de RNA-seq.**

Se trataron plantas homocigóticas de la línea 9 pOpON:AP2m3 con una solución de dexametasona 5 µM y una solución control. A las seis horas del tratamiento se recogieron ápices pelados en nitrógeno líquido, eliminando el mayor número posible de yemas florales, hasta tener el suficiente material para contar con tres réplicas biológicas *mock* y tres réplicas biológicas *dexa*. Posteriormente se realizó la extracción del RNA, análisis de la calidad del RNA, síntesis de la genoteca de cDNAs, secuenciación y análisis de los resultados.

Posteriormente se realizó una secuenciación masiva de extremos sencillos (100 pb) mediante la plataforma Illumina. En el apartado de materiales y métodos se describe el procedimiento seguido para la obtención de las librerías de cDNA y la secuenciación de las muestras. Las secuencias obtenidas fueron preprocesadas y analizadas por el Servicio de Bioinformática del IBMCP utilizando los métodos y software indicado a continuación.

Para el preprocesado de las secuencias (eliminación de adaptadores y extremos de baja calidad) se usó el software 'cutadapt' (<http://cutadapt.readthedocs.io>). Las secuencias así preprocesadas fueron alineadas al transcriptoma de referencia TAIR10 de *Arabidopsis thaliana*, disponible en la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org>; Lamesch *et al.*, 2012) usando Bowtie2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388286>, Langmead and Salzberg, 2012).

La estimación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el paquete RSEM (Li and Dewey, 2011) y la expresión diferencial de transcritos (valores logFC, logCPM, p-value y FDR) fue estimada usando el paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2010).

Para identificar los genes diferencialmente expresados se calculó la tasa de cambio o *Fold Change* (FC), dividiendo los valores de Fragmentos por millón de kilobases (FPKM) de la muestra tratada con dexametasona entre los de la muestra tratada con mock. Para poder interpretar con mayor facilidad la expresión diferencial de los diferentes genes, los valores de FC fueron transformados a una escala log<sub>2</sub>, donde un FC de ±1 equivale al doble de expresión de una muestra frente a la otra. También se aplicaron los test estadísticos correspondientes al p-value y al "False Discovery Rate" (FDR) para seleccionar los datos significativos.

Para la selección de genes diferencialmente expresados aplicamos como parámetros de selección un FC >0,75 y <-0,75, p-value <0,05 y FDR <0,05. Adicionalmente, como solo queríamos estudiar los genes que respondían a la sobreexpresión de AP2 en el SAM, de la lista de genes resultantes seleccionamos únicamente aquellos para los que se había descrito que se expresaban en el meristemo apical del tallo, aprovechando datos de expresión de un experimento de

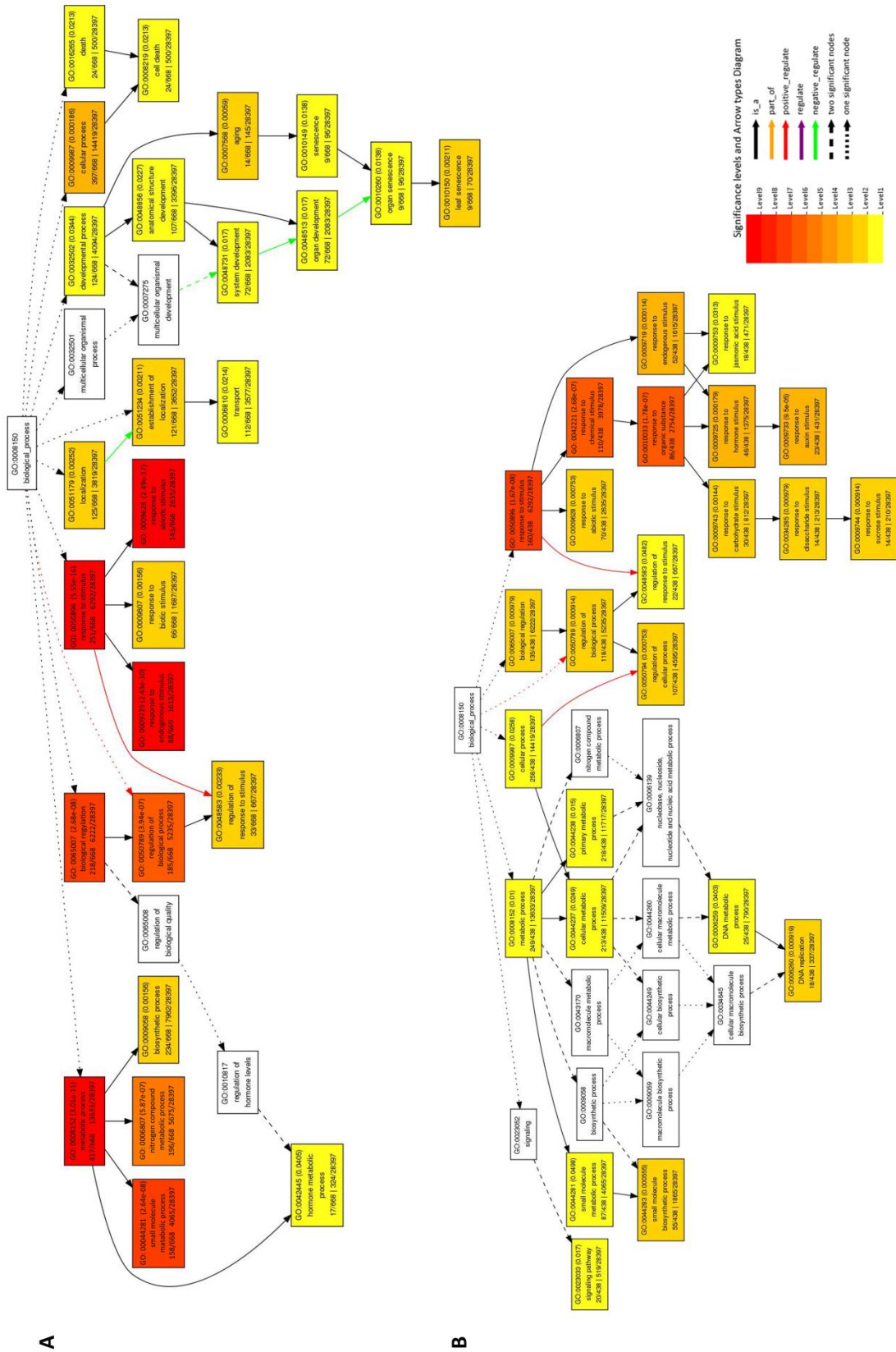


microdissección laser del SAM publicados recientemente (Wuest *et al.*, 2016). Tras aplicar todos los filtros establecidos, encontramos 1112 genes con expresión diferencial en el SAM; de ellos, 674 genes se mostraron reprimidos y 438 activados por la inducción de AP2m3. Todos ellos podrían ser potenciales dianas moleculares en el SAM, directas o indirectas, de AP2.

Para estudiar el significado biológico de los genes seleccionados realizamos el análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica (GO) mediante la aplicación AgriGO (Du *et al.*, 2010), empleando el Análisis de Enriquecimiento Singular (SEA) y comparando frente a la base de datos de Arabidopsis (TAIR10). Analizamos por separado los genes que se habían mostrado reprimidos o activados sobre términos GO de Procesos Biológicos. Los genes reprimidos y activados se agruparon principalmente en 327 y 68 procesos biológicos respectivamente. Algunos ejemplos de los términos GO significativos que obtuvimos fueron “respuesta a estímulos bióticos y abióticos”, “regulación de procesos biológicos”, “regulación de la respuesta inmune”, “regulación de procesos celulares y procesos metabólicos”, “fotosíntesis”, “ritmo circadiano” o procesos del desarrollo como “edad” y “senescencia”. En la figura 1-12 tan solo se muestra una selección de los términos GO que podrían estar relacionados con el GPA.

Dentro de la selección de categorías GO que pudieran estar relacionadas con el GPA para los genes activados por AP2, las categorías con mayor enriquecimiento fue la de “Respuesta a estímulos” (GO:0050896), con 160 genes, y “Regulación de procesos biológicos” (GO:0050789) con 118 genes, apareciendo también, pero con menor representación, “Procesos celulares” (GO:0009987) y, dentro de ésta, “Replicación del DNA” (GO:0006260). Para los genes reprimidos por AP2 en el SAM destacaban las categorías de “Procesos metabólicos” (GO:0008152) con 417 genes, “Respuesta a estímulos” (GO:0050896) con 251 genes, “Procesos celulares” (GO:0009987) con 124 genes y “Procesos del desarrollo” (GO:0032502) con 124 genes. Dentro de los procesos metabólicos se incluían “Metabolismo de hormonas” (GO:0042445), “Metabolismo de pequeñas moléculas” (GO:0044281) y “Metabolismo de compuestos nitrogenados” (GO:0006807). En la categoría “Respuesta a estímulos” se incluían “Estímulos bióticos”, “Estímulos abióticos” y “Estímulos endógenos”. Incluidos en la categoría de “Procesos del desarrollo” aparecían genes relacionados con la “Edad” (GO:0007568), “Senescencia” (GO:0010149) y “Muerte celular” (GO:0008219). Como se puede ver, con los genes reprimidos por AP2 obtuvimos mayor número de categorías que con los genes activados. Esto sería indicativo de que el papel de AP2 como regulador de GPA podía ser mayoritariamente mediante la represión de genes que se acumulan durante la senescencia del meristemo.

De todas las categorías GO que resultaron enriquecidas, nos centramos en aquellas relacionadas con la edad, la senescencia o el control hormonal. Adicionalmente seleccionamos otros genes que se ha descrito están relacionados con el mantenimiento meristemático o el metabolismo de trehalosa. En la tabla 1-1 se indican una serie de genes que podrían estar implicados en la regulación del GPA y para los que pudiera ser interesante profundizar en su estudio.



**Figura 1-12: GO Procesos Biológicos:** Resultado del análisis de categorías funcionales enriquecidas en base a procesos biológicos. A) Genes reprimados. B) Genes activados. El código de colores indica el grado de significatividad en función de la intensidad, desde el blanco (no significativo) al rojo (alto grado de enriquecimiento).

**Tabla 1-1: Selección de genes candidatos a regular el GPA.**



AGI	NOMBRE	SÍMBOLO	PROCESO BIOLÓGICO
<b>GENES REPRIMIDOS</b>			
AT3G45600 AT4G27700 AT4G30270 AT4G35770	TETRASPANIN3 - SENESCENCE 4 SENESCENCE 1	TET3 - SEN4 SEN1	EDAD
AT1G66330 AT1G69490 AT2G39730 AT2G42530 AT2G42540 AT3G52430 AT5G51720 AT5G52310 AT5G62165	- NAC-LIKE ACTIVATED by AP3/PI RUBISCO ACTIVASE COLD REGULATED 15B COLD-REGULATED 15A PHYTOALEXIN DEFICIENT 4 NEET GROUP PROTEIN COLD REGULATED 78 AGAMOUS-LIKE 42	- NAP RCA COR15B COR15A PAD4 NEET COR78 AGL42	EDAD, SENESCENCIA DE ÓRGANOS
AT5G21482 AT1G15670 AT1G80440 AT3G59940 AT1G13930 AT1G32060 AT1G61520 AT1G68360 AT1G79040 AT3G08940 AT3G09260 AT3G54050 AT3G57040 AT3G61630 AT4G27950 AT5G09660 AT5G58070	CYTOKININ OXIDASE 7 KISS ME DEADLY 2 KISS ME DEADLY 1 KISS ME DEADLY 4 - PHOSPHORIBULOKINASE PHOTOSYSTEM I LIGHT HARVESTING COMPLEX GENE 3 GLABROUS INFLORESCENCE STEMS 3 PHOTOSYSTEM II SUBUNIT R LIGHT HARVESTING COMPLEX PHOTOSYSTEM II - HIGH CYCLIC ELECTRON FLOW 1 RESPONSE REGULATOR 9 CYTOKININ RESPONSE FACTOR 6 CYTOKININ RESPONSE FACTOR 4 PEROXISOMAL NAD-MALATE DEHYDROGENASE 2 TEMPERATURE-INDUCED LIPOCALIN	CKX7 KMD2 KMD1 KMD4 - PRK LHCA3 GIS3 PSBR LHCB4.2 PYK10 HCEF1 ARR9 CRF6 CRF4 PMDH2 TIL	REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOQUININAS
AT1G68020 AT2G18700 AT1G60140 AT1G70290 AT4G39770 AT1G23870	- TREHALOSE PHOSPHATASE/SYNTHASE 11 TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE TREHALOSE-6-PHOSPHATASE SYNTHASE S8 TREHALOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHATASE H TREHALOSE-PHOSPHATASE/SYNTHASE 9	ATTPS6 TPS11 TPS10 TPS8 TPPH TPS9	METABOLISMO DE TREHALOSA
AT5G60910 AT1G69120 AT5G61850 AT2G31160 AT2G03710 AT1G24260	FRUITFULL APETALA1 LEAFY LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 3 SEPALLATA 4 SEPALLATA3	FUL AP1 LFY LSH3 SEP4 SEP3	MANTENIMIENTO DE LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO
<b>GENES ACTIVADOS</b>			
AT4G17460 AT4G36920 AT3G24770 AT1G03170 AT1G56010 AT2G35350 AT5G27030 AT1G20700	JAIBA APETALA 2 CLAVATA3/ESR-RELATED 41 FANTASTIC FOUR 2 NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 1 POLTERGEIST LIKE 1 TOPLESS-RELATED 3 WUSCHEL RELATED HOMEBOX 14	JAB AP2 CLE41 FAF2 NAC1 PLL1 TPR3 WOX14	MANTENIMIENTO DE LA IDENTIDAD DEL MERISTEMO

### Identificación de interactores de AP2

En el modelo de control de la actividad meristemática que proponemos, los genes de la familia *AP2* son clave para mantener la expresión de *WUS*. Puesto que generalmente los factores transcripcionales ejercen sus funciones formando parte de complejos con otros factores de transcripción, nos propusimos identificar algunos de los posibles interactores de *AP2* que pudieran estar implicados en la regulación del *SAM* y que pudiéramos incluir en nuestro modelo. Una de las técnicas disponibles para la detección de interacciones proteína-proteína es el ensayo de doble híbrido en levadura. Por ello decidimos realizar un escrutinio mediante el sistema de doble híbrido GAL4 en levadura (Invitrogen) utilizando como cebo *AP2* frente a una genoteca de factores de transcripción disponible en el laboratorio del doctor Stefan de Folter (Fig. 1-16 C).

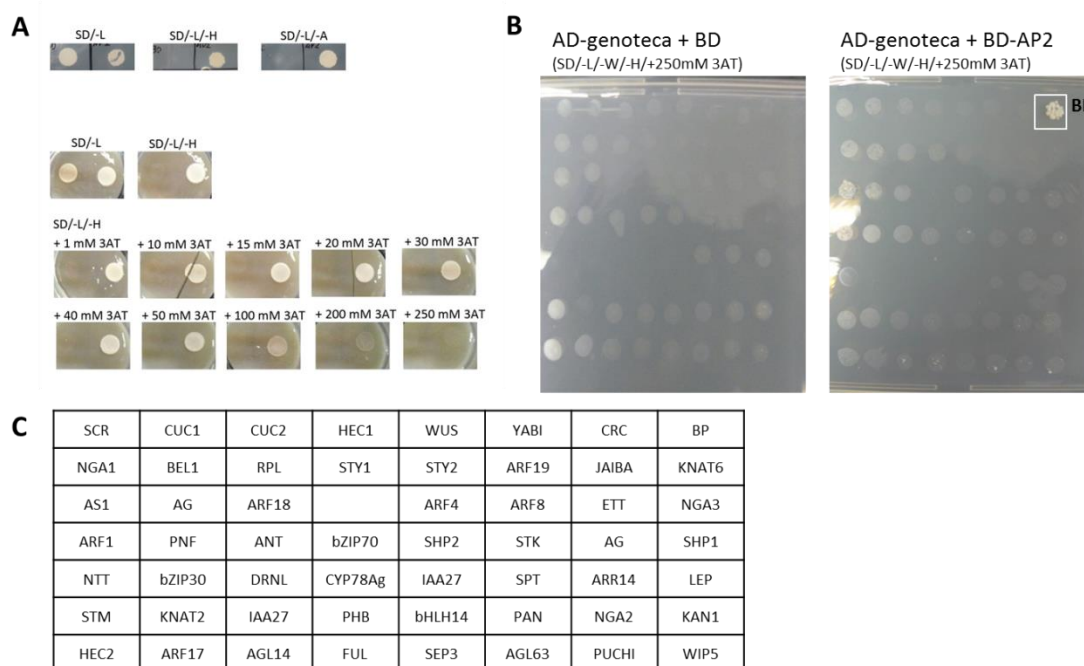
Generamos la construcción BD:*AP2*, clonando la secuencia codificante de *AP2* en el vector pDEST32 que contiene el dominio de unión a DNA de GAL4 y la transformamos en la cepa de levadura PJ69-4 $\alpha$ , deficiente en la síntesis de Histidina y Adenina.

Para determinar si la secuencia de *AP2* contenía dominios de activación intrínsecos capaces de activar la expresión de los genes reporteros presentes en la levadura, realizamos ensayos de autoactivación. Observamos el crecimiento de la levadura transformada con el vector BD vacío o con el vector BD:*AP2* en un medio deficiente en Histidina o en Adenina. Mientras que las levaduras transformadas con el vector BD no fueron capaces de crecer en los medios deficientes en dichos aminoácidos, las levaduras transformadas con BD:*AP2* sí crecieron, por lo que la secuencia de *AP2* contenía un dominio de activación capaz de activar por sí mismo la expresión de los genes reporteros de auxotrofia a Histidina y Adenina (Fig. 1-16 A arriba).

Una de las estrategias que se suele emplear para impedir el efecto de autoactivación es la adición al medio de crecimiento de 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT), un inhibidor competitivo de la síntesis de Histidina. Para seleccionar la concentración de 3-AT necesaria para impedir el crecimiento de la levadura en ausencia de interacción realizamos diferentes pruebas, añadiendo al medio de crecimiento concentraciones crecientes de 3-AT, de 1 a 250 mM (Fig. 1-16 abajo). Según los resultados obtenidos, fue necesaria una concentración de 250 mM de 3-AT para evitar el crecimiento de las levaduras debida a la autoactivación de *AP2*.

Realizamos el escrutinio de la genoteca de factores de transcripción mediante el apareamiento de las levaduras y selección de las interacciones positivas en medio selectivo sin histidina (SD/-L/-W/-H) suplementado con 250 mM de 3-AT, obteniendo como resultado tan solo un clon positivo, correspondiente a la interacción *AP2*-BREVIPEDICELLUS (BP) (Fig. 1-16 B).

La concentración de 3-AT que empleamos para eliminar los falsos positivos es anormalmente elevada para este tipo de ensayos, por lo que es probable que tan solo nos hubiera permitido detectar interacciones muy fuertes.

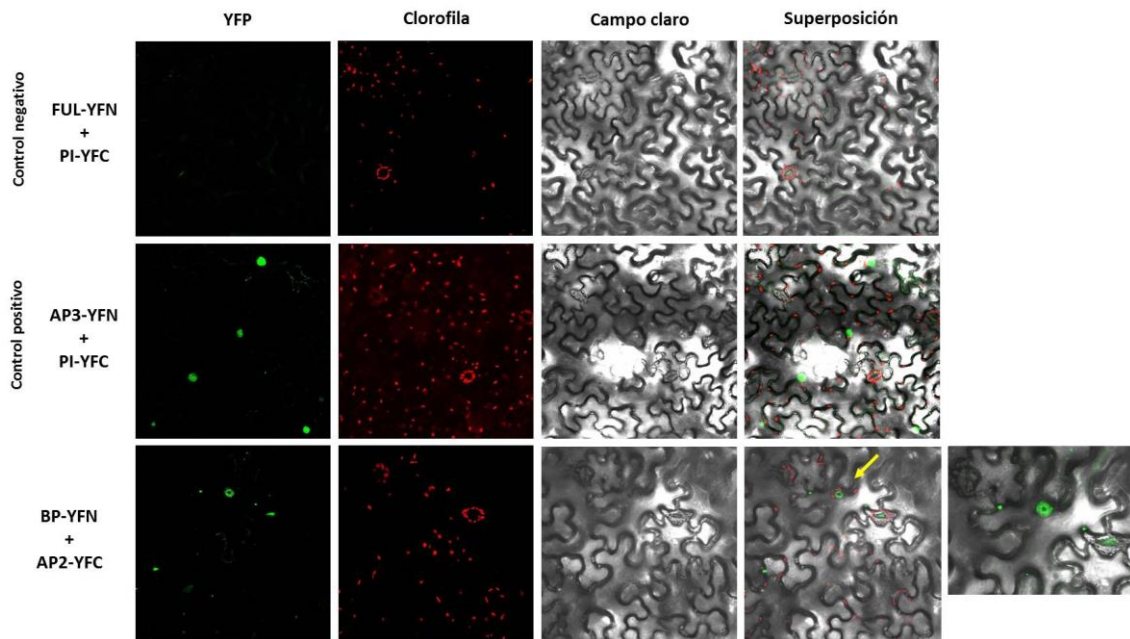


**Figura 1-16: El rastreo de doble híbrido con una genoteca de factores de transcripción muestra la interacción proteína-proteína entre AP2 y BP. A)** Ensayo de autoactivación. En cada recuadro aparece el crecimiento de la levadura transformada con el vector BD vacío (izquierda) y con el vector BD:AP2 (derecha). AP2 posee regiones activadoras, que son capaces de activar la síntesis de Adenina e Histidina, por lo que es necesario añadir una elevada concentración de 3-AT para impedir la autoactivación. En este ensayo fue necesario adicionar al medio de cultivo hasta 250 mM de 3-AT. **B)** Resultados del rastreo de la genoteca de factores de transcripción con AP2. Se empleó como medio selectivo -L - W -His +250 mM 3-AT y se recogieron los resultados tras 3 días de crecimiento. **C)** Factores de transcripción incluidos en la genoteca de Stefan de Folter. La posición de cada factor de transcripción indica su localización en la placa.

Para comprobar que la interacción entre AP2-BP detectada en levadura también se producía *in vivo*, decidimos realizar un ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC).

Para ello clonamos la secuencia codificante de *BP* en el vector YFN43, que contiene extremo N-terminal de la YFP, y la secuencia codificante de *AP2* en el vector YFC43, con el extremo C-terminal de la YFP. Posteriormente coinfiltramos ambas construcciones, así como los controles positivos y negativos del ensayo, en hojas de *Nicotiana benthamiana* y observamos con un microscopio confocal si se reconstituía la YFP, emitiendo fluorescencia.

Al igual que con el ensayo de doble híbrido en levadura, mediante BiFC también observamos la interacción entre BP y AP2, localizándose el dímero resultante en el núcleo (Fig.1-17). También observamos señal fluorescente en agregados citoplasmáticos, aunque esta señal no fue específica de la interacción AP2-BP, apareciendo también en el control positivo y podrían deberse a la presencia de gránulos de estrés (Krapp *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2015a; Weber *et al.*, 2008) debido a problemas en el crecimiento de las plantas, así como señal autofluorescente en estomas.



**Figura 1-17: AP2 y BP interaccionan proteína-proteína y el dímero se localiza en el núcleo.** Experimento de BiFC realizado con la proteína BP fusionada al extremo N-terminal de la YFP y la proteína AP2 fusionada al extremo C-terminal de la proteína YFP. Como control positivo se testó la interacción AP3-PI y como control negativo FUL-PI. La primera columna corresponde al canal de emisión de la YFP, la segunda columna al canal de la clorofila, la tercera imagen es el campo claro y la cuarta la superposición de las tres imágenes, donde se aprecia cómo la YFP reconstituida se localiza en el núcleo de las células. También aparece señal en granulos de estrés y autofluorescencia en células estomáticas.

BP (también denominado KNAT1), pertenece a la clase I de la familia Homeobox de factores de transcripción KNOX, junto a STM, KNAT2 y KNAT6 (Scofield and Murray, 2006). BP se expresa durante el desarrollo de la inflorescencia en el meristemo apical del tallo y la base de los meristemos florales, además de en el tallo, los pedicelos, gineceo y fruto (<http://travadb.org>; Douglas *et al.*, 2002; Lincoln *et al.*, 1994). BP está implicado en la regulación de diferentes aspectos del crecimiento y la diferenciación celular en el SAM, los pedicelos y el gineceo de Arabidopsis (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007; Venglat *et al.*, 2002) e interviene en el establecimiento de la polaridad adaxial-abaxial de los órganos (Smith and Hake, 2003). KNAT1, KNAT2 y KNAT6, se expresan en la zona periférica del meristemo y funcionan de forma parcialmente redundante con STM para restringir la expresión de los genes AS1 y AS2 a los primordios de los órganos manteniendo de esta forma el estado desdiferenciado de las células meristemáticas (Byrne *et al.*, 2002; Semiarti *et al.*, 2001). La pérdida de función de KNAT1 en el mutante nulo *brevipedicellus (bp)* no produce alteraciones evidentes en el SAM debido a la redundancia con los otros genes KNOX I, pero afecta a la arquitectura de la planta, presentando entrenudos más cortos y flores y frutos inclinados hacia abajo (Venglat *et al.*, 2002).

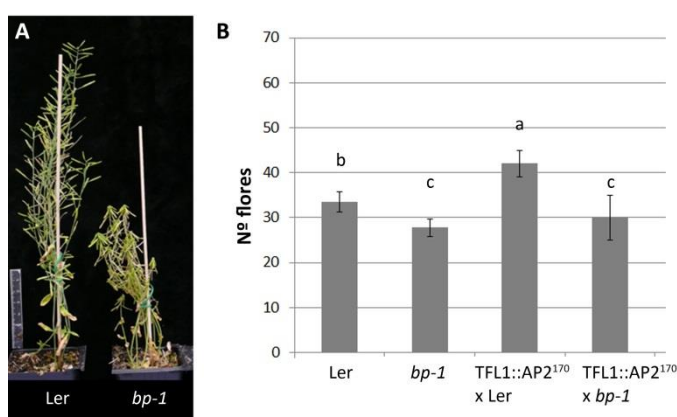
Tras observar la interacción proteica entre AP2 y BP en el núcleo celular, nos preguntamos si la regulación que podría estar ejerciendo AP2 sobre el mantenimiento de la actividad meristemática podría estar mediada, al menos en parte, por BP y por tanto la interacción de ambas proteínas pudiera ser relevante para la regulación de la actividad meristemática y el retraso del GPA. Si esta

hipótesis fuera correcta, la pérdida de función de *BP* llevaría a un adelanto del cese de la actividad meristemática del SAM y por tanto la aparición prematura del GPA.

Para comprobarlo, estudiamos el momento de aparición del GPA en el mutante nulo *bp-1* mediante el recuento de flores producidas en la inflorescencia principal. Mientras que las plantas silvestres generaron  $33,5 \pm 2,3$  flores en la inflorescencia principal, el mutante *bp-1* produjo  $27,75 \pm 1,9$  flores (Fig.1-18 A y B). Por tanto, la ausencia de BP causaba el adelanto del GPA. Estos resultados apoyaban nuestra hipótesis, aunque también eran compatibles con que BP estuviera regulando la actividad meristemática a través de una ruta independiente a AP2.

Para descartar esta posibilidad nos propusimos comprobar si el mutante *bp* era capaz de suprimir el fenotipo de retraso de GPA de la sobreexpresión de AP2 en el SAM.

Generamos la línea pTFL1::AP2<sup>170</sup>, que únicamente expresa el alelo AP2<sup>170</sup> en el SAM, dirigido por las regiones promotoras de *TFL1*, por lo que la sobreexpresión de AP2 solo afecta a los meristemas de la inflorescencia y no genera ningún efecto colateral en el desarrollo de la planta (esta línea está descrita en detalle en el capítulo 3). Cruzamos esta línea (ecotipo Col) con el mutante *bp-1* (ecotipo Ler). Adicionalmente, como íbamos a obtener un híbrido entre diferentes fondos genéticos también cruzamos la línea pTFL1::AP2<sup>170</sup> por el silvestre Ler, para poder contar con un control del efecto de la expresión del alelo AP2<sup>170</sup> en un fondo genético híbrido. Tras obtener plantas homocigóticas para pTFL1::AP2<sup>170</sup> y *bp* realizamos el recuento de las flores producidas en la inflorescencia principal de plantas que mostraban fenotipo *erecta*. Mientras que las plantas pTFL1::AP2<sup>170</sup> produjeron  $42 \pm 2,9$  flores, las plantas *bp-1* pTFL1::AP2<sup>170</sup> produjeron  $30 \pm 4,9$  flores, revirtiendo el retraso del GPA ocasionado por la sobreexpresión de AP2 en el SAM y produciendo un número de flores similar al mutante *bp* (Fig. 1-18 B). Aunque faltaría estudiar este tipo de interacción en un fondo genético homogéneo para evitar la interferencia de la variabilidad genética, los resultados que obtuvimos indicaban que la presencia de BP sería necesaria para la regulación de AP2 sobre el mantenimiento meristemático.



**Figura 1-18: Efecto de la pérdida de función de BP sobre el GPA.** A) En el mutante *bp-1* el GPA se adelanta respecto a las plantas silvestres. B) *bp* revierte el retraso del GPA promovido por la expresión del alelo *ap2-170* en el SAM. Se muestra la producción de flores producidas en la inflorescencia principal por plantas silvestres ecotipo Ler, *bp-1*, pTFL1::AP2<sup>170</sup> y pTFL1::AP2<sup>170</sup> *bp-1*. Se muestra la media  $\pm$  SD (n= 10). Las columnas con la misma letra no muestran diferencias significativas con  $p \leq 0,05$ , test LSD.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que BP puede unirse a AP2 para posiblemente activar o reprimir dianas comunes, así como que ambos genes parecen tener un papel regulador en el mantenimiento de la actividad meristemática. Sin embargo, sería necesario realizar más pruebas para llegar a desentrañar si esa regulación se establece a través de la interacción entre ambas proteínas.

### **Busqueda bibliográfica de genes candidatos relacionados con la regulación del cese de la actividad meristemática**

El tercer abordaje que empleamos, para la identificación de nuevos genes candidatos a ser incluidos en el modelo de control del cese de la actividad meristemática, fue la búsqueda en la literatura de genes que pudieran estar relacionados, directa o indirectamente, con la regulación de *WUS* y además que presentaran algún tipo de conexión con alguno de los genes que previamente habíamos identificado como reguladores del GPA.

Tras revisar diversos trabajos, elegimos como genes candidatos para profundizar en su papel sobre la regulación del GPA los genes *ERECTA* y *ETTIN*.

#### ERECTA

La subfamilia *ERECTA* de receptores quinasa de tipo Repeticiones Ricas en Leucina (LRR, de *Leucine Rich Repeats*) está compuesta en *Arabidopsis* por tres genes: *ERECTA (ER)*, *ERECTA-LIKE 1 (ERL1)* y *ERL2* (Shpak *et al.*, 2004; Torii *et al.*, 1996). Todos ellos se expresan en el SAM, hojas en desarrollo y primordios florales (<http://travadb.org>; Chen *et al.*, 2013; Shpak *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2013). Inicialmente se relacionó a *ER* con la regulación de la arquitectura de la planta y el desarrollo de los órganos laterales, ya que su pérdida de función produce inflorescencias más compactas con entrenudos y órganos laterales más cortos, siendo mayoritariamente responsable de la morfología típica de la accesión Landsberg *erecta (Ler)*, ampliamente utilizada en el trabajo con *Arabidopsis* (Shpak *et al.*, 2004; Torii *et al.*, 1996). Las características fenotípicas mostradas por el mutante *er* se potencian con la pérdida de función de los otros dos parálogos, *ERL1* y *ERL2*, presentando el triple mutante una roseta de hojas pequeñas y redondeadas que carecen de elongación del pecíolo, un tallo de la inflorescencia principal con severos defectos en la elongación, y pérdida de la dominancia apical, lo que resulta en un enanismo severo (Shpak *et al.*, 2004). Además de los aspectos ya mencionados, los receptores ERs regulan también el desarrollo de los estomas, el desarrollo de los órganos reproductivos (el triple mutante muestra esterilidad masculina y femenina) o la respuesta a estrés abiótico o biótico (Patel *et al.*, 2013; Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2009; Shpak, 2013; Shpak *et al.*, 2004; Torii, 2012; Uchida *et al.*, 2012)

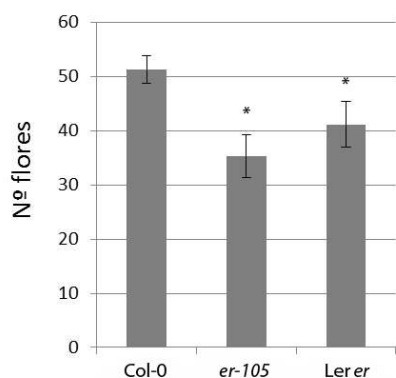
En el contexto del estudio del GPA, cabe destacar que estos receptores actúan de forma redundante en la regulación de la actividad meristemática y es necesaria la pérdida de función de los tres para observar efectos fenotípicos en el SAM, presentando el triple mutante *er erl1 erl2* meristemas de mayor tamaño que los de las plantas silvestres (Chen *et al.*, 2013; Uchida *et al.*, 2013). Se ha sugerido en varios trabajos que *ER* podría regular el tamaño del meristemo apical del tallo a través de la regulación de la expresión de *WUS* mediante una ruta independiente a la ruta CLV (Bemis *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Mandel *et al.*, 2014). Recientemente se ha propuesto

que podrían existir diferentes rutas que regulan la expresión espacial de *WUS* en diferentes ejes para conseguir restringirla al centro organizador del meristemo, así *CLV3* restringiría la expresión de *WUS* en el meristemo a lo largo del eje apical-basal, mientras que la ruta *ER* restringiría su expansión lateral (Mandel *et al.*, 2016).

Por otro lado, la función de *ER* podría estar relacionada con *BP*, al menos en lo referente a la arquitectura de la inflorescencia y la vasculatura del tallo, puesto que los defectos fenotípicos del mutante nulo *bp-1* se incrementan en presencia de la mutación *er* (Douglas *et al.*, 2002). Del mismo modo, también podría estar relacionado de alguna manera con *AP2* a través de su interacción con factores de transcripción de tipo HD-ZIP de tipo III: El mutante *jabba-1-D* (*jba-1D*), que tiene meristemas de más tamaño, expresa de forma ectópica el miR166g, cuyas dianas son estos factores de transcripción, y se ha descrito que en el doble mutante *jba-1D/+ er-20* la expresión de *AP2* está aumentada respecto al mutante simple *jba-1D/+* (Mandel *et al.*, 2014).

Como *ER* se expresa en el SAM, donde contribuye a restringir la expresión de *WUS* al centro organizador; existen indicios de una posible relación con *BP* y *AP2*, y las plantas *Ler* hacen el GPA antes que otros ecotipos como *Col*, que no portan la mutación *er*, pensamos que este gen sería un buen candidato a participar en la regulación del GPA.

En primer lugar, nos propusimos caracterizar la parada de la actividad meristemática en un mutante *er* en el ecotipo *Col*, en concreto el alelo nulo *er-105* (Torii *et al.*, 1996). Tras caracterizar la producción de flores en la inflorescencia principal, observamos que en el mutante *er-105*, al igual que en el ecotipo *Ler*, el GPA apareció antes que en *Col*, tras haber producido  $35,29 \pm 4$  y  $41,13 \pm 4$  flores respectivamente, en comparación a las  $51,22 \pm 2$  flores de *Col* (Fig. 1-19).



**Figura 1-19: Los mutantes *er* adelantan el GPA.** Flores producidas en la inflorescencia principal del mutante *er-105* (ecotipo *Col*) y *Ler er* comparando con *Col*. Se muestra la media de al menos 10 plantas ± SD. Los asteriscos marcan diferencias significativas respecto a *Col*  $p \geq 0,05$ . T-Student.

Estos resultados podían parecer de alguna manera contradictorios, porque, según los datos publicados, *ER* participaría en la represión de *WUS*, por lo que en el mutante *er*, donde los meristemas son más grandes y la expresión de *WUS* más expandida, podríamos esperar que el meristemo fuera más activo y el GPA tardío. Sin embargo, tanto *Ler* como el mutante *er-105* en fondo *Col* detuvieron la actividad meristemática antes que *Col* silvestre.

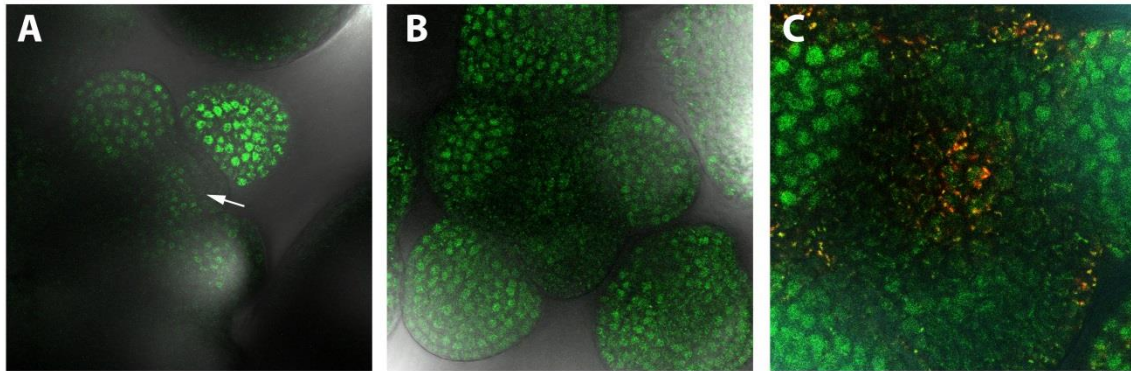
Estas dos observaciones no son fáciles de reconciliar, pero podrían deberse a la evolución temporal de la expresión de *ER* en el meristemo, que no se ha estudiado, o de otros factores desconocidos que requieren un estudio más profundo. No obstante, estos resultados sugieren



que ER, además de participar en la regulación espacial de *WUS*, también estaría interviniendo en su control temporal.

### ETTIN

El gen *ETTIN* (*ETT*) o *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* (*ARF3*) y su homólogo *ARF4*, perteneciente a la familia de factores de transcripción Auxin Response Factor (ARF), participan en la especificación de la polaridad adaxial-abaxial en la hoja (Pekker *et al.*, 2005) y el desarrollo del gineceo (Sessions *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito que, además de estas funciones, *ETT* participa en el control de la determinación del meristemo floral (Liu *et al.*, 2014) y que lo hace reprimiendo de forma directa o indirecta a *WUS* y a la vez estando regulado por *AP2*. Así, parece que la determinación del meristemo floral podría estar controlada por una ruta genética *AP2-ETT-WUS*. *ETT*, además de en el meristemo floral, también se expresa en el SAM aunque a menor nivel, (Fig. 1-20) (Liu *et al.*, 2014), por lo que también podría estar participando en la regulación del GPA, quizá formando parte de la misma ruta *FUL-AP2-(ETT)WUS* en el SAM.



**Figura 1-20: La proteína ARF3 se localiza en el SAM y en los meristemo florales (FMs).** Visualización de GFP en el meristemo inflorescente de una línea pARF3::ARF3:GFP. A) Visión semi-lateral del SAM. ARF3 se localiza en el núcleo de las capas internas del SAM (marcado con una flecha). B-C) Vista desde arriba del SAM. En nuestras condiciones de estudio ARF3 parece expresarse en todo el SAM (en C se aprecia a mayor magnificación que aparecen núcleos con señal GFP en toda la superficie del meristemo). En verde se muestra la emisión de GFP y en rojo la emisión de la clorofila.

Si incorporamos a *ETT* como un nuevo factor en el modelo que hemos propuesto, durante el desarrollo de la planta *AP2* podría estar promoviendo la expresión de *WUS* de forma indirecta, a través de la represión de *ETT*. Sin embargo, al llegar a estadios finales del desarrollo, rutas dependientes de la edad de la planta producirían la acumulación de *FUL* y del *miR172*, que reprimirían la expresión de *AP2*, facilitando de esta manera que *ETT* regulara negativamente a *WUS*, desencadenándose el GPA (Fig. 1-21).



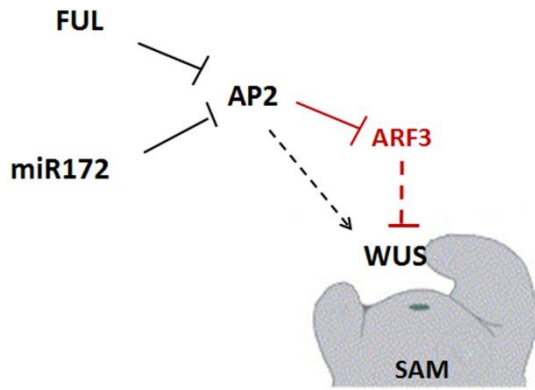


Figura 1-21: Incorporación de ARF3 a la ruta FUL-AP2 de control del mantenimiento de la actividad meristemática en el SAM.

Para comprobar nuestra hipótesis estudiamos la actividad GUS de la línea reporteras pETT::GUS, en fondo silvestre, mutante *ful* y FUL:VP16. Comparando el nivel de expresión de *ETT* mediante la detección histoquímica de la actividad GUS, observamos que tanto en el mutante *ful* como en las líneas FUL:VP16 el nivel de expresión era menor (Fig. 1-22). Estos resultados indicarían que FUL podría promover la expresión de *ETT* a través de la represión de un represor intermedio; por ello, tanto en ausencia de FUL, como cuando FUL actúa como un activador de la transcripción, el factor represor intermedio estaría expresándose más y por tanto la represión sobre *ETT* sería mayor. Estos resultados estarían de acuerdo con el modelo propuesto, donde el represor intermedio de *ETT* sería AP2.

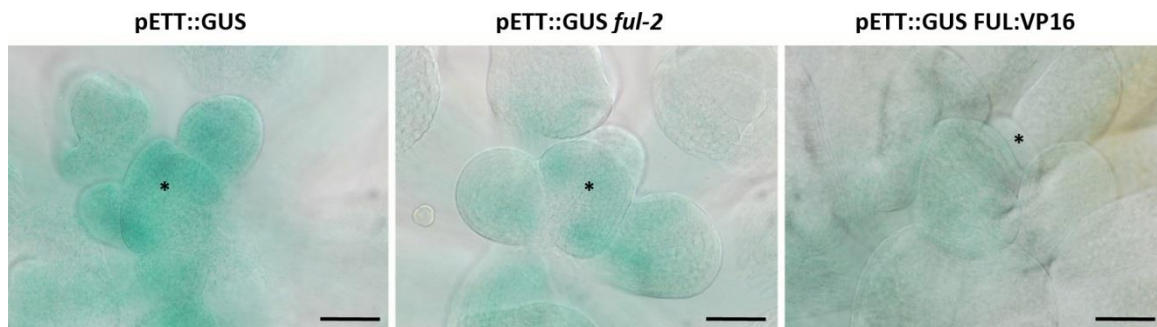
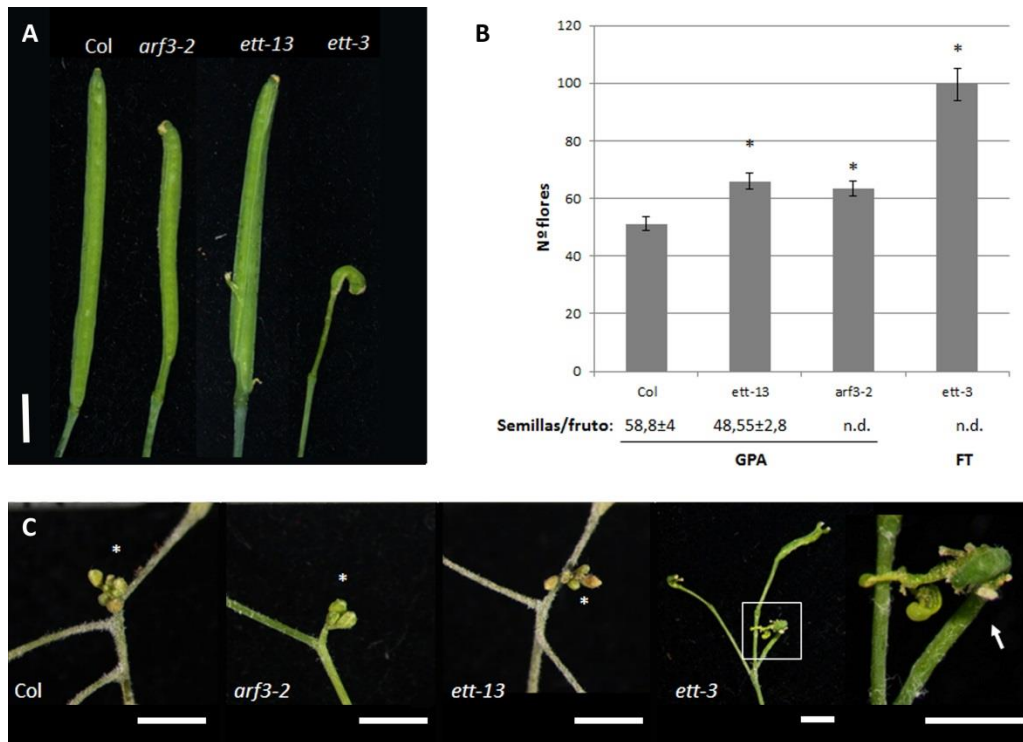


Figura 1-22: FUL promueve de forma indirecta la expresión de *ETT* a través de la represión de un represor intermedio. Detección del gen reportero β-Glucuronidasa expresado bajo las regiones reguladoras de *ETT*, en plantas silvestres, *ful* y FUL:VP16. Tanto en fondo mutante como en la versión activadora FUL:VP16 disminuye la señal GUS. Los asteriscos marcan la posición del SAM. Escala: 50 µm.

Por otro lado, si *ETT* estuviera regulando el GPA, la mutación de este gen debería afectar al momento en el que se produce la parada de la actividad del SAM. Para comprobar si esto ocurría, caracterizamos el GPA en diferentes alelos mutantes de *ett*. El alelo *ett-3* contiene una mutación puntual en el exón 8, aguas abajo del sitio putativo de unión a DNA, que introduce un codón de stop prematuro. Se trata de un alelo hipermorfo que muestra fenotipos similares al del doble mutante *ett-1 arf4-1* (ambos alelos nulos), con severos defectos en el desarrollo del gineceo (alargamiento de ginóforo, estilo y estigma y máxima reducción del ovario) que afectan negativamente a la producción de semillas, dando lugar a plantas casi estériles (Fig. 1-23 A)

(Pekker *et al.*, 2005; Sessions *et al.*, 1997). Por el contrario, el alelo *arf3-2*, que posee una inserción de T-DNA al principio del décimo exón (Okushima *et al.*, 2005), y el alelo *ett-13*, con una inserción de T-DNA 18 pb detrás del ATG, que impide su transcripción y por tanto es un alelo nulo (Pekker *et al.*, 2005), presentan leves defectos en el desarrollo del gineceo (ligero alargamiento de las regiones apical y basal y presencia de tejido estigmático en las valvas), pero no afectan significativamente al desarrollo del ovario y la fertilidad de la planta no se ve alterada (Fig.1-23 A).



**Figura 1-23: Caracterización de diferentes alelos mutantes de ETT.** A) Morfología del fruto en plantas Col, alelos mutantes *arf3-2*, *ett-13* y *ett-3*. Escala: 2 mm. B) Número de flores producidas en la inflorescencia principal de plantas silvestres del ecotipo Col, *ett-13*, *arf3-2* y *ett-3*. Se muestra la media de al menos 4 plantas ± SD. Los asteriscos marcan diferencias significativas respecto a Col  $p \geq 0,05$ . T-Student. Debajo de la gráfica se indica el número medio de semillas/fruto (n=25) y el tipo de parada del SAM. n.d. datos no disponibles. C) Tipo de parada del SAM, GPA en los alelos fértiles (marcado con \*) y flor terminal (estructura de carácter carpelar) en el alelo estéril *ett-3* (marcado con una flecha). Escala: 2 mm.

Comparamos el momento de parada del SAM mediante el recuento de flores producidas en la inflorescencia principal de los diferentes mutantes frente a plantas silvestres (Fig. 1-23 B). Mientras que Col produjo  $51,22 \pm 2,49$  flores, los mutantes *ett-13* y *arf3-2* aumentaron el número de flores generadas a  $65,75 \pm 1,71$  y  $63 \pm 2,16$  respectivamente antes de producirse el GPA (Fig. 1-23 C). Esto podría estar indicando que ETT es capaz de retrasar el GPA y estar implicado en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática, al menos en parte, dentro del modelo que hemos propuesto. Por otro lado, el mutante *ett-3* incrementó enormemente el número de flores producidas, llegando a formarse  $99,5 \pm 5,5$  flores antes de determinarse el SAM en una flor terminal (Figura 1-23 C). Como este mutante es prácticamente estéril, este retraso del

GPA podría ser un efecto exclusivamente de la ausencia de semillas, aunque el número de flores producido era mayor que el observado en otras plantas estériles caracterizadas en experimentos independientes (por ejemplo, ver figura I-8D), lo cual sugería un efecto aditivo. Para poder comprobar este punto, será necesario realizar más estudios donde se compare la producción de flores de este mutante con otros mutantes estériles, que, lamentablemente, no se incluyeron en el experimento descrito.

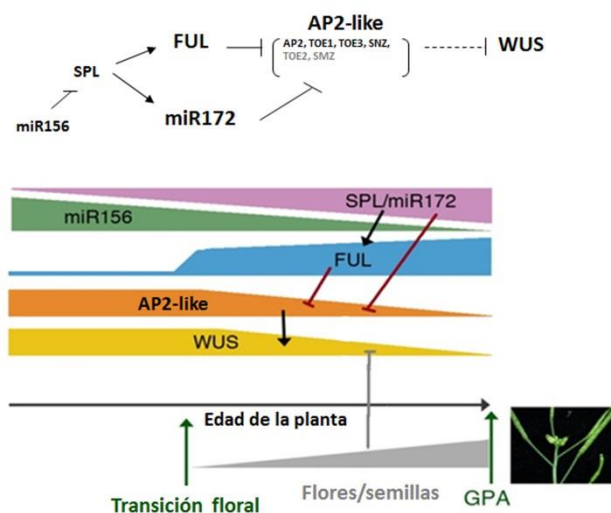
Los resultados obtenidos hasta el momento apoyan la inclusión de ETT como un nuevo factor en la ruta FUL-AP2, aunque sería necesario seguir testando a nivel genético y molecular el nuevo modelo propuesto.



## DISCUSIÓN

Este capítulo se ha centrado en el estudio de la ruta FUL-AP2 de control del mantenimiento de la actividad meristemática en el SAM en los últimos estadios del desarrollo, así como de la identificación de otros posibles reguladores de la parada global de la proliferación (GPA) en *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados obtenidos durante este trabajo, así como en trabajos previos realizados en nuestro grupo, indicaban que FUL podría controlar el momento de aparición del GPA posiblemente a través de la regulación de los genes que componen la familia de factores de transcripción AP2-like, todos ellos regulados a su vez por el miR172 (Zumajo-Cardona and Pabón-Mora, 2016). Según el modelo genético propuesto, el módulo FUL/AP2-like podría controlar la actividad meristemática de forma dependiente de la edad en *Arabidopsis* y en paralelo con la señal derivada de las semillas o flores en desarrollo (Hensel *et al.*, 1994). Al aumentar la expresión de FUL y el miR172 por acción de la ruta de la edad, se incrementaría la represión sobre los genes AP2-like y por tanto también disminuirían los niveles de WUS, causando de esta forma el GPA (Figura 1-24).



**Figura 1-24: Modificación del modelo de regulación de la actividad meristemática propuesto previamente.** La ruta FUL-AP2, que actuaría en paralelo a la señal procedente de las semillas en formación, en la regulación de la expresión de WUS en las etapas finales del ciclo de vida de la planta, incluiría todos o parte de los miembros de la familia de factores de transcripción AP2-like, no solo a AP2.

### La ruta FUL-AP2-like, como modelo de regulación de la actividad meristemática

Como ya se ha comentado, tanto FUL como los genes AP2-like se han incluido como dianas de la ruta dependiente de la edad que controla las transiciones entre diferentes estadios del desarrollo de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Esta ruta implica al miR156, cuyos niveles de expresión van disminuyendo conforme avanza la edad de la planta (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). El miR156 reprime la expresión de sus genes diana, algunos factores de transcripción de la familia SPL, los cuales a su vez regulan positivamente al miR172 y a otros genes involucrados en la transición floral, entre ellos FUL (Yamaguchi *et al.*, 2009). Los datos publicados sobre la dinámica de expresión y acumulación de los factores SPL y el miR172 tan solo estudian el periodo

## CAPÍTULO 1

comprendido entre la germinación y la transición floral (Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009), por lo que no se puede asumir que la interacción antagonista entre miR156 y los genes *SPL* que permita un aumento gradual en el nivel de *FUL* y el miR172, también se prolongue durante la fase reproductiva y hasta la aparición del GPA. Por ello sería conveniente en futuros trabajos, ampliar la caracterización de la expresión tanto del miR156 como de los factores de transcripción *SPL*, para validar parte del modelo propuesto.

No obstante, en un reciente estudio donde se compara el transcriptoma de SAMs proliferativos en estadios tempranos del desarrollo de la inflorescencia con el transcriptoma de SAMs que han sufrido el GPA (GEO accession number GSE74386) (Wuest *et al.*, 2016), se observa que el nivel de expresión de *FUL* es tres veces mayor en meristemas parados que en meristemas en desarrollo. Estos datos sugieren que, al menos *FUL*, sí se acumula en el SAM durante el desarrollo de la inflorescencia conforme avanza la edad de la planta.

Por otra parte, durante este trabajo hemos estudiado el patrón de expresión de *AP2* en meristemas en estadios tardíos del desarrollo del SAM, es decir, próximos al GPA, en fondo silvestre, mutante *ful* y *FUL:VP16/+*. En ausencia de *FUL* o cuando *FUL* actúa como un activador transcripcional dominante, se detecta señal fluorescente en los núcleos de las células localizadas en el meristemo, concretamente en una región anular del mismo. Estos resultados indican que *AP2* se acumula en el SAM cuando no está presente la represión de *FUL*, apoyando el modelo propuesto, aunque además plantean nuevos interrogantes, pues la localización de la proteína *AP2* en una región anular en el SAM no solapante con la zona de expresión de *WUS* indica que probablemente no regule la transcripción de este gen de modo directo. De hecho, ésta es una de las incógnitas que hemos intentado abordar en esta tesis, aunque de un modo preliminar. Por otro lado, las imágenes que hemos obtenido de la localización de *AP2* no nos permiten distinguir con precisión en qué capas celulares se acumula, algo que sería necesario resolver técnicamente para poder plantear hipótesis más fundadas.

Además de estudiar la localización de la proteína *AP2*, hemos determinado el efecto de la mutación *ful* o la presencia de *FUL:VP16* sobre la actividad del promotor de *AP2* mediante la utilización de la línea gene trap GT100845, que muestra dicha actividad y no la de acumulación real del mensajero, que a su vez está controlada por la acción del miR172. Nuestros resultados muestran que cuando no está presente la represión de *FUL*, la actividad del promotor de *AP2* aumenta. Todo ello estaría de nuevo de acuerdo con el modelo propuesto e indicaría que la represión de *FUL* podría ser directa. Sin embargo, no podemos descartar que *FUL*, además, también pueda regular a *AP2* de modo indirecto, ya que, en otros órganos (como el fruto) se ha descrito que *FUL* controla la actividad de *AP2* a través de la activación directa del miR172 (José Ripoll *et al.*, 2015).

Otro de los aspectos de la ruta *FUL-AP2* que hemos pretendido investigar ha sido si también intervienen en esta ruta el resto de factores de transcripción de la familia *AP2-like* (*SMZ*, *SNZ*, *TOE1*, *TOE2* y *TOE3*). Existían datos genéticos que apuntaban a que *AP2* no era el único implicado, ya que el doble mutante *ap2 ful* mostraba un GPA tardío pero intermedio entre el del silvestre y el del mutante *ful*, y no la epistasia de *ap2* sobre *ful* que cabía esperar si el papel de *FUL* estuviera mediado únicamente por *AP2*. Para comprobar la participación de los otros genes *AP2-like* en la ruta, caracterizamos el momento de aparición del GPA en la línea transgénica 35S::miR172. En

esta línea, donde se expresa de forma constitutiva el miR172, el nivel de expresión de todas sus dianas se ve reducido, por lo que la empleamos como herramienta para simular el efecto de pérdida de función de todos los *AP2-like*. Los resultados obtenidos parecen indicar que otros genes *AP2-like* contribuyen a la regulación del GPA (Fig 1-24). Todavía queda por determinar, sin embargo, si todos ellos están implicados y en qué grado. Experimentos de Chip-Seq realizados por el grupo de Gerco Angenent en el Plant Research Institute de Wageningen han mostrado que FUL se une a las regiones reguladoras de *TOE1*, *TOE3* y *SNZ* (Balanzà, 2011), aunque, como los experimentos de ChIP-seq dependen de las condiciones experimentales y de las muestras analizadas, no es posible descartar que FUL pueda unirse también a los promotores de otros miembros de la familia.

Para analizar si todos los factores AP2-like participan de la misma manera en el mantenimiento meristemático estamos recurriendo al análisis genético clásico, generando combinaciones múltiples entre los diferentes mutantes *ap2-like* y *ful* para caracterizar el momento de aparición del GPA. Puesto que sólo el mutante *ap2* tiene defectos en la fertilidad de los frutos, la cuantificación de frutos en estos mutantes *ap2-like* puede ser muy reveladora de la contribución individual de cada factor a la regulación del proceso y también de la posible redundancia entre los diferentes factores.

Por otro lado, hemos cuantificado mediante Q-RT-PCR el nivel de expresión en los ápices de las inflorescencias de los genes *AP2-like*. Según el modelo que proponemos (Fig. 1-24), el nivel de expresión tanto de *AP2* como de los otros *AP2-like* debería reducirse paulatinamente con el tiempo. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido no concuerdan totalmente con esa hipótesis, ya que tan solo *TOE1* y *SNZ* disminuyen su expresión con el tiempo, mientras que para *AP2* y *TOE3* los niveles se mantienen estables. Antes de interpretar estos resultados habría que tener en cuenta que el material empleado no fue el óptimo para estudiar la expresión en el SAM. Se recogieron ápices a los que se les había eliminado el mayor número de yemas florales mediante disección manual, método que, lamentablemente, no es capaz de separar los primordios más jóvenes, por lo que no solo estamos observando la expresión en el SAM, sino también en estas yemas florales, donde se expresan fuertemente *AP2* y *TOE3*, lo cual podría estar impidiendo detectar la posible disminución de la expresión de estos genes en el meristemo, que constituye una pequeña fracción del material recogido. Además, también hay que considerar la posibilidad de que la actividad de los factores AP2-like no esté directamente correlacionada con su nivel de expresión, ya que el miR172 ejerce su regulación tanto degradando el mRNA como impidiendo su traducción (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004), con lo cual podría ser que el nivel de mensajero no variara significativamente y por eso no detectáramos cambios, mientras que podría haber un efecto más marcado en la disminución de la cantidad de proteína. Posibles mejoras técnicas para realizar este estudio podrían ser, por ejemplo, el empleo de la microdisección con láser para obtener muestras que contuvieran únicamente meristemas apicales y realizar así una cuantificación más precisa de la expresión génica en el SAM, o el análisis con alta precisión espacio-temporal de líneas reporteras de las proteínas AP2-like que nos permitieran observar la dinámica de su acumulación en el SAM.

## **FUL promovería la formación de la flor terminal mediante la regulación de AG u otros genes de identidad floral en el SAM**

Arabidopsis presenta un SAM con crecimiento indeterminado durante todo su ciclo de vida, al final del cual se produce el GPA, la actividad meristemática cesa y los primordios florales en formación detienen su desarrollo. Algunos trabajos han sugerido que las inflorescencias indeterminadas podrían haber evolucionado a partir de inflorescencias determinadas, donde se habría producido la represión de genes de identidad floral en el meristemo apical del tallo (Coen and Nugent, 1994; Prusinkiewicz *et al.*, 2007). Así, algunas plantas, como estrategia para aumentar la producción y viabilidad de las semillas y, por tanto, su éxito reproductivo, podrían haber adquirido una inflorescencia indeterminada retrasando la expresión de genes de identidad floral en el SAM; de este modo, se prolongaría el periodo de producción de flores y de semillas. Por otro lado, la indeterminación de las inflorescencias plantearía nuevos retos a la planta, como la optimización de recursos hacia la producción de descendencia viable, que de otro modo podrían ser malgastados en un crecimiento de las estructuras vegetativas indefinido. La aparición del GPA, un estado quiescente de los meristemas en respuesta a señales procedentes de los frutos en desarrollo, y previo a la senescencia de la planta, podría haber evolucionado como respuesta a este desafío. Por otro lado, también es posible especular que cuando se presentan problemas de fertilidad y hay una baja producción de semillas, no se produciría el GPA y el SAM alcanzaría su estado final de desarrollo, que implicaría su determinación tras la expresión de genes de identidad floral.

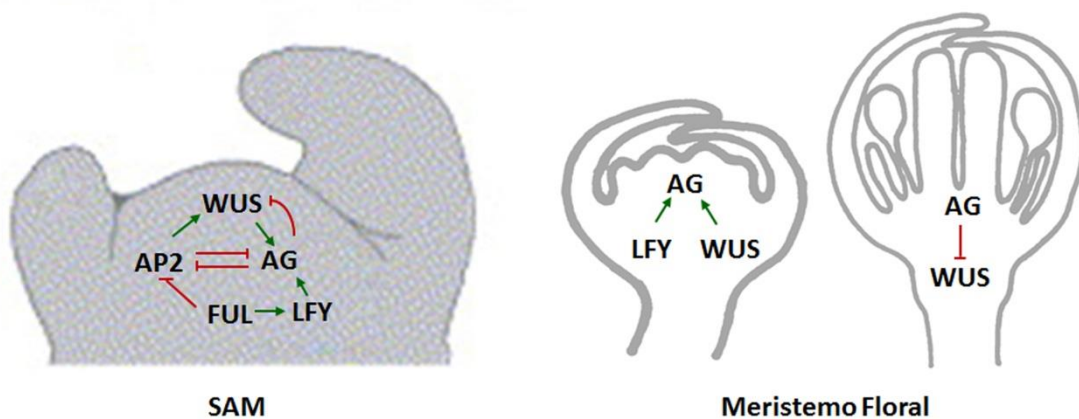
En esta tesis, así como en trabajos previos en nuestro grupo, se ha observado como la determinación del SAM en una flor terminal está correlacionada con la expresión ectópica de AG en el SAM (Balanzà, 2011 y esta tesis), lo cual apoyaría la hipótesis anterior. En este capítulo hemos analizado la expresión de AG en el SAM de mutantes *ful* y *ap2*. En el mutante *ap2* se forma una flor terminal de forma prematura, en comparación con otros mutantes estériles, tras comenzar a expresarse AG de forma ectópica en el SAM. Sin embargo, en el mutante *ful*, tanto en condiciones de fertilidad como en esterilidad (plantas a las que se les eliminan todas las flores) nunca llega a expresarse AG en el SAM y, por ello, ni en ausencia de semillas se forma la flor terminal. Además se ha observado que cuando se combinan mutantes estériles con el mutante *ful*, en ningún caso se llega a formar la flor terminal típica de los mutantes estériles (Balanzà, 2011), excepto en el doble mutante *ap2 ful*. Tanto en *ap2 ful* como en la línea 35S::miR172 *ful* hemos observado que en ocasiones sí se forma una flor terminal, aunque por lo general el meristemo se detiene con un GPA tardío. Todo ello sugeriría que AP2 podría estar manteniendo la indeterminación del SAM mediante la represión de AG en este tejido, mientras que FUL sería necesario para la activación de AG, y que, al menos en parte, esa regulación estaría mediada a través de la represión de AP2 (Fig.1-25).

Podemos intentar integrar esta posible regulación de AG en el SAM con los otros factores de nuestro modelo comparando las rutas que operan en control del mantenimiento de los meristemas florales e inflorescentes. En los primeros estadios de desarrollo del meristemo floral, poco después de su inyección (estadio 3), comienza a expresarse AG, inducido por la actividad conjunta de WUS y LEAFY (LFY), un gen de identidad de meristemo floral (Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001). La expresión de AG se restringe a los verticilos internos de la flor, donde especifica la identidad de estambres y carpelo, gracias a la represión mutua que se establece



entre AG y AP2, que a su vez se expresa en los verticilos externos (Drews *et al.*, 1991). Más adelante, en estadio 6 del desarrollo floral, AG reprime la expresión de WUS en el meristemo floral, cuyas células se consumirán con la formación del carpelo (Lenhard *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2009). Como acabamos de describir, WUS y AP2 juegan un papel clave en la regulación de AG y viceversa; sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado que FUL esté también implicado en estas funciones.

A diferencia de lo observado en meristemas florales, *LFY* no se expresa en el centro del SAM, aunque sí se acumula a niveles bajos en la periferia de éste; se ha reportado, además, que los niveles de *LFY* en el ápice de las plantas durante el desarrollo vegetativo y hasta después de la transición floral se incrementan con el tiempo, aunque de nuevo, estos estudios no abarcan toda la duración de la fase reproductiva (Blázquez *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 1997). La baja expresión de *LFY* en el SAM supone que no pueda actuar junto con WUS para activar a AG, que a su vez, podría estar reprimido por la acción de AP2 en este dominio. Para explicar los fenotipos observados en los mutantes estériles, podemos especular que, al estar WUS activo durante más tiempo y, posiblemente, acumularse LFY en el SAM, se podrían llegar a expresar ambos a niveles suficientes como para activar la expresión de AG en el SAM y producir la determinación de éste. En mutantes *ap2*, la falta del efecto represor de AP2 sobre AG podría hacer que los niveles necesarios de LFY y WUS para activar a AG fueran menores, y de ahí la formación temprana de la flor terminal. Por otro lado, se ha descrito que FUL activa de forma directa o indirecta la expresión de *LFY* (Balanzà *et al.*, 2014; Ferrandiz *et al.*, 2000a), por lo que podría estar promoviendo la expresión de AG en el SAM a través de éste. Así, en el mutante *ful* es posible que LFY no llegara a acumularse, impidiendo de esta forma la activación de AG y la posterior formación de la flor terminal, incluso en condiciones de esterilidad.



**Figura 1-25: AG podría mediar la determinación del SAM al igual que hace en el meristemo floral.** Para ello sería necesaria la participación de FUL en el proceso, que mediaría de forma indirecta, probablemente a través de LFY, la expresión de AG en el SAM en estados avanzados del desarrollo de la inflorescencia.

## La sobreexpresión de AP2 en el meristemo apical en estadios próximos al GPA es capaz de reactivar la actividad meristemática

En nuestras condiciones experimentales, hemos observado que plantas silvestres que ya han experimentado el GPA, en determinadas ocasiones, son capaces de salir del estado de quiescencia y reactivar la actividad meristemática en el SAM, aunque no hemos determinado qué factores favorecen que esto suceda. Hensel y colaboradores también realizaron observaciones similares, pero sin llegar a apuntar ningún factor concreto (Hensel *et al.*, 1994). Se ha descrito que cuando se eliminan los frutos ya formados en una planta en GPA el meristemo se reactiva (Wuest *et al.*, 2016), por lo que una posibilidad es que, en condiciones de baja humedad o estrés mecánico (por manipulación, efecto del viento, etc) podría acelerarse la pérdida de semillas que se produce cuando los frutos se secan y se abren, y esto fuera interpretado por la planta como que no ha habido una producción suficiente de semillas, desencadenando señales que finalmente acabarían reiniciando el desarrollo. Para comprobar esta idea, se podría cuantificar si en plantas indehiscentes, como por ejemplo *shatterproof 1 (shp1 shp2)* (Liljegren *et al.*, 2000), se revierte el estado de latencia con la misma frecuencia que en plantas con frutos con dehiscencia silvestre. Aún así, es posible que los mecanismos de reactivación sean múltiples y puedan desencadenarse por otros motivos.

Independientemente de cual sea la señal fisiológica que desencadene la reversión del GPA, nuestros resultados sugieren que AP2 podría ser un factor que mediara este proceso, puesto que en el ensayo que hemos realizado con las plantas transgénicas pOpON:AP2<sup>170</sup> ó pOpON:AP2m3, cuando indujimos la sobreexpresión de AP2 en los ápices de las plantas que estaban comenzando a desarrollar el GPA, se reactivaba la actividad del meristemo, que así seguía produciendo algunas flores más. Por tanto, AP2 sería necesario no solo para mantener la actividad meristemática, sino que también podría ser importante para revertir el estado de quiescencia del SAM.

Otro punto interesante que convendría explorar sería la posible conexión de AP2 con las rutas de regulación provenientes de la fertilidad/esterilidad de la planta, ya que si el fenómeno de la reactivación se puede producir tanto eliminando las semillas como sobreexpresando AP2, podríamos hipotetizar que: a) la señal procedente de las semillas podría tener un efecto sobre los niveles de expresión de AP2 (y los otros genes AP2-like), que así estarían integrando las señales relacionadas con la fertilidad y las de la edad (Fig. 1-26 A); o b) que las dos rutas (edad-AP2 y semillas) fueran independientes y convergieran en la regulación de la actividad del meristemo posteriormente (Fig.1-26 B). La observación de que el mutante *ap2-12*, con defectos severos en la fertilidad, realiza el GPA días antes que el silvestre, a pesar de que por el efecto de la esterilidad esperaríamos que el meristemo siguiera activo mucho más tiempo, parecería apoyar la primera hipótesis. No obstante, en nuestro grupo hemos evaluado el efecto sobre el GPA de la eliminación de todas las flores de la planta a medida que se van formando en diferentes mutantes y hemos comprobado que la eliminación de las flores del mutante *ap2-12* promueve el retraso del GPA, aunque el SAM no llega a mantenerse activo tanto tiempo como en las plantas silvestres “sin flores”. Estos datos sugieren que la ausencia de flores tiene efecto sobre la longevidad de las plantas *ap2-12* y sería compatible con la segunda hipótesis. A pesar de ello, hay que recordar que, al igual que ocurre en la ruta FUL-AP2, en este caso también podría estar actuando toda la familia de factores de transcripción AP2-like. Esta idea está sustentada por el hecho de que en las plantas 35S::miR172, donde se está reduciendo el nivel de expresión de todos los AP2-like, hemos

observado como el GPA aparece incluso antes que en el mutante *ap2-12*, a pesar de que nuevamente estas plantas presentan severos defectos en la fertilidad. Para testar esta idea deberíamos realizar un experimento de poda similar al realizado con *ap2-12* y eliminar todas las flores a las plantas 35S::miR172 o al séxtuple mutante *ap2-like*, para evaluar así si siguen siendo sensibles al efecto de la poda/esterilidad completa o, por el contrario, son insensibles, lo cual sería indicativo de que los AP2-like estarían funcionando como integradores de ambas rutas (semillas/edad). También sería interesante monitorizar los cambios de expresión de AP2 durante la reactivación del meristemo, por ejemplo empleando la línea pAP2::AP2:YFP y eliminando todos los frutos para inducir la reactivación una vez producido el GPA.

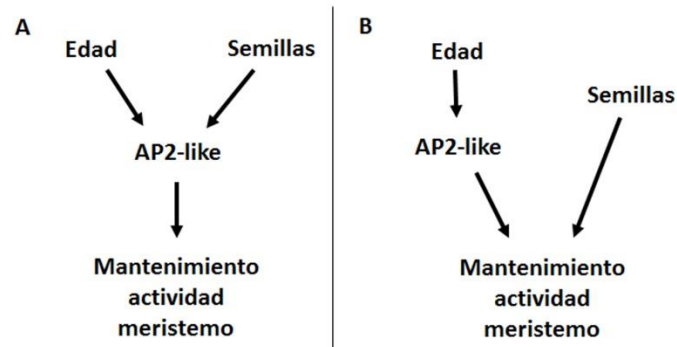


Figura 1-26: Hipótesis sobre una posible conexión de la ruta de la edad-AP2 con la ruta de regulación proveniente de la fertilidad/esterilidad de la planta en el control del mantenimiento de la actividad meristemática.

## Otros posibles genes identificados con un papel potencial en la regulación del GPA

### Análisis transcriptómico de meristemas en los que se ha inducido la expresión de *AP2m3*

La reactivación del SAM tras la inducción de la sobreexpresión del alelo *AP2m3* en las plantas transgénicas pOpON:AP2m3 indica que AP2 estaría regulando dianas probablemente implicadas en el proceso de parada del meristemo apical al final del ciclo de vida de la planta. En este capítulo hemos tratado de identificar dichas dianas mediante un abordaje transcriptómico. Para ello realizamos la inducción de *AP2m3* en meristemas maduros, pero antes de que hubieran entrado en GPA, con la finalidad de que los niveles de expresión génica fueran mayores que cuando el meristemo está parado y pudiéramos ser capaces de detectar con mayor facilidad cambios en la expresión génica debida a la regulación por AP2.

Tras el análisis del RNA-seq se realizó una selección de genes diferencialmente expresados aplicando como parámetros de selección un  $FC > 0,75$  y  $< -0,75$ ,  $p\text{-value} < 0,05$  y  $FDR < 0,05$ . Aplicamos un FC relativamente bajo debido a que, como el material empleado para la secuenciación contenía tanto el meristemo apical como yemas florales jóvenes, cambios notables en la expresión génica en el SAM podían quedar diluidos por otros tejidos del ápice y pensamos que así podíamos minimizar el número de falsos negativos. Para enriquecer este conjunto de dianas con genes con un papel potencial en el SAM, consideramos únicamente aquellos que se expresaran en este dominio, utilizando la información generada en un estudio realizado recientemente, donde habían determinado el transcriptoma de SAM de inflorescencias en

## CAPÍTULO 1

diferentes estadios (Wuest *et al.*, 2016). Una vez aplicados estos filtros, obtuvimos un conjunto de 1112 genes que mostraron expresión diferencial en el SAM tras la inducción de *AP2m3*: 674 reprimidos y 438 activados.

Tras realizar el análisis de enriquecimiento de categorías GO con las potenciales dianas de AP2 en el SAM obtuvimos multitud de procesos biológicos que se estaban viendo afectados por la sobreexpresión de AP2, desde respuesta a estímulos o regulación de procesos biológicos como la fotosíntesis o el ritmo circadiano, a la senescencia de los órganos. Todo ello era indicativo de que AP2 es un gen importante en la regulación de la actividad meristemática y la capacidad de adaptación de la planta a las señales exógenas y endógenas y podría estar participando en múltiples rutas de regulación activando o reprimiendo a sus dianas, no solo actuando en la ruta que estamos estudiando en esta tesis.

Para la selección de potenciales dianas de AP2 que pudieran estar participando dentro de la ruta FUL-AP2 de control de la actividad meristemática, nos centramos en aquellas categorías que pudieran estar relacionadas de alguna forma con la aparición del GPA, como la categoría de “Senescencia” y “Edad”. Para los genes activados, aunque ninguna de las categorías estaba directamente relacionada con la aparición del GPA, destacaban los términos GO de “Respuesta a estímulos”, “Regulación de procesos biológicos” o “Procesos celulares” como “Replicación del DNA”, indicando que AP2 podría estar participando en la integración de señales necesarias para mantener la división celular en el meristemo.

Para los genes reprimidos por AP2 en el SAM también destacaban las categorías de “Respuesta a estímulos” y “Procesos metabólicos”, que incluían el “Metabolismo de hormonas”, “Metabolismo de pequeñas moléculas” o el “Metabolismo de compuestos nitrogenados”, pero además aparecían otras categorías muy relevantes para nuestro estudio dentro de “Procesos del desarrollo” como “Edad”, “Senescencia” y “Muerte celular”. La agrupación de muchas de las dianas reprimidas directa o indirectamente por AP2 en estas categorías ya era indicativa del papel de AP2 como represor de la senescencia, al reprimir a factores que se acumulan durante la parada de la actividad del meristemo.

Sorprendentemente, dentro de los genes activados por la sobreexpresión de AP2 no se encontraba *WUS*, cuya inducción predecía nuestro modelo. Aunque, de algún modo, esta observación contradice nuestras hipótesis, es posible explicarla por un diseño experimental subóptimo. *WUS* posiblemente no esté regulado directamente por AP2, sino que se trate de una diana indirecta, lo cual haría necesaria la activación o represión de factores intermedios que estén regulando finalmente su expresión. Como las muestras fueron recogidas tras seis horas de la inducción de *AP2m3*, es posible que este tiempo fuera demasiado corto para ver el efecto sobre *WUS*, mientras que si hubiéramos recogido las muestras más tarde quizá habría aparecido. Por otro lado, como ya hemos comentado, para la extracción de RNA se recogieron ápices completos de la inflorescencia, por lo que la expresión génica en el SAM podría estar diluida en el material empleado, impidiendo que fuéramos capaces de detectar cambios significativos en su expresión. Dado que la activación de *WUS* por AP2 es un supuesto central de nuestro modelo, en experimentos futuros estudiaremos los cambios de expresión en el SAM de *WUS* tras la inducción de *AP2m3* mediante técnicas con mayor resolución espacial y/o sensibilidad, como la hibridación *in situ* del mRNA de *WUS* o la utilización de líneas reporteras contrastadas.

Aunque este trabajo tan solo es preliminar, ha permitido identificar una gran cantidad de dianas potenciales de AP2 que pueden estar participando en la regulación del GPA y la senescencia del meristemo apical del tallo. Para tratar de centrar un poco los próximos experimentos en este sentido, hemos sugerido una lista de genes reprimidos por AP2 que puede ser interesante estudiar en profundidad para indagar en su relación con la regulación del GPA, todos ellos incluidos dentro de las categorías GO de procesos biológicos de “Edad”, “Senescencia” y “Respuesta hormonal”, y que comentamos brevemente a continuación.

Aunque gran parte de los genes incluidos en las categorías de la edad y senescencia únicamente han sido estudiados como reguladores en la senescencia de hojas u órganos vegetativos, los procesos de senescencia de las hojas son similares a la senescencia en el meristemo. Por ello, todos estos genes, como *SENESCENCE 1 (SEN1)*, *SEN4*, *AGAMOUS-LIKE 42 (AGL42)*, etc., pueden estar realizando funciones similares en el SAM, donde también se están expresando y donde se acumulan cuando el meristemo está en GPA (Wuest *et al.*, 2016).

Por otro lado, la regulación hormonal es clave durante todo el desarrollo de la planta y para la correcta formación y mantenimiento de la actividad de los meristemas. Se sabe que las citoquininas actúan en el meristemo promoviendo la división celular y regulando la expresión de genes implicados en el mantenimiento de los mismos. En un estudio reciente, se ha mostrado que en mutantes en los que receptores de citoquininas se activan de forma constitutiva, la actividad meristemática se prolonga en el tiempo, obteniendo plantas más altas y con mayor número de flores (Bartrina *et al.*, 2017). Por ello, es destacable que aparezcan en el conjunto de dianas potencialmente reprimidas por AP2 genes como los de la familia de proteínas F-Box *KISS ME DEADLY (KMD)* o *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) de tipo A*, que actúan como reguladores negativos de la señalización de citoquininas (Kim *et al.*, 2013; Leibfried *et al.*, 2005).

Dentro de las listas de genes regulados por la inducción de *AP2m3* también se incluyen genes cuyas funciones han sido relacionadas con la proliferación celular y/o el mantenimiento de la identidad de los meristemas, y que, por tanto, son potenciales factores de control del GPA. Entre los genes activados aparecen, por ejemplo, *JAIBA (JAB)*, *CLAVATA3/ESR-RELATED 41 (CLE41)*, o *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 14 (WOX14)* y como reprimidos *FUL*, *APETALA1 (AP1)*, *LFY*, *SEPALLATA3 (SEP3)* o *SEP4*. Entre estos, los genes *JAB* o *SEP* aparecen como los candidatos más prometedores, ya que se ha descrito su participación en la regulación de la actividad meristemática o el mantenimiento de la identidad de meristemo (Ditta *et al.*, 2004; Zuniga-Mayo *et al.*, 2012), por lo que hemos comenzado ya a caracterizar el efecto de sus mutaciones sobre el GPA y estamos obteniendo resultados preliminares que parecen apoyar esta hipótesis. Por otro lado, la represión de *FUL* tras la inducción de *AP2m3* es un resultado hasta cierto punto inesperado, aunque podría sugerir que *FUL* y *AP2* podrían estar reprimiéndose mutuamente y/o en un bucle de retroalimentación negativa, una posibilidad que convendría explorar en mayor profundidad y que está en línea con las interacciones ya descritas para los genes *AP2-like* y otros de sus reguladores conocidos (SPLs, miR172, etc) (Chen *et al.*, 2010; Schwab *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009; Yant *et al.*, 2010).

En las listas de genes seleccionados también están presentes genes relacionados con el metabolismo de las trehalosas, cuyos niveles están altos en plantas en GPA, pero que tras la inducción de *AP2m3* reducen su expresión. Se ha propuesto que uno de los factores que afecta al

momento de la aparición del GPA son las relaciones entre órganos fuente y órganos sumidero donde existe una removilización de azúcares y aminoácidos que se distribuyen hacia los órganos en desarrollo. La trehalosa-6-fosfato (Tre6P) es un intermediario en la biosíntesis de trehalosa, que además actúa como un metabolito señal importante para la regulación de la síntesis y degradación de azúcares, y está relacionado con *KINASE1 (SnRK1)* y *TARGET DE RAPAMICINA (TOR)*, a su vez implicados en procesos de senescencia (Figueroa and Lunn, 2016; Thomas, 2013). AP2 podría estar regulando negativamente todos esos genes y así impidiendo el comienzo de la senescencia del SAM.

El trabajo recientemente publicado por Wuest *et al.* (2016) nos ha permitido realizar comparaciones muy interesantes entre situaciones relativamente análogas pero procedentes de experimentos independientes. Mientras que nuestro experimento analiza los cambios en el transcriptoma asociados a la inducción de *AP2m3* en meristemos próximos al GPA, los experimentos de Wuest y colaboradores comparan el transcriptoma de meristemos en GPA con el de meristemos proliferativos en estadios tempranos, así como de meristemos en los que tras el GPA se indujo la reactivación de la actividad meristemática mediante la eliminación de todos los frutos (Wuest *et al.*, 2016). La comparación de los datos procedentes de estos tres experimentos revela que el 65,6% de los genes que responden a la inducción de *AP2m3* en nuestro experimento presentan el mismo comportamiento en los dos experimentos de Wuest *et al.* (meristemo en GPA frente a meristemo activo y meristemo en GPA frente a meristemo reactivado). Todo ello nos ha llevado a realizar un meta-análisis con los datos de ambos estudios que nos puede ayudar a identificar qué parte de la respuesta transcriptómica está asociada a la proliferación meristemática de un modo general, qué parte sería dependiente de la ruta regulada por AP2 o qué parte estaría asociada a la señalización procedente de las semillas de un modo más específico.

Por otro lado, también están disponibles en la literatura datos de posibles dianas directas de AP2 obtenidas mediante experimentos de ChIP-seq (Yant *et al.*, 2010). Comparando estos datos con nuestro experimento hemos observado que de los 1112 genes que responden a la inducción de *AP2m3*, 294 (aproximadamente un 26%) han sido descritas como dianas directas de AP2, de las cuales 187 serían reprimidas, como *CKX7*, *KMD2* y *KMD4* (implicados en la síntesis o señalización de citoquininas) y 107 estarían inducidas, como la ciclina *CDKD1* o *JAB*.

El alto grado de solapamiento entre nuestros resultados, los derivados del análisis de Wuest *et al.* (2016) y el conjunto de dianas a cuyos promotores se ha detectado la unión de AP2, avala la función clave de éste en el control de la actividad meristemática, e indica que nuestro abordaje experimental es robusto y los resultados derivados del mismo son probablemente significativos. Así, mediante este tipo de análisis hemos sido capaces de obtener una gran cantidad de información que nos abre múltiples caminos para continuar el estudio de la regulación del GPA en un futuro inmediato.

### El dímero BP-AP2 podría estar implicado en la regulación del mantenimiento meristemático

Puesto que muchos factores de transcripción necesitan interactuar con otros factores para realizar funciones específicas, nos planteamos realizar un escrutinio mediante el sistema de doble híbrido GAL4 en levadura para identificar interactores de AP2.

Mediante la colaboración con el grupo del doctor Stefan de Folter, tuvimos acceso a una genoteca compuesta por 55 factores de transcripción implicados en el desarrollo del gineceo y fruto, aunque muchos de ellos también participan en el mantenimiento del meristemo apical como por ejemplo WUS; miembros de la familia de factores de transcripción KNOX; JAB, el factor de transcripción HD-ZIP de clase II implicado en la actividad meristemática que ya hemos mencionado anteriormente (Zuniga-Mayo *et al.*, 2012) o el mismo FUL.

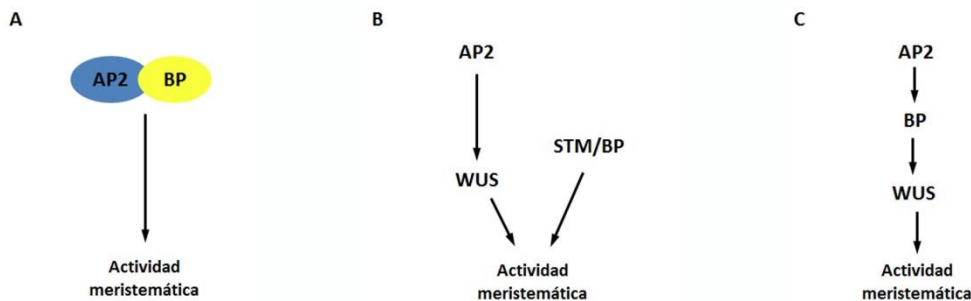
El ensayo realizado, por motivos circunstanciales, no fue técnicamente óptimo. Debido a la autoactivación de AP2 hubo que emplear condiciones de crecimiento muy restrictivas, y tan solo obtuvimos como posible interactor de AP2 a BP, un factor de transcripción de tipo KNOX I. Sin embargo, no hay que descartar que optimizando el ensayo mediante la eliminación del posible dominio de activación transcripcional de AP2, pudiera encontrarse un mayor número de interacciones dentro de esta pequeña genoteca. Por supuesto, también sería interesante realizar un escrutinio en una genoteca de mayor tamaño, ya que el rastreo realizado hasta el momento fue muy limitado.

A pesar de los problemas metodológicos, el abordaje realizado permitió identificar la interacción de AP2 con BP, que posteriormente comprobamos que también se producía en planta y que por lo tanto, identificaba a BP como un potencial candidato a regular junto a AP2 el funcionamiento del SAM.

BP participa en diferentes procesos del desarrollo de la inflorescencia, y así su expresión se localiza en múltiples tejidos como el tallo, los pedicelos, el gineceo y fruto y el SAM (<http://travadb.org>; Douglas *et al.*, 2002; Lincoln *et al.*, 1994). Tanto BP como STM, otro gen KNOX de clase I, se expresan en el SAM, mayoritariamente en la zona periférica del mismo. BP funciona de forma parcialmente redundante con STM para restringir la expresión de genes que promueven la diferenciación de los primordios de los órganos, permitiendo que las células de la zona periférica del meristemo se dividan varias veces antes de pasar a formar parte de dichos primordios (Byrne *et al.*, 2002; Semiarti *et al.*, 2001). Aunque la pérdida de función de BP no afecta de manera evidente el mantenimiento del meristemo, sí que ocasiona otras alteraciones, como plantas con entrenudos cortos y con las flores y los frutos inclinados hacia abajo (Venglat *et al.*, 2002), debido a que este gen también interviene en el establecimiento de la polaridad adaxial-abaxial de los órganos y del patrón de lignificación de los pedicelos (Smith and Hake, 2003). Gracias a este trabajo, además, hemos descrito una nueva función de BP, al observar que su pérdida de función también afecta al GPA, deteniéndose la actividad meristemática prematuramente en el mutante *bp-1*.

No sabemos cuál es el mecanismo por el cual BP podría estar regulando el GPA, aunque podemos sugerir que la posible formación de un complejo proteico entre BP y AP2 podría intervenir en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática (Fig. 1-27 A), basándonos en las

distintas evidencias que aportamos: la interacción física entre AP2 y BP, tanto en levadura como en planta; la posible formación de este complejo en el SAM, ya que ambos genes se expresan en la misma región; la implicación de ambos factores en la regulación meristemática; y el hecho de que *bp-1* sea capaz de suprimir el fenotipo de retraso del GPA mostrado por las plantas TFL1::AP2<sup>170</sup>. De ser así, podríamos integrar a BP dentro de la ruta FUL-AP2, al nivel de éste último factor, para de manera conjunta regular la expresión de *WUS*, aunque hasta el momento no tengamos otras evidencias que apoyen esta hipótesis. Cabe destacar que BP actúa redundantemente con STM en la activación de ISOPENTENYL TRANSFERASE 7 (IPT7), una enzima implicada en la biosíntesis de CKs, las cuales, entre otras funciones, promueven la expresión de *WUS* (Scofield *et al.*, 2013). Así, podría haber otras explicaciones a los resultados que obtuvimos, como que BP actuara de forma paralela a la ruta FUL-AP2 (Fig. 1-27 B). o aguas abajo de la misma para regular el GPA (Fig. 1-27 C).



**Figura 1-27: Hipótesis sobre la posible regulación de la actividad meristemática por parte de BP.** A) El complejo proteico AP2-BP podría estar regulando la expresión de genes necesarios para el mantenimiento de la actividad meristemática en las etapas finales del ciclo de vida de la planta. B) BP actuaría de forma independiente a AP2 en la regulación del GPA. C) BP promovería la actividad meristemática aguas abajo de la ruta FUL-AP2.

En resumen, los resultados que hemos obtenido son sugerentes, aunque todavía es necesario continuar investigando para conocer cuál es el mecanismo mediante el cual BP es capaz de intervenir en la regulación del GPA.



Los receptores ERs, que intervienen en la regulación espacial de WUS en el SAM, podrían participar también en su regulación temporal

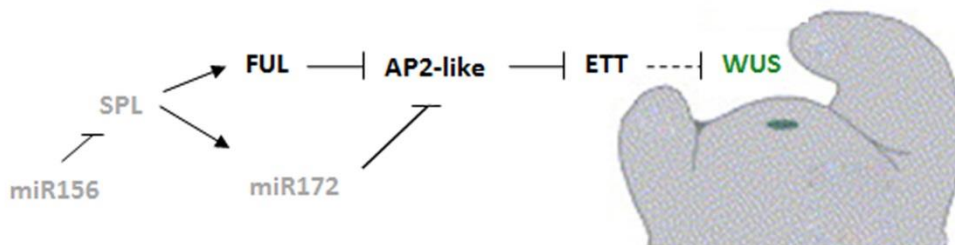
La señalización mediada por los receptores ERs permite la comunicación entre una amplia variedad de tipos celulares en todos los tejidos, participando de esta forma en la regulación de múltiples procesos durante la morfogénesis de la planta (Shpak, 2013).

Aunque en algunos procesos, como la formación de la inflorescencia o de los órganos laterales, la pérdida de función en *ER* es suficiente para alterar su correcto desarrollo, para observar defectos en el tamaño del SAM es necesario recurrir al triple mutante *er erl1 erl2*. Esto indica que ER y sus parálogos ERL1 y ERL2 actuarían de forma redundante en el control de su actividad (Chen *et al.*, 2013; Torii *et al.*, 1996; Uchida *et al.*, 2013). Así, el SAM del triple mutante *er erl1 erl2* es de mayor tamaño que el de plantas silvestres. Este hecho es debido a un moderado aumento en el número de células, al mayor tamaño de las células en las capas L1 y L2 y a que dichas células no pasan a formar parte de los primordios laterales, a causa de la reducción en la tasa de iniciación de órganos (Chen *et al.*, 2013). Se ha propuesto que todo ello podría estar relacionado con la correcta homeostasis de las hormonas Aux y Cks. Los receptores ERs están implicados en el transporte de Aux en el SAM mediante la regulación de la expresión del transportador PIN-FORMED 1 (PIN1) (Chen *et al.*, 2013) y también parecen alterar la sensibilidad del SAM a las Cks (Uchida *et al.*, 2013). Por otro lado se ha observado que en ausencia de toda la familia ERs, tanto la expresión de *CLV3* como de *WUS* se expanden lateralmente (Chen *et al.*, 2013; Uchida *et al.*, 2013) y, por ello, se ha sugerido que los receptores ERs regulan a *WUS* de forma paralela a la ruta CLV (Bemis *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Mandel *et al.*, 2014) para restringir espacialmente la expresión de *WUS* en el eje lateral (Mandel *et al.*, 2016).

Todos estos trabajos indican que la familia de receptores ER-like participan de forma redundante en la regulación espacial de la expresión de *WUS*. Sin embargo, nosotros hemos tratado de estudiar su participación en la regulación de la actividad meristemática a nivel temporal. Durante todo este capítulo hemos sugerido como el mantenimiento de la expresión de *WUS* en el tiempo retrasaría la aparición del GPA, aumentando la longevidad de la planta. Hasta el momento ningún estudio se había centrado en el papel de ER en la regulación del GPA. Según los resultados que hemos obtenido, la pérdida de función de *ER* ya es capaz de mostrar un claro efecto en el momento de aparición del GPA. Sin embargo, sería interesante continuar este trabajo con el estudio del efecto de los diferentes mutantes simples correspondientes a los otros parálogos, así como de sus combinaciones, sobre el momento de parada de la actividad meristemática. Por otro lado, mientras que los genes *ER-like* parecen actuar reprimiendo espacialmente a *WUS*, este efecto parece ser contrario en el plano temporal, ya que el mutante *er-105* en fondo Col presenta un GPA temprano. No hemos comprobado todavía si la evolución temporal de la expresión de *WUS* se ve afectada por la mutación *er*, por lo que quizá la contradicción sea tan sólo aparente. Una posibilidad es que los mutantes *er* muestren una disminución en la tasa de formación de órganos laterales, quizá a causa de problemas en el transporte de Aux o a otros defectos en la comunicación intercelular, y esto produzca un fenotipo similar de adelanto del GPA pero debido a eventos moleculares muy distintos. En cualquier caso, será necesario caracterizar mejor en estos mutantes el comportamiento del SAM, la expresión temporal de los genes relevantes en el mismo y ampliar el análisis genético, para así plantear hipótesis más fundadas.

## ETT podría estar regulando la actividad meristemática del SAM a través de la ruta FUL-AP2

En la literatura se ha descrito que *ETT*, además de intervenir en el desarrollo del gineceo (Sessions *et al.*, 1997) y en la especificación de la polaridad adaxial-abaxial en la hoja (Pekker *et al.*, 2005), también participa en el control de la determinación del meristemo floral reprimiendo la expresión de *WUS* (Liu *et al.*, 2014). Puesto que gran parte de la regulación meristemática es común a todos los tipos de meristemas, y que *ETT* también se expresa en el meristemo inflorescente, este gen podría estar regulando la terminación de la actividad meristemática en el SAM, quizá a través de la ruta FUL-AP2. Así, AP2 podría estar promoviendo la expresión de *WUS* de forma indirecta, a través de la represión de *ETT*. Al llegar a estadios finales del desarrollo, rutas dependientes de la edad de la planta producirían la acumulación de FUL y del miR172, que reprimirían la expresión de *AP2*, permitiendo de este modo que *ETT* regulara negativamente a *WUS*, causando de esta forma la aparición del GPA (Fig. 1-28).



**Figura 1-28: Ruta FUL-AP2-(ETT)-WUS.** Ampliación del modelo propuesto para la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática. Se incorpora al factor de transcripción *ETT* como componente intermedio de la regulación de los factores *AP2-like* sobre la expresión de *WUS*.

Los resultados que hemos obtenido son consistentes con esta hipótesis. La expresión de la línea pETT::GUS en fondo mutante *ful* y FUL:VP16 indica que FUL regula de forma indirecta a *ETT*. Además, el retraso del GPA en líneas portadoras de distintos alelos mutantes nulos pero fértiles de *ETT* (*ett-13* y *arf3-4*) sugiere que éste sería necesario para que el GPA se produzca en el momento óptimo, ya que, en su ausencia, la actividad meristemática se prolonga en el tiempo. Por otro lado, en el alelo *ett-3*, con severos defectos en la fertilidad, el retraso del GPA parece mucho más marcado que en otros mutantes estériles no relacionados, así que podría estar observándose un efecto aditivo de la mutación sobre la regulación temporal de *WUS* dependiente de la edad y de la falta de semillas (si bien es necesario comprobarlo con plantas de distintos genotipos, podadas o no, crecidas al mismo tiempo), lo cual podría indicar que el papel de *ETT* en el control del GPA sería en gran parte independiente de la señal procedente de las semillas en desarrollo.

El posible papel que esté ejerciendo *ETT* en la regulación meristemática en el SAM presenta gran interés y potencial. *ETT* podría estar funcionando como un integrador de la señal de regulación de todos los genes *AP2-like*, no solo de *AP2*. Para testar esta hipótesis se podría generar una línea

*ett-13 35S::miR172*. Si el modelo que proponemos fuera correcto el adelanto del GPA causado por el 35S::miR172, al reducir la expresión de todos los genes *AP2-like*, se anularía por la mutación *ett*.

Además, la expresión de *ETT*, al igual que los genes *AP2-like*, está regula por RNAs pequeños, en este caso trans-acting siRNA (Fahlgren *et al.*, 2006; Hunter *et al.*, 2006). Diferentes trabajos han mostrado la importancia de los siRNA en el mantenimiento de las células madre en el meristemo (Knauer *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2015) actuando como señales móviles que mantienen la comunicación entre el SAM y los tejidos adyacentes.

\*\*\*\*\*

El GPA significa el final de la etapa productiva de los cultivos monocárpico, por lo que es importante conocer en profundidad cuales son los mecanismos moleculares que lo desencadenan. A lo largo de este capítulo hemos profundizado en el estudio de una de las posibles rutas genéticas que controlan el mantenimiento de la actividad del meristemo apical del tallo en las etapas finales del desarrollo de la inflorescencia. Mediante diferentes abordajes hemos tratado de enriquecer la ruta FUL-AP2 con nuevos componentes, pudiendo incorporar al modelo el resto de factores AP2-like, a ETT o a BP. Aunque la ruta que proponemos puede parecer sencilla, todos los factores parecen autoregularse y/o regularse mutuamente en cierta medida, y además interaccionan con otras rutas de regulación, estableciendo así una red compleja de regulación finamente controlada por múltiples señales, tanto ambientales como endógenas, para que la actividad del meristemo sea óptima para asegurar el éxito reproductivo de la planta. Ya que el conocimiento disponible hasta el momento sobre la regulación del GPA es escaso, la abundancia de resultados que hemos obtenido en este estudio es muy prometedora, y esperamos que sea el punto de partida de una línea de investigación muy productiva.



## **CAPÍTULO 2:**

**ESTUDIO DEL CONTROL DEL GPA MEDIANTE LA RUTA DE  
SEÑALIZACIÓN ENTRE SEMILLAS Y MERISTEMO  
INFLORESCENTE**



Uno de los factores que controla la aparición del GPA es la producción de semillas (Hensel *et al.*, 1994; Wuest *et al.*, 2016), aunque se desconoce como el SAM percibe y responde a esta producción. Se ha propuesto un posible mecanismo según el cual los órganos sumideros en desarrollo exportan un factor, tal vez una hormona de la muerte aun no identificada, que es capaz de viajar hasta el meristemo apical del tallo, donde regularía la expresión de los genes de mantenimiento del meristemo y desencadenaría la senescencia monocárpica (Engvild, 1989; Wilson, 1997). Sin embargo, por el momento no se han encontrado evidencias de la existencia de esa señal, y ni por lo tanto de cuál sería su naturaleza o su mecanismo de acción. ¿Cómo se desencadena la señal de parada a partir de un umbral determinado de producción de semillas?, ¿es el desarrollo de las semillas o el desarrollo del fruto lo que desencadena la ruta de señalización entre los órganos reproductivos y el SAM?, ¿la señal de las semillas en el SAM actúa directamente reprimiendo la expresión de *WUS* o regula a otros factores intermediarios? Son muchas las incógnitas sobre este tema. Por ello, en este capítulo pretendíamos explorar de un modo preliminar distintas posibilidades que nos permitieran plantear hipótesis sobre esta ruta de regulación de la parada de la actividad meristemática.

### **Mutantes en la biosíntesis o degradación de azúcares:**

Una de las hipótesis propuesta para el desencadenamiento del GPA es la existencia de relaciones fuente sumidero, con la movilización de nutrientes desde los órganos vegetativos hacia los órganos reproductivos en desarrollo (Bennett *et al.*, 1984; Davies and Gan, 2012; Kelly *et al.*, 1988; Rolland *et al.*, 2006; Sinclair and de Wit, 1975; Smeeckens *et al.*, 2010; Wingler and Roitsch, 2008). Puesto que el éxito reproductivo de la especie depende de la formación de suficientes semillas, parece lógico suponer que los recursos disponibles se dirijan mayoritariamente hacia los frutos y semillas en desarrollo, por lo que los órganos vegetativos comienzan a senescer y se detiene la división celular en los ápices de los tallos que estaban consumiendo una gran cantidad de recursos.

Los azúcares son uno de los nutrientes que se movilizan durante la senescencia de los órganos vegetativos y se transporta a través del floema hacia otros tejidos, donde además de ser empleados como recursos metabólicos, también actúan como señal de regulación para múltiples procesos del desarrollo (Li and Sheen, 2016; Smeeckens, 2000; Yu *et al.*, 2015). Por tanto son un buen candidato a ser la señal móvil entre semillas y SAM o al menos que dicha señal se pueda desencadenar como consecuencia del metabolismo o acumulación de azúcares en las semillas en formación.

La cantidad de los diferentes azúcares presentes en la semilla en un determinado momento de su desarrollo dependen de los diferentes procesos metabólicos que se produzcan (síntesis y degradación), la capacidad de acumulación, así como el transporte de los azúcares desde otros órganos fotosintéticamente activos hacia las semillas o al contrario.

El almidón es un carbohidrato de almacenamiento ampliamente extendido en el reino vegetal, compuesto por aproximadamente el 30% de amilosa y el 70% de amilopectina (Martin and Smith, 1995). Aunque en las semillas de *Arabidopsis* tan solo se acumula transitoriamente, junto a hexosas, durante las primeras fases de su desarrollo, pero gradualmente van degradándose,

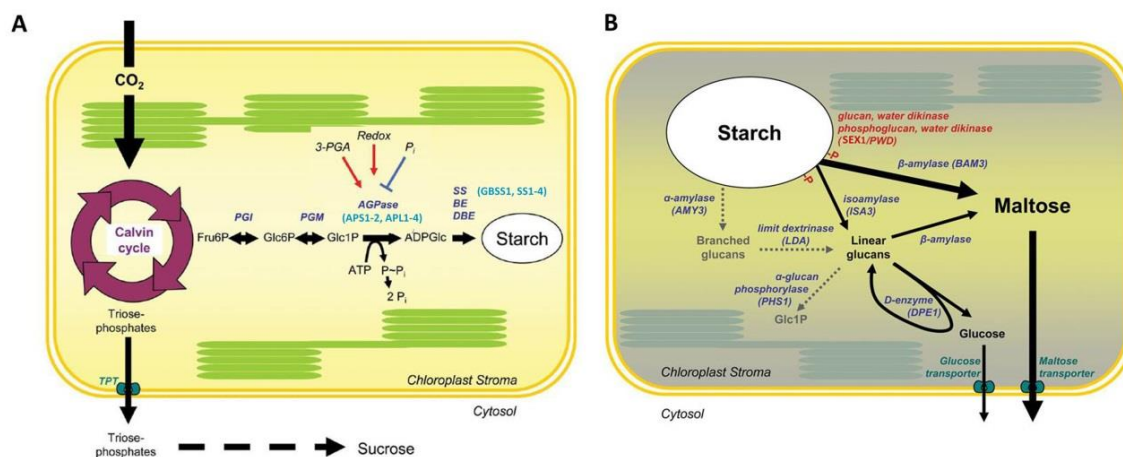
quedando cantidades muy bajas en las semillas secas, donde la principal molécula de almacenamiento son los lípidos (Andriotis *et al.*, 2010). Sin embargo también hay un acumulo gradual de sacarosa y otros oligosacáridos al final de la fase de maduración (Baud *et al.*, 2002; Focks and Benning, 1998), existiendo una correlación entre la disminución del ratio hexosas/sacarosa y la transición a la fase de maduración del embrión (Streb and Zeeman, 2012). Se ha descrito que AP2 interviene en el control de la relación entre hexosas y sacarosa además de controlar el tamaño de las semillas (Ohto *et al.*, 2005). También se ha sugerido que la trehalosa-6-fosfato podría jugar un papel crítico en el desencadenamiento de la maduración de la semilla, pero el mecanismo molecular involucrado aún se desconoce (Gómez *et al.*, 2006).

Aunque las semillas de *Arabidopsis* tan solo acumulan almidón de forma transitoria, esta especie ha demostrado ser un valioso sistema modelo para estudiar el metabolismo del almidón en órganos fotosintéticamente activos, que posiblemente también sea aplicable a tejidos de almacenamiento (Streb and Zeeman, 2012). El almidón es uno de los productos primarios de la fotosíntesis en el cloroplasto. Se acumula durante el día y se degrada durante la noche siguiente, permitiendo el suministro continuo de hidratos de carbono en ausencia de fotosíntesis. Así, el almidón sintetizado en la hoja actúa como un reservorio transitorio de hidratos de carbono (Zeeman and Rees, 1999), pero también puede ser acumulado en los amiloplastos de tejidos no fotosintéticos como semillas, raíces y tubérculos, sirviendo como una fuente de energía de medio a largo plazo para sostener procesos de crecimiento durante la germinación. Durante los últimos años se ha empleado un gran esfuerzo en el estudio de las rutas implicadas en el metabolismo del almidón transitorio, que también podrían ser relevantes para la comprensión del metabolismo de los almidones de almacenamiento (Streb and Zeeman, 2012).

En las células fotosintéticamente activas la fructosa-6-fosfato (Fru6P), un intermediario del ciclo de Calvin, se transforma mediante una serie de reacciones enzimáticas en ADP-Glucosa (ADPGlc), el sustrato inicial para la síntesis de almidón en el cloroplasto. Entre los enzimas implicados en esta ruta se pueden destacar la ADP-GLUCOSA PIROFOSFORILASA (AGPasa), enzima que produce ADPGlc a partir de glucosa-1-fosfato (Glc1P) y la GRANULE BOUND STARCH SYNTHASE 1 (GBSS1), enzima implicada en la formación del granulo de almidón mediante la polimerización de la cadenas de amilosa (Fig. 2-1 A). Aunque esta es la principal ruta de síntesis de ADPGlc, podrían existir otras rutas alternativas, como en el endospermo de las semillas de cereales, donde el ADPGlc se sintetiza en el citosol y es transportado dentro de los amiloplastos, aunque esta ruta citosólica podría ser específica de cereales, y no parece estar presente en *Arabidopsis* (Kirchberger *et al.*, 2008).

En cuanto al proceso de degradación del almidón en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticamente activos parece ser diferente al de los amiloplastos del endospermo de las semillas (al menos en cereales), aunque algunos de los enzimas son comunes a ambos sistemas. En los cloroplastos la degradación del almidón se produce a través de una red de reacciones en lugar de una vía lineal. Algunos de los enzimas importantes en este proceso son STARCH EXCESS 1 (SEX1)/ PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE (PWD), encargados de degradar los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6, que posteriormente continuarán degradándose hasta liberar maltosa (Streb and Zeeman, 2012) (Fig. 2-1 B).





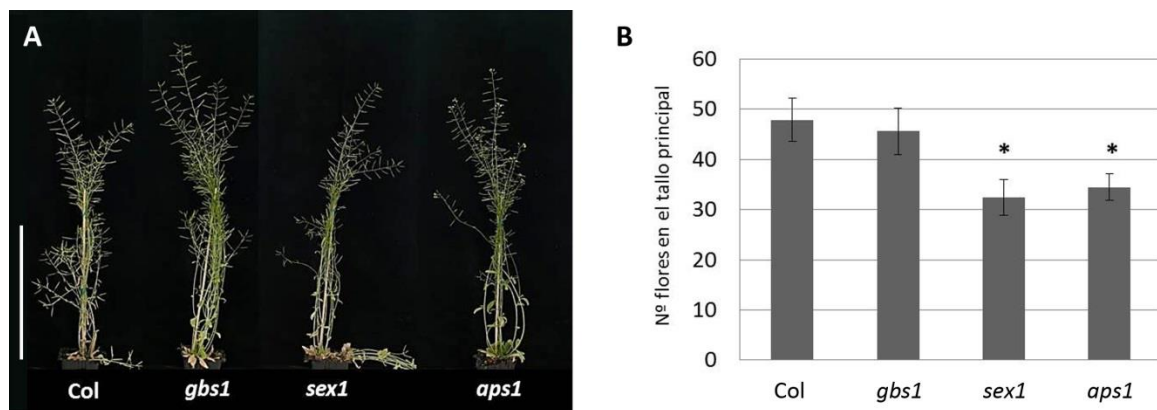
**Figura 2-1: Metabolismo del almidón. A) Ruta de síntesis de almidón en los cloroplastos durante el día:** El carbono asimilado a través del ciclo de Calvin se divide en una fracción que es exportada al citosol para la síntesis de sacarosa y una fracción que queda en el cloroplasto para la síntesis de almidón. La fructosa-6-fosfato (Fru6P) se convierte en glucosa-6-fosfato (Glc6P) por la acción de la glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI). La fosfoglucomutasa (PGM1) convierte el Glc6P en glucosa-1-fosfato (Glc1P). El último paso es catalizado por ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), que convierte Glc1P y ATP en ADPGlc y pirofosfato inorgánico (PPI). Posteriormente por acción de diferentes enzimas van polimerizando la molécula de almidón. **B) Proceso de degradación del almidón en los cloroplastos durante la noche:** El almidón se hidroliza a maltosa y glucosa durante la oscuridad. La fosforilación de la superficie de los gránulos por SEX1 y PWD puede permitir la acción directa de β-amilasas e isoamilasas. Imagen modificada a partir de Zeeman *et al.*, 2007 .

Como se ha comentado anteriormente la ruta de síntesis de almidón en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticamente activos se mantiene en otros tejidos, como el endospermo de las semillas en desarrollo, sin embargo no se conoce con claridad si ocurre lo mismo con las rutas de degradación.

Para explorar la posibilidad de que el metabolismo de almidón regulara el GPA, decidimos estudiar el fenotipo presentado por mutantes deficientes en la AGPasa y la GBSS1, ambas enzimas importantes en la ruta de biosíntesis de almidón y la SEX1, implicada en la degradación de almidón. La AGPasa cataliza el primer paso en la biosíntesis del almidón (Fig. 2-1 A). Se trata de un heterotetrámero compuesto por dos tipos de subunidades, dos subunidades largas con actividad catalítica y dos subunidades cortas que aportan estabilidad al complejo permitiendo su actividad. Se ha descrito un mutante que es deficiente en la subunidad ADP GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 1 (APS1), el mutante de inserción de T-DNA *aps1* (SALK\_040155; Alonso *et al.*, 2003), que carece de actividad ADP-Glucosidasa, por tanto es deficiente en la síntesis de almidón (no se ha detectado almidón ni en hojas ni en raíces). También muestra retraso de la floración bajo condiciones de día largo (Ventriglia *et al.*, 2008). La GBSS1 interviene en el siguiente paso de la ruta biosintética. Esta enzima está asociada al gránulo de almidón y es la encargada de polimerizar la cadena de amilosa. En el mutante de inserción de T-DNA *gbs1* (GABI914\_G01), que carece del enzima GBSS1 se ha observado una significativa reducción en la acumulación de almidón, asociada a la imposibilidad de sintetizar amilosa. Este mutante ha sido caracterizado en estudios de tiempo de floración y presenta retraso de la floración (Ortiz-Marchena *et al.*, 2014). Por otro lado el mutante de EMS *sex1* acumula gran cantidad de almidón al ser deficiente en uno

de los enzimas implicados en su degradación mediante la solubilización de las cadenas en la superficie del gránulo de almidón (Yu *et al.*, 2001) (Fig. 2-1 B).

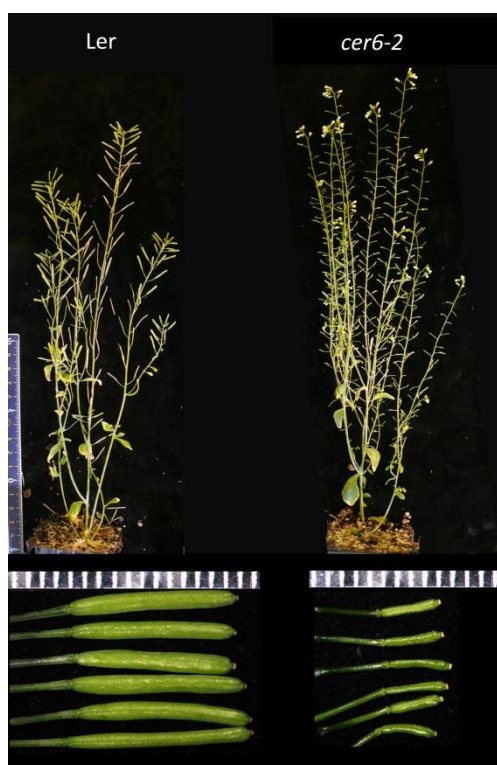
Para explorar si la alteración de los niveles de almidón podía afectar a la parada meristemática, decidimos estudiar el efecto de estas mutaciones sobre el GPA, cuantificando el número de flores producidas en la inflorescencia principal de estos mutantes. Tanto los mutantes *aps1* como los *sex1* presentaron un GPA más temprano, produciendo menor número de flores que las plantas silvestres, mientras que los mutantes *gbs1* no presentaron una disminución significativa de la producción de flores en la inflorescencia principal (Fig. 2-2). Estos resultados eran de algún modo contradictorios, puesto que tanto *aps1*, mutante que presenta deficiencias en la síntesis de almidón, como *sex1*, que acumula almidón en exceso, eran capaces de adelantar el GPA, mientras que los mutantes *gbs-1*, que acumulan menos almidón, no presentaban alteraciones en la parada meristemática. El metabolismo del almidón es complejo y consta de muchos intermediarios que podrían participar en la ruta de señalización entre semillas y SAM. Sin embargo con este primer abordaje que hemos realizado no podemos aportar ningún dato concreto sobre el posible papel del metabolismo del almidón en la regulación del GPA, aunque nuestros experimentos parecen apuntar a que podría ser un factor que participara en su control.



**Figura 2-2: Algunos mutantes deficientes en la biosíntesis o degradación de almidón adelantan el GPA, produciendo menos flores en la inflorescencia principal.** A) Comparación del fenotipo de plantas silvestres, mutantes deficientes en la síntesis de almidón (*gbs1* y *aps1*) y deficientes en su degradación (*sex1*). Barra de escala: 20 cm. B) Número de flores producidas en la inflorescencia principal de los mutantes *gbs1*, *sex1* y *aps1* en comparación a plantas silvestres. Las barras de error indican la desviación estándar de la media, n=10. \*diferencias significativas respecto a Col  $p \leq 0,05$  (test T-Student).

## Búsqueda de nuevos mutantes con alteración en el GPA

Para identificar nuevos mutantes que presentaran cambios en el GPA asociados a la ruta de las semillas, decidimos emplear un abordaje genético alternativo que no partiera de una hipótesis previa. Para ello, nos propusimos generar e identificar mutantes que en ausencia de producción de semillas se comportaran como plantas fértiles mediante mutagénesis sobre el fondo mutante *cer6-2*, que presenta androesterilidad condicional. *ECERIFERUM 6 (CER 6)* codifica una enzima implicado en el proceso de síntesis de lípidos de cadena larga (> 28 carbonos) y el mutante *cer6-2* presenta en su cutícula y en la cubierta del polen menor contenido en este tipo de lípidos, lo que impide que en condiciones de crecimiento de baja humedad relativa ( $\leq 50\%$ ) el polen absorba agua del estigma y germine, impidiendo la fertilización y el desarrollo del fruto (Fig. 2-3 panel de la derecha). En cambio, en condiciones de alta humedad relativa, el polen germina y los óvulos son fertilizados, obteniéndose frutos normales con semillas (Fiebig *et al.*, 2000; Preuss *et al.*, 1993). El mutante *cer6-2*, al igual que el resto de mutantes estériles, presenta un GPA tardío (Fig. 2- panel de la izquierda), por lo que el rastreo de poblaciones *cer-6* mutagenizadas podía permitir la identificación de mutaciones secundarias que causaran adelanto del GPA en ausencia de semillas y que pudieran revelar la participación de los genes implicados en la ruta de represión de la actividad meristemática en el SAM dependiente de las semillas.



**Figura 2-3: Comparación del fenotipo de plantas Ler y *cer6-2*.** El mutante *cer6-2*, a diferencia del silvestre Ler, es incapaz de autopolinizarse debido a la ausencia de lípidos de cadena larga en la cubierta de los granos de polen. Esto impide la formación de semillas, que a su vez repercute en el mantenimiento de la actividad meristemática, retrasando el GPA de estas plantas. Cuando en las plantas silvestres ya ha cesado la actividad meristemática con unas 40 flores, el mutante *cer6-2* continúa produciendo flores, llegando a formar hasta 100 flores.

Durante este trabajo hemos rastreado dos poblaciones mutagenizadas diferentes: por un lado, iniciamos el rastreo de una población obtenida por tratamiento con etil metano sulfonato (EMS) del mutante *cer6-2* ya disponible y, por otro, generamos y rastreamos una población de mutantes de activación etiquetada de genes (o “Activation Tagging”, en inglés) por inserción de T-DNAs portadores de cuatro copias del potenciador del promotor CaMV35S.

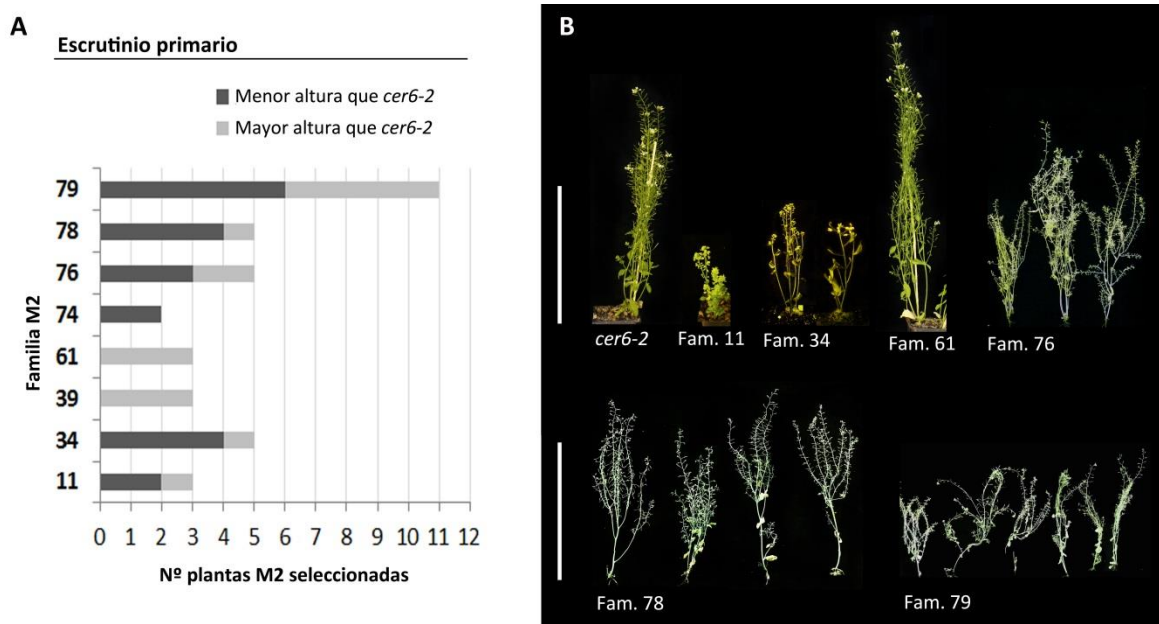
## Mutagénesis de EMS

Tuvimos acceso a una mutagénesis por tratamiento con etilmetilsulfonato (EMS) realizada sobre el fondo mutante *cer6-2* por el grupo de los doctores A. Martínez Laborda y A. Vera (Alonso Cantabrana, 2005), en la cual obtuvieron 94 familias M2, cada una compuesta por la descendencia de 20 plantas M1.

Este tipo de mutagénesis genera mutaciones puntuales irreversibles, principalmente transiciones de G/C a A/T. El efecto de la mutación dependerá de la posición del genoma en la que se haya producido, pero a menudo este tipo de mutagénesis altera la funcionalidad del gen afectado en diferente grado: pérdida de función, función parcialmente reducida, función cualitativamente alterada y función constitutiva (Maple and Møller, 2007; Redei and Koncz, 1992).

Como criterio de selección durante el escrutinio primario de la población de EMS, elegimos cambios en la altura de la planta. Los cambios en la altura de la planta no solo dependen del tiempo que se mantiene la actividad meristemática del SAM, sino que puede depender también y, posiblemente de forma más influyente, de la elongación de los entrenudos. A pesar de ello, dicho criterio de selección nos permitía reducir el trabajo necesario para realizar el escrutinio, por tanto seleccionamos plantas que presentaban mayor o menor altura que las plantas control *cer6-2*, cuyo fenotipo en relación con el GPA sería comprobado durante el escrutinio secundario, confirmando así en su caso si los cambios en la altura de la planta estaban asociados a cambios en la producción de frutos y por tanto a cambios en el momento del GPA.

Durante esta tesis doctoral se comenzó con el escrutinio de dicha población mutagenizadas. Realizamos el rastreo primario de 11 familias M2 (11, 34, 39, 61, 74, 76, 77, 78, 79, 90, 94), con 200 plantas de cada una de las familias. De las once familias estudiadas, solo encontramos plantas que coincidían con los criterios de selección en ocho de ellas. En total, durante el rastreo primario seleccionamos 37 plantas, 21 con menor altura que el control *cer6-2* y 16 con mayor altura. En figura 2-4 A se muestra su distribución en las diferentes familias. Debido a la androesterilidad condicional de *cer6-2* en las condiciones de crecimiento necesarias para realizar la selección, obtuvimos un número muy reducido de semillas de las plantas seleccionadas, y en algunas de ellas no conseguimos ninguna semilla. En la figura 2-4 B se muestra el fenotipo de algunas de las plantas seleccionadas por su mayor o menor altura respecto al control *cer6-2*.



**Figura 2-4: Rastreo primario.** A) Plantas seleccionadas durante el rastreo primario. B) Se muestra el fenotipo de algunas de las plantas seleccionadas. Barras de escala: 20 cm.

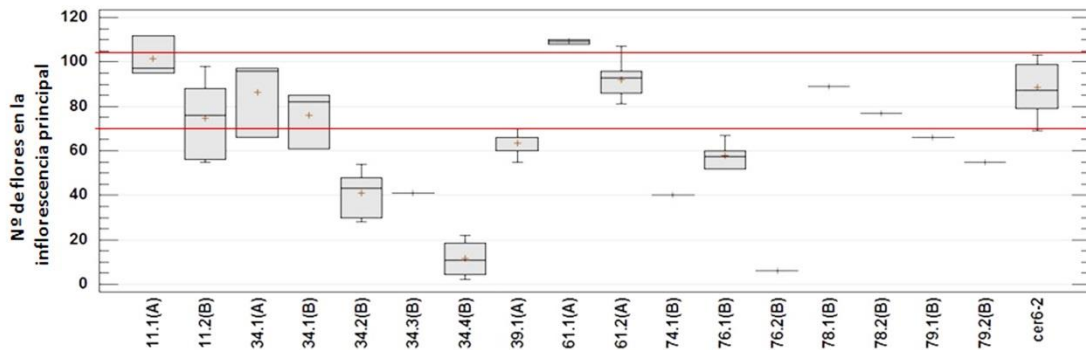
Sembramos la descendencia de todas las plantas seleccionadas durante el escrutinio primario de las que habíamos conseguido semillas y procedimos a realizar el escrutinio secundario para comprobar si las plantas mantenían las características por las que habían sido seleccionadas o si por el contrario habían sido un efecto del ambiente. También comprobamos si el aumento o disminución de la altura de la planta estaba asociada a una mayor o menor producción de frutos o si se debía a otras causas. Para ello realizamos el recuento de frutos en la inflorescencia principal de toda la descendencia de cada una de las plantas seleccionadas y también si mostraban otras alteraciones evidentes en el desarrollo de la planta.

Durante el rastreo secundario de la familia 11, la descendencia de la línea 11.1(B) nuevamente fue más baja que las plantas control, sin embargo, no la seleccionamos al presentar defectos en el desarrollo de las flores, formando flores sin pétalos o con menor número de ellos, recordando a los fenotipos típicos de los mutantes *ap1* (Fig. 2-5C, primer panel). La línea 11.2 (B), aunque era algo más baja que las plantas control, no presentó una reducción considerable en el número de flores producidas en la inflorescencia principal, mientras que *cer6-2* produjo una media de  $84,64 \pm 10,9$  frutos, esta línea produjo  $74,83 \pm 18$  frutos de media. De igual forma tampoco observamos diferencias entre las plantas control *cer6-2* y la línea 11.1(A), que produjo  $101 \pm 9,29$  (Fig.2-5 A y B).

A

		Nº frutos en el tallo principal				Otros fenotipos	Seleccionadas	
		Media	Max.	Min.	n			
<i>cer6-2</i>		88,64±10,9	103	69	10			
Plantas seleccionadas en el escrutinio primario	Familia 11	11.1 (B)	n.d.	n.d.	n.d.	Defectos en el desarrollo de las flores (similar a <i>ap1</i> )		
		11.2 (B)	74,83±18	98	55	6		
		11.1 (A)	101±9,29	112	95	3		
	Familia 34	34.1 (B)	76±13,07	85	61	3		
		34.2 (B)	41,14±9,38	54	28	7	Defectos en el desarrollo de la inflorescencia y flores (similar a <i>wus</i> )	
		34.3 (B)	41	n.d.	n.d.	1	Defectos en el desarrollo de la inflorescencia y flores	
		34.4 (B)	11,5±8,8	22	2	4	Defectos en el desarrollo de la inflorescencia y flores	
		34.1 (A)	86,33±17,61	97	66	3		
	Familia 39	39.1 (A)	63,33±5,89	70	55	5		X
	Familia 61	61.1 (A)	109±1,41	110	108	2	Floración tardía	
		61.2 (A)	92,09±7,1	107	81	10	Floración tardía	
	Familia 74	74.1 (B)	40	n.d.	n.d.	1		X (no semillas)
	Familia 76	76.1 (B)	57,66±5,6	67	52	6		X
		76.2 (B)	4	n.d.	n.d.	1	Mayor producción de hojas caulinares	X
	Familia 78	78.1(B)	89	n.d.	n.d.	1	Poca elongación entrenudos	
78.2(B)		77	n.d.	n.d.	1			
Familia 79	79.1(B)	68	n.d.	n.d.	1		X (no semillas)	
	79.2(B)	55	n.d.	n.d.	1		X	

B



C



**Figura 2-5: Rastreo secundario.** En la tabla se muestra la producción de flores en la inflorescencia principal de las líneas evaluadas, así como diferentes alteraciones en el desarrollo de la planta independientes del control del GPA. En la última columna se marca con una x las líneas que sería interesante continuar evaluando (n.d.= datos no disponibles). B) Gráfico de caja y bigotes de la producción de flores en la inflorescencia principal de las líneas evaluadas en comparación al control *cer6-2*. Las líneas rojas marcan el intervalo de producción de flores presentado por las plantas control *cer6-2*. C) Se muestran algunos de los fenotipos observados en los mutantes evaluados: 11.1 (B) flores similares a las formadas en el mutante *ap1*; 34.2 (B) fenotipos similares al mutante *wus*; 61.1 (A) y 61.2(A) severo retraso de la floración. Barra de escala: 3 cm.



En la familia 34, de las cuatro plantas M2 seleccionadas inicialmente por presentar menor altura que las plantas control solo la descendencia de las plantas 34.2 (B), 34.3 (B) y 34.4 (B) alcanzaron menor altura, pero no las consideramos interesantes debido a la presencia de alteraciones en el desarrollo de la inflorescencia y de las flores, como, por ejemplo, defectos típicos de los mutantes *wus* presentes en la línea 34.2 (B) (Fig. 2-5C, 2º panel). La planta 34.1(A) que fue seleccionada durante el escrutinio primario por haber alcanzado mayor altura que las plantas *cer6-2* control, durante este el escrutinio secundario fue descartada al producir un número similar de flores en la inflorescencia principal que *cer6-2*. Por tanto de esta familia no fue seleccionada ninguna línea (Fig.2-5 A y B).

En la familia 39 tan solo pudimos continuar con el escrutinio de la planta 39.1(B) ya que de las otras dos plantas seleccionadas no conseguimos semillas. La descendencia de esta planta produjo menor número de flores en la inflorescencia principal, con  $63,33 \pm 5,89$  frutos de media, máximo de 70 frutos y un mínimo de 55, en comparación a las plantas *cer6-2* que formaron una media de  $84,64 \pm 10,9$  flores, con un máximo de 103 y un mínimo de 69. Este mutante resultaba especialmente interesante, ya que su GPA era significativamente más temprano que el del fondo *cer6-2* en condiciones de esterilidad (Fig.2-5 A y B).

De la familia 61, la descendencia de las plantas 61.1(A) y 61.2(A) seleccionadas previamente en el escrutinio primario por alcanzar mayor altura que las plantas control, mostraron un fuerte retraso de la transición floral, produciendo mayor número de hojas que el control (Fig. 2-5 C, 3º panel). Por lo general estas plantas produjeron más frutos que el control, 61.1(A) con  $109 \pm 1,41$  flores de media y 61.2(A) con  $92,09 \pm 7,1$  flores de media. No obstante, como pensábamos que tal vez el retraso de la floración podría estar influyendo en la producción de flores, descartamos estas líneas.

En la familia 74 solo pudimos recoger una semilla de una de las plantas bajas seleccionadas, que durante el escrutinio secundario produjo tan solo 40 flores en la inflorescencia principal. Desafortunadamente no conseguimos recoger ninguna semilla de esta planta, por lo que perdimos esta línea seleccionada. Sin embargo, podríamos volver a la generación M2 y volver a identificar mutantes con efectos similares dentro de la familia M2-74.

En la familia 76 la descendencia de la planta 76.1(B) produjo  $57,66 \pm 5,6$  de media en la inflorescencia principal (Fig. 2-5 A y B), sin mostrar ningún otro tipo de defecto en el desarrollo de la planta distinto a los presentados por el fondo genético *cer6-2* (Fig. 2-5 C 4º panel). De la planta 76.2(B) solo pudimos recoger una semilla y tras sembrarla y completar su ciclo de vida observamos que solo había producido 4 flores en la inflorescencia principal además de presentar mayor número de hojas caulinares (Fig. 2-5 C 5º panel). Seleccionamos ambas líneas para posteriores estudios.

En la familia 78 tan solo pudimos continuar con el escrutinio secundario de las líneas 78.1(B) y 78.2(B), ya que del resto de plantas seleccionadas no conseguimos semillas. Durante el escrutinio secundario no observamos diferencias de producción de flores en la inflorescencia principal frente a las plantas control. No obstante, la línea 78.1(B) seguía presentando menor altura a causa de una menor elongación de los entrenudos. De esta familia no seleccionamos ninguna línea.

## CAPÍTULO 2

La familia 79 fue la que mayor número de plantas seleccionadas tuvo durante el escrutinio secundario, sin embargo solo conseguimos una semilla de dos de las plantas de menor altura. Durante el escrutinio secundario las líneas 79.1(B) y 79.2(B) produjeron 68 y 55 flores en la inflorescencia principal respectivamente, por lo que entraban dentro de los criterios de selección que habíamos establecido.

En total, tras el escrutinio secundario seleccionamos 6 líneas, de las que pudimos recoger semillas únicamente de 4 de ellas: 39.1(A); 76.1(B); 76.2(B) y 79.2(B).

El fenotipo de estas líneas podría estar causado por la mutación de un gen candidato a regular la parada de la actividad meristemática mediante la ruta de control del SAM dependiente de semillas, por lo que sería interesante continuar este trabajo con la identificación de las mutaciones causantes y la caracterización del posible papel de los genes implicados en esta ruta.

### **Mutagénesis de Activation tagging:**

Paralelamente al apartado anterior, llevamos a cabo una mutagénesis de activación etiquetada de genes, transformando plantas *cer6-2* con el vector pSKI015, que contiene cuatro copias de una secuencia potenciadora de la transcripción del promotor CaMV35S, que es capaz de aumentar la expresión de los genes contiguos a la inserción del T-DNA, desde su propia caja TATA y por tanto genera con frecuencia mutantes de ganancia de función con herencia dominante. La inserción del T-DNA también genera mutantes de pérdida de función si se produce en la secuencia codificante de algún gen, mostrando por lo general en este caso un patrón de herencia recesivo.

Algunas de las ventajas de este tipo de mutagénesis frente a la de EMS, que hemos empleado en el apartado anterior, es que se pueden identificar mutantes en genes que presentan redundancia génica, pues la sobreexpresión de dicho gen ya puede generar un fenotipo mutante, mientras que mediante mutagénesis que causan la pérdida de función sería necesario mutar varios de los genes redundantes para conseguir un fenotipo diferencial. Además, se simplifica la identificación del gen mutado, puesto que solo hay que localizar el punto de inserción del T-DNA, mediante rescate plasmídico o secuenciación del genoma, y posteriormente estudiar si el fenotipo está causado por la pérdida de función del gen donde se localiza la inserción, o si se debe al aumento de expresión de algunos de los genes situados en regiones cercanas a la inserción.

El objetivo final de esta mutagénesis era conseguir una población de entre 2000 y 4000 líneas transgénicas independientes, que aunque no llega a representar un genoma saturado de inserciones, sería suficientemente amplio para una primera aproximación. Tras la transformación de plantas *cer6-2*, procedimos a la selección de líneas T1. Durante este trabajo de tesis doctoral llegamos a seleccionar 233 líneas T1, con las que se comenzó a realizar el escrutinio en busca de mutantes con alteraciones en el GPA.

Como el principal criterio de selección que íbamos a aplicar durante el escrutinio era una menor o mayor producción de flores que el control, era recomendable contar con más de una planta de cada línea transgénica para que los recuentos de flores fueran más representativos, y como además para posteriores comprobaciones de las características seleccionadas necesitaríamos semillas de las líneas transgénicas, decidimos crecer las líneas T1 en condiciones de elevada



humedad relativa, para que produjeran un número suficiente de semillas, y posteriormente realizar el escrutinio primario en la generación T2.

Las líneas 1-196 se crecieron en condiciones de alta humedad para permitir la fertilización y producción de semillas T2. Para realizar el rastreo primario en la generación T2, sembramos las semillas de cada una de las líneas y cuando contaban con 4 hojas de roseta fueron tratadas con una solución de glufosinato amónico para eliminar aquellas plantas que no portaban el T-DNA. Finalmente nos quedamos con 12 plantas resistentes al agente de selección de cada una de las líneas transgénicas independientes, sobre las que realizamos el rastreo primario.

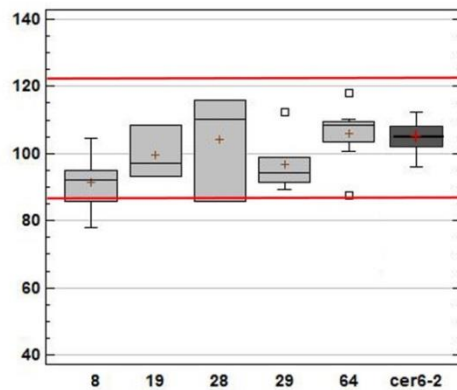
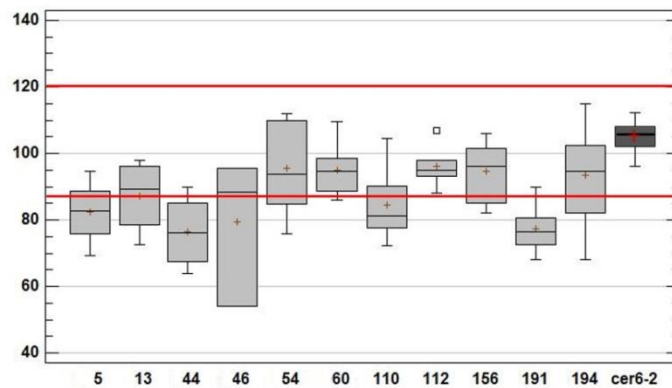
El criterio de selección que habíamos propuesto para la selección de posibles mutantes fue que al menos un tercio de plantas evaluadas en cada una de las líneas transgénicas produjeran más o menos de 10 flores que la planta control *cer6-2* con mayor o menor producción de flores respectivamente. Con estos criterios, seleccionamos en la generación T2, cinco líneas transgénicas independientes con mayor producción de flores o GPA retrasado, y ocho líneas transgénicas independientes con menor producción de flores o GPA adelantado (Tabla 2-1). Además de las líneas transgénicas seleccionadas con estos criterios, decidimos añadir otras líneas en las que algunas plantas presentaban adelantos drásticos del GPA aunque no llegaran a representar un tercio de los individuos T2 (Tabla 2-1).

**Tabla 2-1: Resultados del escrutinio primario.** Se indica el número de las líneas donde al menos un tercio de las plantas T2 produjo más o menos de 10 flores que la planta control *cer6-2* con mayor o menor producción de flores respectivamente. Aunque fuera de los criterios de selección, también seleccionamos líneas donde algunas de las plantas T2 habían producido una disminución considerable en la producción de flores en la inflorescencia principal.

<b>Mayor producción de flores</b>	En al menos 1/3 de las plantas evaluadas	8, 19, 28, 29, 64
<b>Menor producción de flores</b>	En al menos 1/3 de las plantas evaluadas	5, 13, 44, 46, 54, 60, 110, 112
	Solo en 1 o 2 plantas	156,158, 171, 173, 174, 191, 194

Para comprobar que el fenotipo de retraso o adelanto del GPA de las líneas seleccionadas en la generación T2 se debía a la inserción del T-DNA, recogimos semillas T3 para posteriormente realizar el escrutinio secundario. Lamentablemente, las líneas 158, 171, 173 y 174 resultaron totalmente estériles y no pudimos seguir trabajando con ellas.

Durante el escrutinio secundario, sobre la generación T3, nuevamente realizamos el conteo de flores producidas en la inflorescencia principal de las plantas crecidas en condiciones de baja humedad relativa, es decir, favoreciendo la esterilidad. Ninguna de las líneas seleccionadas por mayor producción de flores mostró el fenotipo por el que se habían seleccionado, produciendo todas ellas similar número de flores que las plantas control *cer6-2* (Fig. 2-6). En el caso de las líneas seleccionadas por una menor producción de flores en la inflorescencia principal, cinco de las líneas (5, 25, 44, 46 y 191) volvieron a tener una producción de flores por debajo del umbral establecido, aunque en ninguna de ellas fue en el 100% de las plantas evaluadas. La línea 191 fue la que presentó mayor número de plantas en la generación T3 que mantuvieron el fenotipo de adelanto del GPA seleccionado durante el escrutinio primario (Fig.2-6).

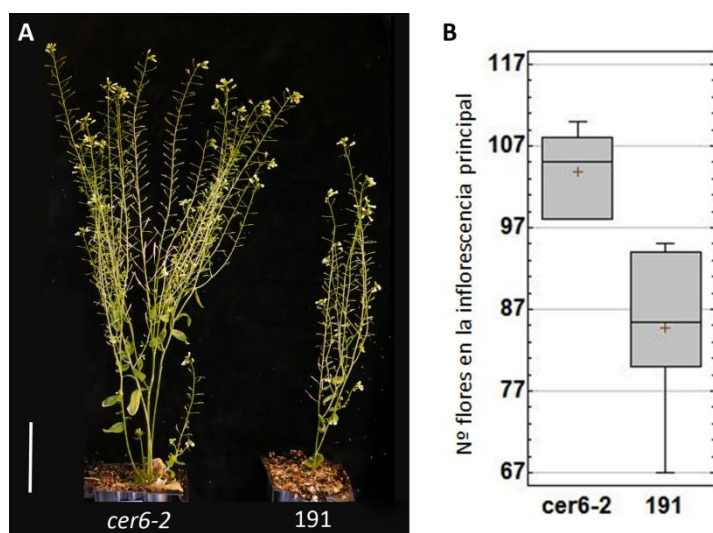
**A** Líneas seleccionadas en el escrutinio primario por retrasar el GPA**B** Líneas seleccionadas en el escrutinio primario por adelantar el GPA

**Figura 2-6: Escrutinio secundario:** Recuento del número de flores producidos en la inflorescencia principal de las plantas T3 de las líneas transgénicas seleccionadas durante el escrutinio primario, (n=3-12). Las líneas rojas marcan el umbral de selección. + indica la media muestral.

Como en la mayoría de las líneas transgénicas crecidas en condiciones de baja humedad relativa (esterilidad), habíamos conseguido recuperar algunas semillas, decidimos cambiar la estrategia de trabajo y realizar el escrutinio primario en la generación T1, para agilizar el proceso de selección. Para ello se seleccionaron líneas T1 resistentes y se crecieron en condiciones de baja humedad, donde las plantas presentan una tasa de fertilidad muy baja. Mediante este procedimiento se escrutaron en T1 las líneas 197-233. El criterio de selección que empleamos fue una mayor o menor altura de la planta que estuviera asociada a una mayor o menor producción de flores. Durante este escrutinio no encontramos ninguna línea que cumpliera con los criterios de selección.

Tras el escrutinio secundario, las líneas que mejor se ajustaban a los criterios de selección fueron las líneas 5, 44, 46 y 191, siendo esta última la que menor variación en el número de frutos en la inflorescencia principal mostró. Por todo ello decidimos continuar trabajando con la línea 191 para identificar el gen mutado, que podría estar causando el adelanto del GPA a pesar de que la planta fuera prácticamente estéril.

Volvimos a sembrar las semillas T3 de la línea 191. Tras aplicar el tratamiento con glufosinato amónico, todas las plantas fueron resistentes, por lo tanto debíamos de estar trabajando con la inserción del T-DNA en homocigosis. Tras evaluar la producción de flores en la inflorescencia principal, nuevamente estas plantas produjeron menor número de flores en la inflorescencia principal que *cer6-2* (Fig. 2-7).

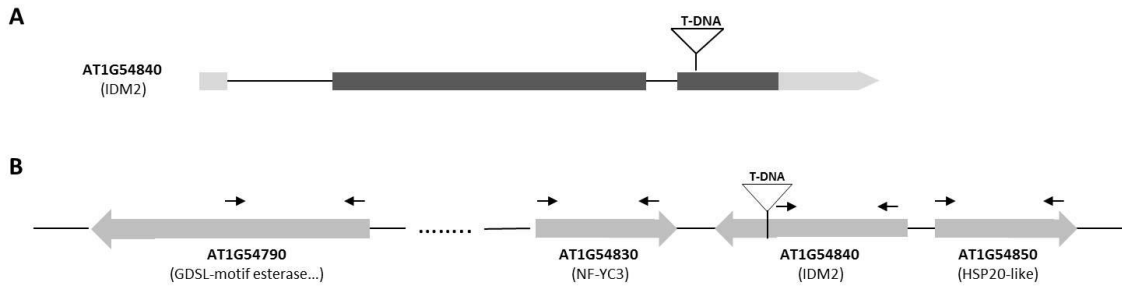


**Figura 2-7: Fenotipo de la línea transgénica 191.** A) Comparación del aspecto fenotípico de la línea transgénica 191 con *cer6-2*. El mutante 191 muestra adelanto del GPA. Barra de escala: 5 cm. B) Producción de flores en la inflorescencia principal de plantas control *cer6-2* y mutante 191.

Para identificar la posición de la inserción del T-DNA decidimos secuenciar el genoma completo de la línea 191 mediante una plataforma de secuenciación masiva y posteriormente localizar la posición del T-DNA.

La inserción se encontraba localizada al principio del tercer exón del gen AT1G54840, concretamente entre las coordenadas 20.132.264 y 20.132.290 del cromosoma 1 (Fig. 2-8 A). Este gen, también llamado *INCREASED DNA METHYLATION 2 (IDM2/ROS5)* codifica un miembro atípico de la familia HSP20 implicado en la desmetilación (Li *et al.*, 2015c; Qian *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014).

En este tipo de mutagénesis, donde se produce la inserción de la secuencia potenciadora de la transcripción del promotor 35S en el genoma de la planta, suele producirse la activación de la expresión de alguno de los genes localizados alrededor de la inserción del T-DNA. Buscamos en la secuencia de la línea 191 cuales eran los genes que se encontraban situados alrededor de la zona de inserción del T-DNA. El gen más cercano aguas abajo es el *HSP20-like CHAPERONE SUPERFAMILY PROTEIN (AT1G54850)*, a unas 1.500 pb, en sentido directo. El gene más cercanos aguas arriba es *NUCLEAR FACTOR Y SUBUNIT C3 (NF-YC3, AT1G54830)*, aunque está en sentido directo también. El gen más cercano aguas arriba de la inserción en sentido reverso se localiza a unas 9 kb. Este gen es *GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase (AT1G54790)* (Fig. 2-8 B).



**Figura 2-8: Localización de la inserción del T-DNA en el gen *IDM2*.** A) La inserción del T-DNA se encuentra al inicio del tercer exón del gen *IDM2*. La región codificante está representada en gris oscuro y las regiones 5'UTR y 3'UTR en gris claro. Los rectángulos corresponden a los exones y las líneas a los intrones. Se representa AT1G54840.1 según la información disponible en el TAIR. B) Genes localizados alrededor del T-DNA. El gen más cercano aguas abajo, a unas 1.500 pb, es *HSP20-like chaperones superfamily protein* (AT1G54850). Aguas arriba, el gen más cercano es *NUCLEAR FACTOR Y-SUBUNIT C3 (NF-YC3)*, AT1G54830, aunque está en sentido directo. El gen más cercano aguas arriba en sentido reverso es *GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase* (AT1G54790), aunque se localiza a unas 9 kb de la inserción del T-DNA. Las flechas negras sobre la secuencia codificante de cada gen indican la posición de los cebadores empleados en la PCR semicuantitativa.

Analizamos mediante RT-PCR semicuantitativa el nivel de expresión de dichos genes en la línea 191 y en el control *cer6-2*. Extrajimos RNA a partir de hojas y, tras la síntesis de cDNA, amplificamos una región de la secuencia codificante de los diferentes genes, empleando los cebadores indicados en la figura 2-9 B. Mediante esta técnica no detectamos diferencias de expresión entre las plantas *cer6-2* y la línea 191 para los genes At1G54830 ni At1G54840. Es posible que el T-DNA causara un ligero aumento en el nivel de expresión del transcrito del gen At1G54850, puesto que en el mutante la intensidad del amplicón fue ligeramente mayor que en el control, a pesar de que como indica la PCR control de Actina en el control la concentración de cDNA empleada para la amplificación fue algo mayor que en el mutante 191 (Fig. 2-9). Para el gen At1G54790 no obtuvimos amplificación en ninguna de las muestras.

	<i>cer6-2</i>	191
At1G54790 ( <i>SFAR1</i> )	n.d.	n.d.
At1G54850 ( <i>HSP20-like</i> )		
At1G54830 ( <i>NF-YC3</i> )		
At1G54840 ( <i>IDM2</i> )		
Actina		

**Figura 2-9: RT-PCR semicuantitativa de los genes localizados alrededor de la inserción del T-DNA.** Se muestra la amplificación a ciclo 25 y 27 de muestras control *cer6-2* a la izquierda y mutante 191 en cada uno de los genes. Como control interno se ha empleado la Actina.

Aunque resultados son tan sólo preliminares y sería necesario emplear una técnica más sensible para confirmarlos, como Q-RT-PCR, parecen indicar que la inserción del T-DNA no causa alteraciones de gran magnitud en los niveles de expresión de los genes adyacentes a la inserción. Como, por otro lado, el fenotipo de adelanto del GPA lo observamos cuando el T-DNA se encontraba en homocigosis, los resultados parecían sugerir que la inserción del T-DNA estuviera causando una mutación recesiva de pérdida de función del gen donde se localizaba. Para comprobar esta hipótesis hemos identificado otros posibles mutantes de pérdida de función de este gen en las colecciones de mutantes disponibles (SALK\_130656.45.15), para el que en futuros experimentos caracterizaremos el momento en el que aparece el GPA tanto si no se impide la formación de semillas como si se hace mediante podado manual de los frutos en desarrollo.



## DISCUSIÓN

En este capítulo hemos pretendido aportar algo de información sobre posibles factores que puedan estar implicados en el mecanismo molecular que subyace bajo dos de las hipótesis propuestas sobre el control de la senescencia monocárpica. Una de ellas es la existencia de relaciones fuente-sumidero entre los órganos vegetativos, que actúan como fuente de recursos, hacia los órganos reproductivos o los meristemas apicales, que actúan como sumideros, y la segunda es el control del GPA por parte de la producción de semillas. Ambas hipótesis están relacionadas, puesto que tanto el desarrollo de las semillas como la división celular y formación de nuevas flores consumirían gran cantidad de nutrientes, por lo que para evitar poner en peligro el desarrollo completo de los frutos y semillas ya formadas, debería existir un mecanismo de parada de la actividad meristemática.

En plantas monocárpicas la inducción de la senescencia podría desencadenarse como respuesta a la relocalización de nutrientes, desde los órganos vegetativos a los órganos en desarrollo, ya que existen evidencias de un transporte de nutrientes (azúcares, compuestos nitrogenados, etc.) entre estos órganos, y algunos ensayos realizados en leguminosas indican que la senescencia se retrasa en genotipos que presentan una tasa de crecimiento reproductivo más lenta, permitiendo una asignación continua de recursos al crecimiento vegetativo (revisado en (Davies and Gan, 2012). Aunque no se conoce exhaustivamente el mecanismo molecular que causa este efecto, se ha propuesto que cambios en la proporción de sacarosa y hexosas llevan al desencadenamiento de diferentes rutas de transducción de señales que terminan promoviendo la senescencia (Smeekens *et al.*, 2010).

Todos los trabajos realizados en torno a estudiar el efecto de las relaciones fuente-sumidero y la removilización de nutrientes se han centrado en el estudio de la senescencia de los órganos vegetativos, que aunque en plantas monocárpicas está ligado a la senescencia de la planta entera, no coincide exactamente, dejando de lado el efecto sobre la actividad del SAM y la aparición del GPA. La senescencia de la planta entera en las especies o variedades monocárpicas se debe a la senescencia de los órganos vegetativos pero sobre todo a la senescencia de los todos los SAMs, que impide que se generen nuevos órganos vegetativos que permitan el crecimiento durante la siguiente temporada (Amasino, 2009). Tanto la senescencia de las hojas, como la de los meristemas inflorescentes podrían considerarse un mecanismo para permitir que todos los nutrientes sean destinados al desarrollo de los órganos reproductivos. En las hojas la senescencia comienza, en respuesta a una serie de señales endógenas y ambientales, con la activación de procesos de degradación de los componentes celulares (Lim *et al.*, 2003). Sin embargo, en el meristemo apical el proceso no es tan directo. Tras el GPA se para la actividad meristemática, pero no se activa una degeneración celular sino que el meristemo entra en un estado de dormición del cual podría reactivarse (Wuest *et al.*, 2016). Posteriormente, comenzaran los procesos típicos de la senescencia. Por ello, aunque todavía no se ha estudiado este proceso, es posible que la senescencia del meristemo apical del tallo se pueda dividir en varias fases, finamente reguladas por multitud de señales endógenas y ambientales. La primera fase se iniciaría con el GPA, donde el meristemo se mantendría en un estado latente y durante una segunda fase se produciría la degradación propia del proceso senescente.

Los trabajos basados en la segunda hipótesis, centrados en el estudio del control de la senescencia monocárpica por parte de la producción de semillas, han tenido en cuenta los eventos que ocurren en el meristemo inflorescente durante el final del ciclo de vida de la planta. Se ha tratado de identificar qué tipo de señales procedentes de las semillas en desarrollo son las causantes del adelanto o retraso el GPA, aunque solo se ha llegado a confirmar el efecto de la ausencia de semillas (Bleecker and Patterson, 1997; Hensel L. *et al.*, 1994; Wuest *et al.*, 2016).

### **Cambios en el metabolismo de almidón afectan al GPA**

Nosotros, en el primer apartado de este capítulo, hemos pretendido estudiar el efecto sobre el GPA de la alteración en las rutas metabólicas que dirigen el proceso de biosíntesis de almidón. Aunque el metabolismo de almidón está bien caracterizado en los tejidos fotosintéticamente activos, como las hojas, en los que se han descrito que participan multitud de rutas (Andriotis *et al.*, 2010; Ball and Morell, 2003; Grennan, 2006; Kötting *et al.*, 2010; Streb and Zeeman, 2012), se piensa que también son aplicables en semilla (embrión o endospermo) (Streb and Zeeman, 2012). Puesto que nuestra intención era exploratoria, seleccionamos solo un número reducido de mutantes para su estudio. Así, los mutantes caracterizamos preliminarmente fueron: *aps1*, que carece de la síntesis de almidón al eliminar la actividad ADP-Glucosidasa (Ventriglia *et al.*, 2008); *gbs1*, que al carecer de la actividad de la enzima GBSS1 no puede polimerizar cadenas de amilosa y ello reduce la tasa de síntesis de acumulación de almidón (Ortiz-Marchena *et al.*, 2014); y *sex1*, que es incapaz de degradar el almidón al ser deficiente en uno de los enzimas encargado en la solubilización del gránulo de almidón (Yu *et al.*, 2001). Todos estos genes afectados por las mutaciones seleccionadas presentan un amplio patrón de expresión en la planta, salvo en raíz y semillas maduras, donde no parece que se expresen (<http://bar.utoronto.ca>; <http://travadb.org>).

Para estudiar el efecto de acumulación o falta de almidón en la planta sobre el GPA, realizamos el recuento del número de flores producidas en la inflorescencia principal y los resultados que obtuvimos fueron algo desconcertantes. El mutante *gbs1* no mostró ningún tipo de efecto sobre el GPA, pero tanto el mutante *aps1*, deficiente en la síntesis de almidón, como *sex1*, deficiente en su degradación, adelantaron el GPA.

EL resultado obtenido con *gbs1* puede ser debido a que a pesar de no sintetizarse amilosa, el gránulo de almidón sigue formándose únicamente con amilopectina, aunque se reduce su tasa de acumulación (Ortiz-Marchena *et al.*, 2014). Por tanto, aunque esté alterada la tasa de síntesis y composición del almidón, no sería impedimento para mantener mecanismos moleculares que regularan el mantenimiento de la actividad del SAM o por el contrario que reprimieran a aquellos factores que pudieran estar promoviendo el GPA.

Sin embargo, la explicación del efecto de los mutantes *sex1* y *aps1* es más complicada. Como ya hemos comentado las rutas de biosíntesis de azúcares es muy compleja, formando una red de rutas que interaccionan unas con otras y que en ausencia de una de ellas los sustratos intermediarios son integrados en otras rutas (Bar-Peled and O'Neill, 2011). Todo ello podría ser explicación de por qué tanto un mutante deficiente en la síntesis de almidón como en la degradación puedan tener el mismo fenotipo de adelanto del GPA. En el mutante *aps1*, la ruta de biosíntesis de almidón está bloqueada a nivel de la ADP-Glucosa, por lo cual, podría estar



acumulándose su sustrato, la Glucosa-6-Fosfato (Glc6P) u otros intermediarios de la ruta. En el mutante *sex1*, el exceso de almidón podría estar regulando de alguna forma la ruta biosintética y que se estuvieran acumulando además de almidón otros metabolitos intermedios. Por tanto, un posible punto en común entre ambos mutantes podría ser la acumulación de intermediarios de la ruta de biosíntesis del almidón. Además se ha sugerido la existencia de una relación entre cambios en las proporciones de hexosas y sacarosas con la activación de procesos de muerte celular y removilización de nutrientes asociados a la senescencia de los órganos (Smeekens *et al.*, 2010; Thomas, 2013). Con todo ello podríamos pensar que en los mutantes *aps1* y *sex1*, donde el metabolismo de almidón está alterado, se podrían estar viendo afectadas las proporciones normales entre hexosas y sacarosa disponible, que activara el comienzo de la senescencia en los órganos fotosintéticamente activos y que esto a su vez llevara a la activación del GPA. No obstante todo son especulaciones y podría existir otro tipo de relaciones que no hayamos contemplado y que puedan explicar mejor el adelanto del GPA de estos mutantes.

Aunque el trabajo que hemos realizado en relación a este tema es muy preliminar, hemos comprobado que los mutantes *aps1* y *sex1* presentan cambios en el GPA, que deben estar relacionados de alguna manera con las mutaciones en los enzimas de síntesis o degradación del almidón. Por tanto, sería interesante seguir trabajando con estos mutantes y estudiar en mayor profundidad si hay una relación con las semillas en desarrollo. ¿La alteración del metabolismo de almidón únicamente en las semillas podría activar la parada de la actividad meristemática?, ¿es la senescencia de los órganos vegetativos, activada por la captación de nutrientes de los órganos sumidero, lo que desencadena la señalización que hace que el meristemo entre en dormición? Aun son muchas las incógnitas presentes en esta área de trabajo que pueden representar nuevas vías de investigación.

### **La identificación de nuevos mutantes podría facilitar el estudio de la ruta de señalización entre semillas y meristemo**

Junto con los experimentos exploratorios comentados en el apartado anterior, abordamos una estrategia que no requería de hipótesis previas o candidatos: la identificación de mutantes con fenotipos interesantes.

Mediante el rastreo de poblaciones mutagenizadas buscando fenotipos relacionados con procesos del desarrollo específicos se han conseguido descifrar numerosas rutas genéticas (McCallum *et al.*, 2000; Parinov and Sundaresan, 2000; Weigel *et al.*, 2000). Existen distintos tipos de aproximaciones para la mutagénesis de plantas (Kodym and Afza, 2003; Krysan *et al.*, 1999; Weigel *et al.*, 2000). En este trabajo hemos empleado dos de ellos, una mutagénesis inducida por un agente químico, etilmetilsulfonato (EMS), y una mutagénesis debida a la inserción de un T-DNA que contenía cuatro copias del potenciador del promotor de expresión constitutiva CaMV35S.

Ambas estrategias de mutagénesis se realizaron sobre el fondo genético androestéril condicional *cer6-2* (estéril en condiciones de crecimiento de baja humedad relativa) con el objetivo de identificar preferentemente mutantes que se comportaran, en el aspecto relativo al GPA, como si fueran fértiles en estas condiciones.

## CAPÍTULO 2

Con la mutagénesis de EMS, aunque el número de familias M2 escrutadas no ha sido muy elevado, y sería conveniente continuar con el escrutinio de otras familias, hemos conseguido seleccionar seis líneas mutantes (dos de ellas totalmente estériles) que muestran un GPA adelantado a pesar de ser estériles o prácticamente estériles, por lo que los genes mutados podrían estar relacionados con la regulación de la parada de la actividad meristemática mediante la vía de señalización procedente de las semillas. Con las dos líneas mutantes totalmente estériles no podemos continuar con su estudio. Pero se podría volver a aislar nuevamente esos mutantes a partir de la generación M2 del grupo parental en el que fueron encontrados, donde sería factible el aislamiento de individuos heterocigóticos portadores de la mutación. Para todos los mutantes seleccionados durante este trabajo queda para el futuro realizar tanto una mejor caracterización de los efectos de la mutación como la identificación del gen afectado por ella. En primer lugar, sería necesario retrocruzarlos tanto con la línea parental como con estirpes silvestres, para eliminar mutaciones secundarias, observar el efecto sobre el GPA en ausencia de la mutación *cer6-2* y determinar el patrón de herencia de la mutación. Por otra parte, para identificar la mutación causante habría que realizar un cartografiado genético como antesala de la identificación molecular de los genes afectados, para lo cual emplearíamos estrategias de secuenciación masiva si con el cartografiado no nos indica genes candidatos.

El otro abordaje que hemos llevado a cabo es la mutagénesis de *Activattion tagging* (Weigel *et al.*, 2000). Este tipo de abordaje presenta una serie de ventajas frente a la mutagénesis de EMS. Por ejemplo la posibilidad de encontrar mutantes en genes que presenten un alto grado de redundancia. Con una aproximación por EMS, sería necesario mutar todos los genes implicados en la regulación de un carácter para observar un fenotipo diferencial, algo altamente improbable. Sin embargo, mediante *Activattion tagging*, la activación de la expresión endógena de uno de los genes es suficiente para generar un fenotipo mutante que podamos seleccionar. También se pueden identificar mutaciones que en homocigosis sean letales, ya que se puede trabajar con ellas en heterocigosis. Y la identificación del gen mutado es más sencilla, puesto que mediante rescate plasmídico o secuenciación del genoma se puede localizar el punto de inserción del T-DNA y estudiar cuál de los genes situados alrededor de la inserción está viendo afectada su expresión.

El objetivo inicial marcado fue conseguir una población de entre 2000 y 4000 líneas transgénicas independientes del cual durante el transcurso de esta tesis se ha llegado a seleccionar 233 líneas T1 independientes, portadoras del T-DNA. De las cuatro líneas seleccionadas tras el escrutinio secundario decidimos continuar trabajando con la 191, ya que presentaba un fenotipo de adelanto del GPA más acusado. Tras la secuenciación del genoma completo de esta línea, identificamos que el T-DNA se encontraba insertado en el gen *IDM2/ROS5*.

IDM2 pertenece a la familia SMALL HEAT SHOCK PROTEIN 20 (sHSP20). Esta pequeña familia de proteínas de choque térmico está ampliamente distribuida en procariotas y eucariotas y se define por un motivo conservado de 100 a 110 aminoácidos conocido como dominio  $\alpha$ -cristalino. IDM2 se considera un miembro atípico de esta familia ya que no responde a estrés térmico. La función que se le ha atribuido es la regulación de la demetilación activa (Li *et al.*, 2015c; Qian *et al.*, 2014). De forma muy resumida, la demetilación activa del DNA en plantas está catalizada

en parte por REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1), e IDM1 junto a IDM2 y otras proteínas facilitan la unión de ROS1 a sus dianas (Li *et al.*, 2015c; Zhao *et al.*, 2014). La metilación del DNA es una importante marca epigenética conservada en muchos eucariotas. Muchos estudios han demostrado que juega un papel central en la organización del genoma y la regulación de la expresión génica. Por ello los patrones de metilación del DNA se controlan de forma dinámica mediante la metilación y la desmetilación (Jarillo *et al.*, 2009; Law and Jacobsen, 2010; Tariq and Paszkowski, 2004). La disfunción de IDM2 provoca la hipermetilación del DNA, con la consiguiente condensación de la cromatina que impide la correcta expresión génica (Qian *et al.*, 2014).

En este tipo de mutagénesis, donde se insertan cuatro copias de una secuencia potenciadora de la transcripción del promotor CaMV35S, se suelen ver afectados otros genes localizados alrededor de la inserción del T-DNA. En el mutante 191, los genes cercanos a la inserción son AT1G54850 (*HSP20-like CHAPERONE SUPERFAMILY PROTEIN*), AT1G54830 (*NUCLEAR FACTOR Y SUBUNIT C3, NF-YC3*) y AT1G54790 (*GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase*).

AT1G54850 pertenece también a la familia sHSP20, aunque su función aún no ha sido caracterizada.

NF-YC3 es una de las subunidades que conforman el complejo heterotrimerico NUCLEAR FACTOR Y (NF-Y) que actúa como factor de transcripción, uniéndose a las cajas CCAAT en la región promotora de sus dianas. El complejo está formado por las subunidades A, B y C, existiendo varios tipos de cada una de ellas (Zhao *et al.*, 2016). Se ha predicho que en el genoma de Arabidopsis están codificados 30 miembros NF-Y, que pueden dar lugar a 1000 combinaciones de heterotrimeros (Petroni *et al.*, 2012). Cada complejo podría estar expresándose de forma diferencial en distintos tejidos o estadios del desarrollo de la planta, lo cual indica el gran potencial regulador de este complejo. De hecho en diferentes estudios se ha relacionado al complejo NF-Y con diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta, como la gametogénesis, embriogénesis, y desarrollo de la semilla entre otros, así como en la respuesta a estrés (revisado en (Zhao *et al.*, 2016). Aunque las subunidades individuales no son activas y para ejercer su función deben formar heterodímeros o heterotrimeros entre ellas, también se ha observado su interacción con otras proteínas y factores de transcripción, para regular distintos aspectos del desarrollo. Por ejemplo se ha estudiado su interacción con los factores de transcripción bZIP (Cao *et al.*, 2014; Kumimoto *et al.*, 2010; Wenkel *et al.*, 2006) o la HISTONE DEACETYLASE15 (HDA15) que interacciona directamente con las subunidades NF-YC, entre ellas la C3, para regular la remodelación de la cromatina (Tang *et al.*, 2017). Prácticamente no hemos encontrado en la literatura estudios que relacionen específicamente a NF-YC3 con el mantenimiento del meristemo o aspectos relacionados con el desarrollo de la semilla. Solo en el trabajo de Kumimoto y colaboradores, donde estudian el papel de NF-YC en la germinación de la semilla a través de la respuesta al ácido abscísico (ABA), observaron que el doble mutante *nf-yc3 nf-yc9* es hiposensible a ABA (Kumimoto *et al.*, 2013). Pero se ha visto que la subunidad NF-YB1 afecta al crecimiento del meristemo apical (Wenkel *et al.*, 2006) y que NF-YC4 está implicado en el metabolismo de almidón y proteína en hojas y semillas (Li *et al.*, 2015b), que como hemos comentado al principio de la discusión podría estar relacionado con el control del GPA. Por tanto, aunque hasta el momento no haya referencias de ello, podría ser que NF-YC3 también pudiese estar involucrado en esos procesos.

## CAPÍTULO 2

AT1G54790 o *SEED FATTY ACID REDUCER 1 (SFAR1)* es un tipo de GDSL-motif esterasa/acetiltransferasa/lipasa, implicado en los procesos de degradación de las reservas de ácidos grasos durante la germinación, que serán empleadas en la síntesis de sacarosa, necesaria para el desarrollo del embrión (Chen *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015). Los *SFARs* están regulados mediante la señalización de GAs (Chen *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta todos estos datos *IDM2* y AT1G54850, pertenecientes a la familia sHSP20, podrían ser buenos candidatos a estar interviniendo en la regulación del GPA, mediante la remodelación de la cromatina y control de la expresión de genes importantes en la ruta de señalización entre semillas y meristemo. Al igual que NF-YC3, que mediante su interacción con otro factor de transcripción podría mediar la señal de parada del SAM, estar regulando el metabolismo de azúcares que podría ser el causante de esa señal o tal vez a través de su interacción con HDA15 estuviera participando en la remodelación de la cromatina.

Cualquiera de los genes, excepto *SFAR1*, cuya función parece estar más centrada en el momento de la germinación, podrían ser buenos candidatos a formar parte de la ruta de transducción de la señal desde los frutos y semillas en desarrollo hasta el SAM, que desencadene el GPA.

Para confirmarlo primero sería necesario identificar si la inserción del T-DNA está causando el aumento de expresión de alguno de esos genes, o por el contrario si está ocasionando la pérdida de función de *IDM2*. La segregación del fenotipo del momento de aparición del GPA en el mutante 191 sugería que tan solo las plantas homocigóticas mostraban un GPA adelantado. Por tanto, esto nos hacía sospechar que se trataba de un fenotipo recesivo. Además, ya que mediante RT-PCR semicuantitativa no habíamos observado cambios en la expresión de estos genes, es posible que el fenotipo se debiera a la pérdida de función de *IDM2*. Una forma de confirmar esta suposición sería por ejemplo el estudio de otros mutantes de pérdida de función de este gen. En las bases de datos están disponibles distintos mutantes de inserción de T-DNA en el gen *IDM2*, y por la posición donde se localizan las inserciones probablemente hayan causado su pérdida de función. Aunque estos mutantes se han empleado en algún estudio (Qian *et al.*, 2014), nunca se ha caracterizado el efecto sobre el GPA. Por tanto sería muy interesante llevar a cabo esa caracterización, así como su comparación con el mutante 191 crecido en condiciones de baja humedad relativa/esterilidad como con alta humedad/fertilidad.

Aunque esta parte del trabajo está en un estadio muy inicial, el análisis en profundidad de los mutantes que hemos seleccionado puede llegar a ser muy prometedor. Además, la continuación con el escrutinio de las poblaciones mutagenizadas presentadas durante este trabajo permitirá aportar una colección de mutantes que podrían representar una gran herramienta para el estudio de la ruta de regulación de la actividad meristemática dependiente de la fertilidad.

# **CAPÍTULO 3:**

**ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA INCREMENTAR LA  
PRODUCCIÓN DE FRUTOS Y SEMILLAS EN PLANTAS  
MONOCÁRPICAS**

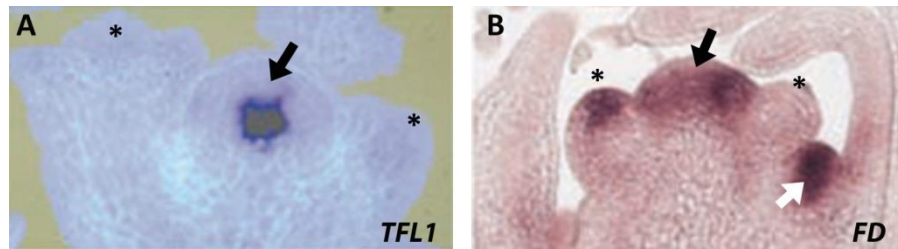


En *Arabidopsis thaliana*, el retraso en la parada de la actividad meristemática que se observa en los mutantes *ap2-170* y *ful* supone un incremento en la producción de frutos del 22 y el 45% respectivamente. Estos mutantes podrían representar un importante recurso genético para la mejora de los cultivos, en especial de aquellos pertenecientes a la familia de las brassicáceas, como la colza o las mostazas, debido al alto grado de conservación de la función génica dentro de este grupo (Cavell *et al.*, 1998; Lukens *et al.*, 2003). Sin embargo, dichas mutaciones presentan efectos pleiotrópicos y, además del retraso en el GPA, también muestran otras alteraciones que afectan al desarrollo de la planta y en particular de los frutos y las semillas. Por tanto estos alelos mutantes no pueden ser utilizados directamente para mejorar la producción vegetal.

En este capítulo de tesis doctoral nos propusimos desarrollar una serie de estrategias biotecnológicas que nos permitieran aprovechar el incremento en la producción de frutos de los mutantes *ap2-170* y *ful* eliminando los efectos adversos sobre el desarrollo de los frutos.

Todas estas estrategias convergían en elevar el nivel de expresión de *AP2* únicamente en el SAM a través del silenciamiento de *FUL*, la expresión de alelos de *AP2* resistentes a la regulación del miR172 o el bloqueo de la acción de dicho microRNA mediante la expresión de un RNA complementario al miR172 que dificulta la unión a sus dianas (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Todesco *et al.*, 2010).

Buscamos en la literatura genes que solo se expresaran en el SAM, para así usar su promotor para dirigir la expresión de los genes de interés de forma exclusiva al meristemo apical del tallo. Sin embargo, no se encontró ningún gen para el que se hubiera descrito expresión en el SAM que no mostrara expresión en ningún otro tejido. No obstante, seleccionamos el gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, cuya expresión se localiza en el centro del meristemo apical del tallo (Fig. 3-1 A) y en el centro de los meristemos inflorescentes axilares, pero no se expresa en los meristemos florales (Bradley *et al.*, 1997; Conti and Bradley, 2007; Kobayashi *et al.*, 1999). Aunque *TFL1* también se ha detectado en otros tejidos como el tejido vascular del tallo de la inflorescencia (Bradley *et al.*, 1997) y la raíz (Sohn *et al.*, 2007), decidimos utilizar su promotor esperando que la expresión en estos tejidos de los transcritos introducidos no tuviera efectos significativos no deseados en el desarrollo de la planta. Por otro lado, como el área de expresión en el SAM de *TFL1* era bastante reducida, decidimos elegir otro gen adicional que se expresara en todo el domo del SAM pero no (o al menos en menor medida) en los meristemos florales, en concreto el gen *FD*, que ya ha sido empleado en otros trabajos como promotor específico de SAM (Galvao *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2014) a pesar de expresarse también en los meristemos axilares, los primordios de hoja, y en el centro de los meristemos florales a partir de estadio 3 (Fig. 3-1 B) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005).



**Figura 3-1: Patrón de expresión de *TFL1* y *FD* en plantas silvestres de *Arabidopsis*.** Hibridaciones “in situ” con *TFL1* (A) y *FD* (B) como sonda. Las flechas negras marcan la posición del SAM, las flechas blancas los meristemos axilares y los \* los meristemos florales. Imagen A modificada a partir de Bradley *et al.* (1997) e imagen B a partir de Wigge *et al.* (2005).

Todas las construcciones que generamos fueron transformadas en plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col. Obtuvimos un mínimo de 25 líneas T1 independientes y seleccionamos, para realizar la caracterización fenotípica, al menos 10 líneas homocigóticas con una sola inserción, salvo alguna excepción portadora de dos inserciones, debido a que durante la generación T1 dicha línea había producido mayor número de frutos que las plantas silvestres.

Como nuestro objetivo era conseguir plantas más productivas que no presentaran ningún defecto grave que afectara al desarrollo de los frutos o las semillas, el primer criterio que utilizamos para seleccionar las líneas que evaluaríamos posteriormente fue la ausencia de efectos no deseados en el desarrollo de la planta y de los frutos, tanto en las líneas T1 originales, como si estos efectos se observaban en generaciones posteriores.

Tras haber seleccionado líneas homocigóticas con una sola inserción del T-DNA y sin defectos graves en el desarrollo, continuamos con la caracterización fenotípica en todas las líneas seleccionadas, determinando tanto el tiempo de floración como el rendimiento en frutos de la planta.

El tiempo de floración se incluyó en la caracterización fenotípica debido a que tanto *FUL* como *AP2* controlan este carácter, y podían producirse alteraciones en éste por la expresión de los transgenes introducidos. Para determinar el tiempo de floración contamos el número de hojas de roseta y hojas caulinares producidas desde la aparición de las dos primeras hojas reales hasta la aparición de la primera flor, y la producción de frutos de la planta la estimamos mediante el recuento de frutos producido por la inflorescencia principal.

En las líneas que resultaron ser más productivas ampliamos la caracterización fenotípica a otros parámetros de rendimiento, como la producción de semillas y el peso de éstas. La media de las semillas producidas por silicua la obtuvimos a partir del recuento de las semillas producidas en cinco frutos de 3 a 10 plantas. Para estimar la producción de semillas en la inflorescencia principal multiplicamos el número de semillas/fruto por el número de frutos producidos en la inflorescencia principal de cada línea transgénica. El peso de las semillas se obtuvo de igual manera, determinando el peso de las semillas producidas por cinco frutos de 3-10 plantas en cada una de las líneas transgénicas. A partir de ese valor y el número de semillas por fruto se estimó el peso de semillas por frutos y el peso de 100 semillas.



Con todos los datos recogidos seleccionamos la estrategia que había resultado ser más eficaz para aumentar el rendimiento, medido como producción de frutos, en Arabidopsis. Posteriormente continuamos validando los resultados obtenidos por la estrategia seleccionada, repitiendo la caracterización fenotípica realizada previamente e incluyendo el recuento de frutos a las inflorescencias secundarias. Este nuevo parámetro, además de cuantificar de una manera más exacta la producción total de la planta, nos sirvió para comprobar la validez del número de frutos en la inflorescencia principal como estimador de rendimiento total. En la figura 3-2 se resume el proceso de selección y caracterización fenotípica de las líneas transgénicas.

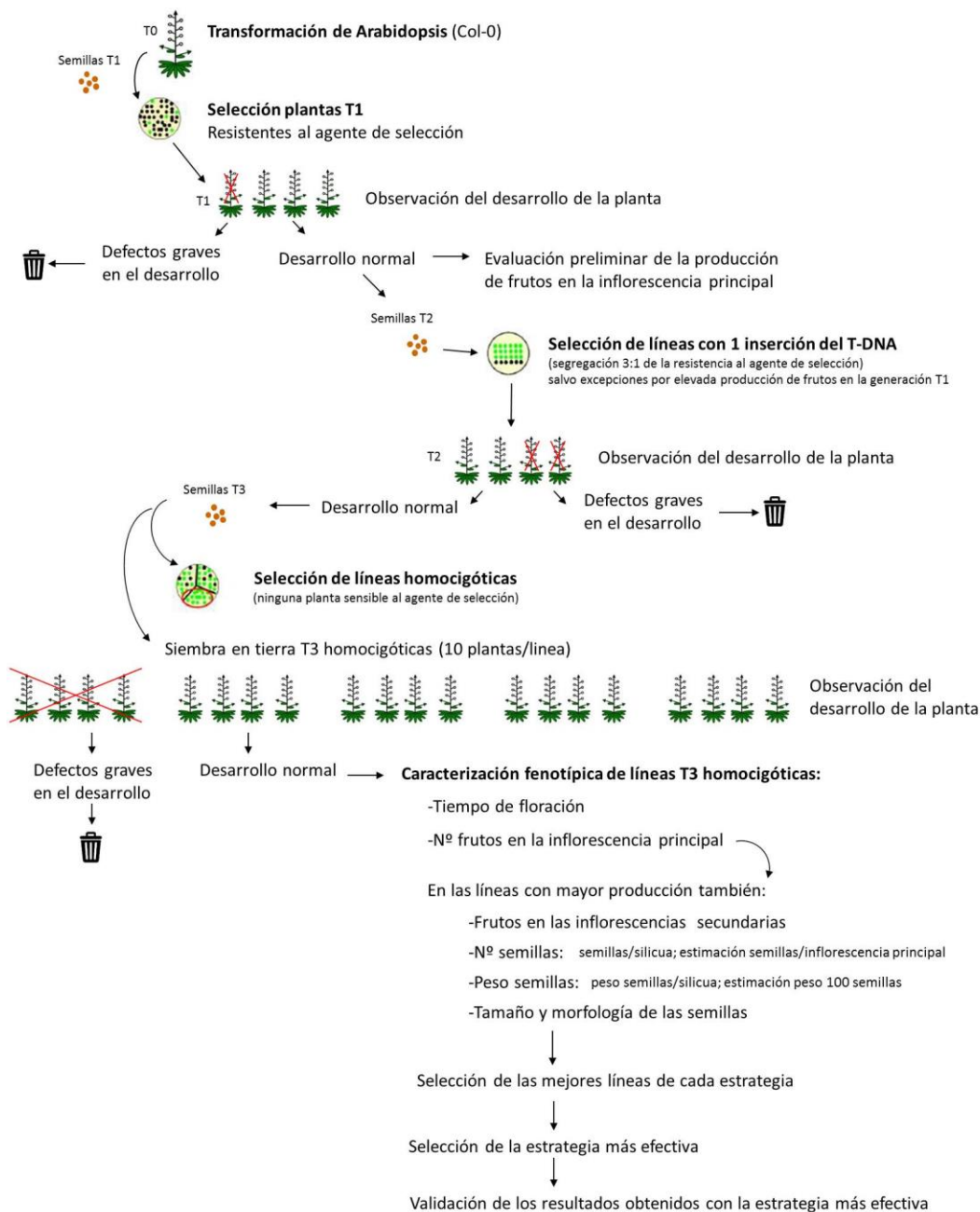


Figura 3-2: Resumen del proceso de selección y caracterización fenotípica de las líneas transgénicas generadas durante este trabajo.

## ESTRATEGIA 1:

### SILENCIAMIENTO O MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE *FUL* EN EL SAM

#### pTFL1::RNAi-*FUL* y pFD::amiR-*FUL*

Para reducir la expresión de *FUL* en el SAM empleamos dos estrategias similares, mediadas por silenciamiento postranscripcional, diseñando un RNAi de interferencia (Wesley *et al.*, 2001) y un microRNA artificial (amiRNA) (Schwab *et al.*, 2006) que dirigieran la degradación selectiva de *FUL*. Ambas estrategias han demostrado ser eficaces en numerosos trabajos para reducir la expresión de genes de interés (Tiwari *et al.*, 2014; Younis *et al.*, 2014). Mientras que el RNAi está compuesto por fragmentos de 100-800pb del gen que se quiere silenciar, clonado en ambas orientaciones y separados por una región intrónica, el amiRNA tan solo consta de 21pb específicas del gen a silenciar, introducidas en el esqueleto de un precursor de miRNA. En el apartado de materiales y métodos se detalla las secuencias elegidas para el silenciamiento de *FUL* mediante ambas estrategias y el procedimiento seguido para la generación de las construcciones.

Para dirigir el silenciamiento postranscripcional de *FUL* al SAM empleamos inicialmente un RNAi controlado por el promotor de *TFL1*, que se expresa en el SAM pero no en los meristemas florales. Sin embargo, como el área de expresión de *FUL* abarca todo el meristemo y *TFL1* solo está presente en una región reducida en el centro del meristemo, pensamos que el empleo de otro promotor, de expresión más extendida en el tejido meristemático, podría ser más efectivo. Por ello tratamos de generar una nueva construcción donde el RNAi estuviera controlado por el promotor de *FD*. Sin embargo, tuvimos dificultades metodológicas inesperadas que nos impidieron generar dicha construcción, por lo que buscamos otra estrategia alternativa de silenciamiento, expresando un amiRNA-*FUL* dirigido por dicho promotor.

#### Evaluación del desarrollo general de la planta y los frutos

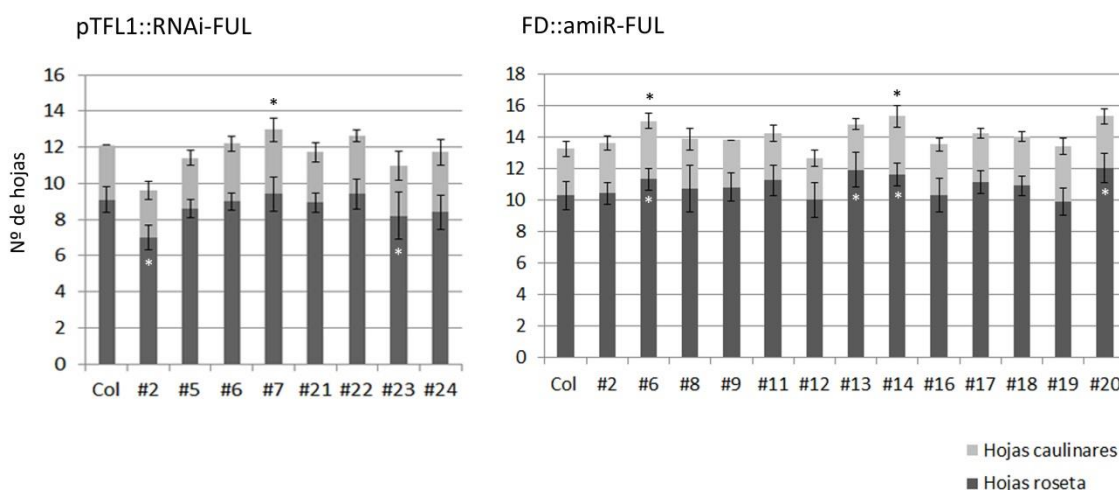
Tras transformar *Arabidopsis* con ambas construcciones seguimos el procedimiento descrito previamente. Durante el crecimiento de las plantas de las generaciones T1, T2 y T3 evaluamos la ausencia de efectos negativos en el desarrollo de la planta o los frutos. Mientras que ninguna de las líneas pFD::amiR-*FUL* presentó alteraciones en la arquitectura de la planta o en la morfología de flores y frutos, dos líneas pTFL1::RNAi-*FUL* presentaron defectos que podrían comprometer el rendimiento de la planta. Estas líneas parecían haber perdido la dominancia apical, formaban multitud de tallos más delgados de lo normal y tenían algunos frutos con alteraciones diversas, como silicuas sin semillas, curvatura de la silicua o presencia de valvas extra. El resto de las líneas pTFL1::RNAi-*FUL* producían ocasionalmente frutos sin semillas, pero no era un defecto generalizado de la planta por lo que dichas líneas no fueron eliminadas y se prosiguió con su caracterización fenotípica.

### Caracterización fenotípica

#### ✓ Tiempo de floración:

FUL promueve la transición floral actuando a través de diferentes rutas, como la ruta del fotoperiodo (Melzer *et al.*, 2008; Teper-Bamnlker and Samach, 2005; Wigge *et al.*, 2005) o la ruta endógena de la edad (Balanzà *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009). Por ello, una de las alteraciones fenotípicas del mutante *ful* es el retraso de la floración, produciendo mayor número de hojas caulinares que el silvestre.

Para comprobar si las líneas transgénicas generadas mostraban este efecto, determinamos el tiempo de floración de todas las líneas T3 homocigóticas seleccionadas mediante el recuento de las hojas de roseta y hojas caulinares.

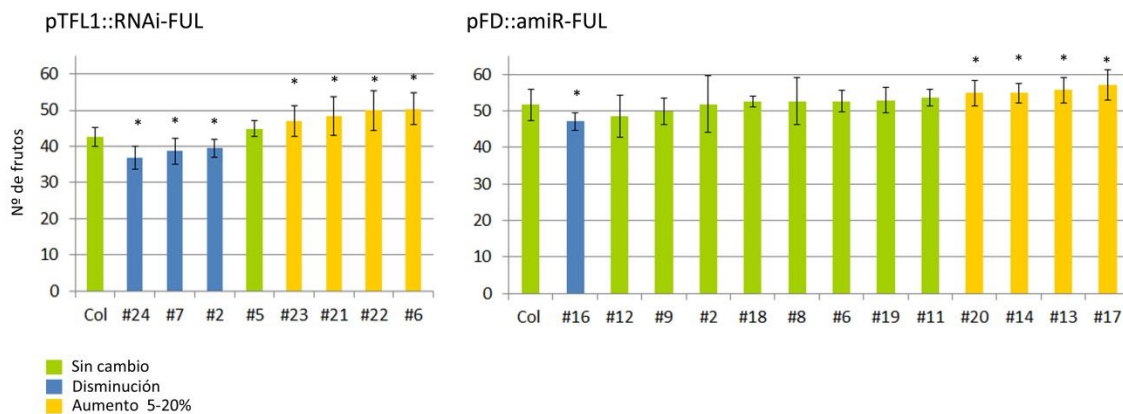


**Figura 3-3: Tiempo de floración de las líneas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL, determinado mediante el recuento del nº de hojas de roseta y hojas caulinares producidas.** Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos blancos y negros representan diferencias significativas respecto a Col en número de hojas de roseta y hojas caulinares respectivamente, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

La mayoría de las líneas evaluadas para ambas construcciones no mostró cambios en el tiempo de floración. Tan solo con la construcción pTFL1::RNAi-FUL aparecieron dos líneas que florecieron antes (#2 y #23), produciendo menor número de hojas de roseta que las plantas silvestres, y una línea (#7) que floreció algo más tarde, aunque este retraso solo se apreció en la producción de más hojas caulinares que el silvestre. Con la construcción pFD::amiR-FUL observamos cuatro líneas que florecieron algo más tarde, las líneas #6 y #14, que produjeron mayor número de hojas de roseta y hojas caulinares que el silvestre, y las líneas #13 y #20, que tan solo produjeron mayor número de hojas de roseta. Según el test estadístico empleado, estas líneas mostraban diferencias significativas respecto al silvestre, sin embargo la diferencia tan solo era de una o dos hojas, por lo que no consideramos que afectaran significativamente a los objetivos de este trabajo (Fig. 3-3).

✓ Número de frutos en la inflorescencia principal:

Cuatro de las líneas pTFL1::RNAi-FUL mostraron un incremento en la producción de frutos de la inflorescencia principal de entre el 10 y el 18%, mientras que tres de las líneas caracterizadas produjeron menos frutos. Con la construcción pFD::amiR-FUL no observamos incrementos de producción tan elevados. En este caso, una de las líneas caracterizadas mostró una pequeña reducción de la producción y cuatro un aumento de la misma, pero tan solo entre el 6 y el 10% (Fig. 3-4).



**Figura 3-4: Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL.** Las diferentes líneas transgénicas están ordenadas de menor a mayor producción de frutos. Aparecen coloreadas en verde aquellas líneas que no muestran diferencias significativas respecto a Col, en azul las líneas que presentan disminución del rendimiento en frutos y en amarillo las líneas con un incremento de la producción del 5-20%. Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. \* representa diferencias significativas respecto a Col con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

Seleccionamos las líneas pTFL1::RNAi-FUL #23, #21, #22 y #6, que incrementaban la producción de frutos en un 10%, 13%, 17% y 18% respectivamente y las líneas pFD::amiR-FUL #20, #14, #13 y #17, que presentaban incrementos del 6%, 6%, 7% y 10% respectivamente, para continuar con la evaluación de la producción de semillas y estudiar si la expresión del transgén pudiera estar causando efectos deletéreos en el desarrollo de éstas o en otros parámetros observables.

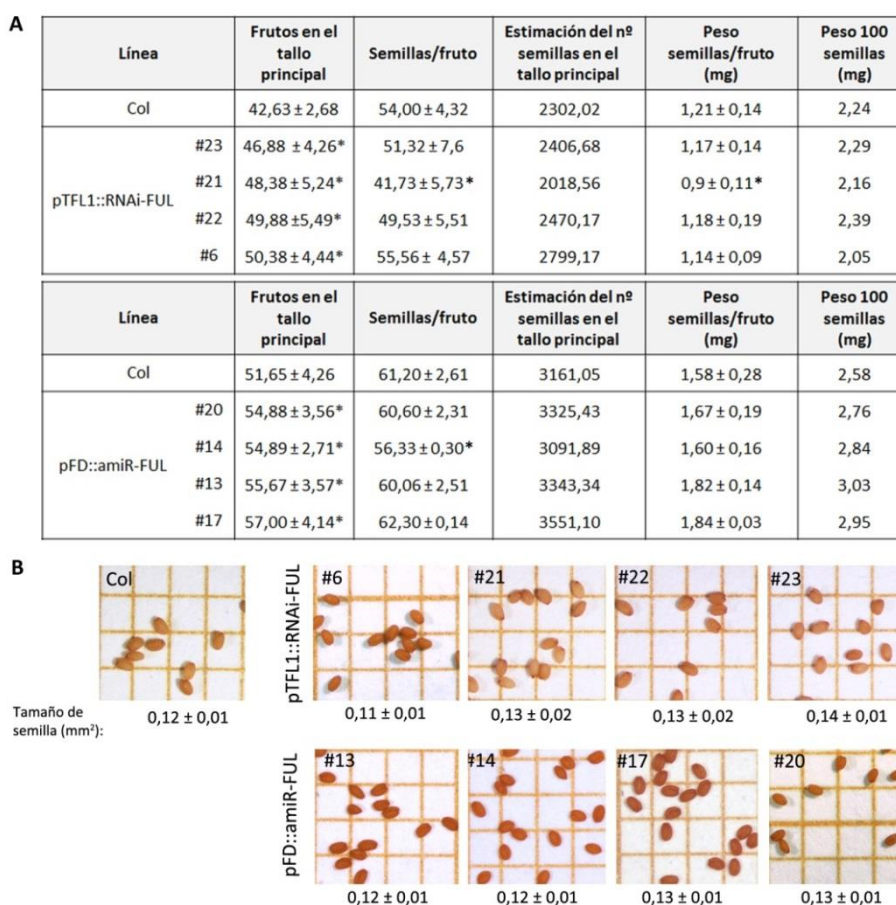
✓ Número y peso de semillas:

En todas las líneas con mayor producción de frutos en la inflorescencia principal seleccionadas, calculamos la producción media de semillas por fruto y su peso y estimamos el peso de 100 semillas.

Solo observamos diferencias significativas en el número de semillas producidas por fruto respecto a las plantas silvestres en la línea pTFL1::RNAi-FUL #21, que produjo 12 semillas menos por fruto

que las plantas silvestres, lo cual también se vio reflejado en una disminución en el peso de semillas/fruto; también la línea pFD::amiR-FUL #14 produjo cinco semillas menos por fruto (Fig. 3-5 A). Cuando observamos la morfología y el tamaño de las semillas no encontramos diferencias apreciables entre las de las diferentes líneas transgénicas y las del silvestre Col (Fig. 3-5 B).

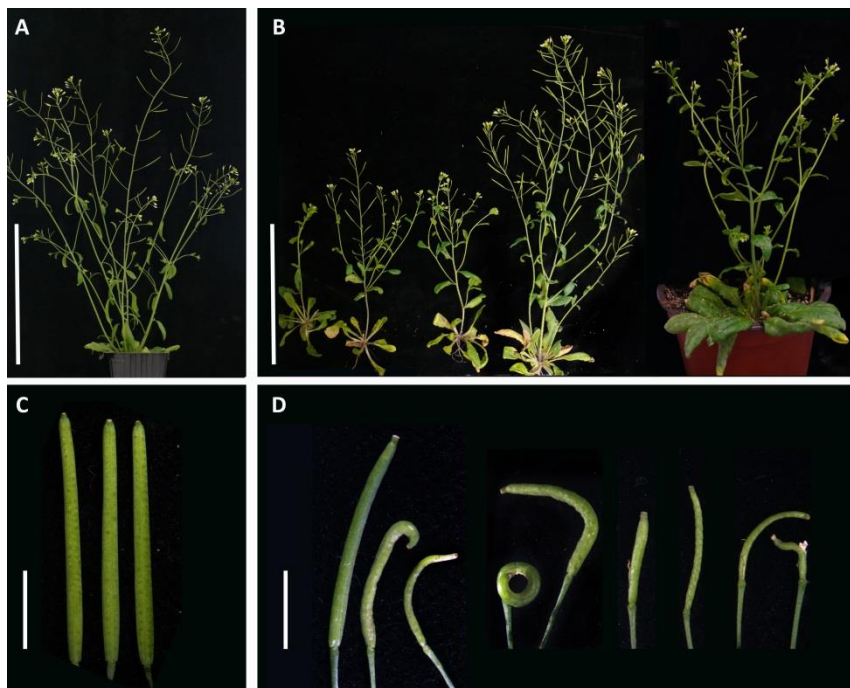
Según los resultados obtenidos tras cuantificar la producción de frutos en el tallo principal, las líneas más productivas fueron pTFL1::RNAi-FUL #6 y pFD::amiR-FUL #17, con un aumento del rendimiento en frutos del 18% y 10% respectivamente. Ninguna de estas líneas mostró defectos severos en el desarrollo de la planta ni de los frutos o semillas.



**Figura 3-5: A) Producción de semillas en las líneas pTFL1::RNAi-FUL y pFD::amiR-FUL seleccionadas por presentar mayor producción de frutos en la inflorescencia principal.** Los valores mostrados indican la media ± SD. La media del nº de frutos producidos en la inflorescencia principal por las diferentes líneas transgénicas y Col se ha calculado a partir de al menos 10 plantas por línea. La media del nº y peso de semillas por fruto se ha calculado a partir de las semillas producidas en cinco frutos de 3-10 plantas por línea. \* indica diferencias significativas respecto a Col con p≤0,05. Prueba T-Student. El peso de 100 semillas se ha estimado con la fórmula peso semillas por fruto/ semillas por fruto x 100. La producción total de semillas en la inflorescencia principal se ha estimado con la fórmula semillas por fruto x nº frutos en el tallo principal. Como los datos de cada construcción procedían de experimentos realizados en tiempos distintos la estimación de la producción de semillas en el tallo principal se han calculado respecto a los valores de producción presentados por el Col incluido en el experimento correspondiente. **B) Comparación de la morfología de las semillas.** El tamaño de cada celda es de 1 mm<sup>2</sup>. En la parte inferior de cada imagen se muestra el área media en mm<sup>2</sup> ± SD de las semillas.

Los resultados de producción obtenidos con la construcción pFD::amiR-FUL en general no fueron tan buenos como con la construcción pTFL1::RNAi-FUL, a pesar de que se esperaba que con el promotor de *FD* el silenciamiento fuera más eficaz al afectar a una región más amplia del SAM. Esto podría deberse a que el amiRNA diseñado no fuera suficientemente eficiente para silenciar a *FUL*. Puesto que en las líneas transgénicas generadas no podíamos evaluar esta eficiencia cuantificando los niveles de expresión en la inflorescencia, dado que el potencial silenciamiento estaba dirigido a un dominio espacial muy restringido, generamos una nueva construcción que expresaba el amiR-FUL bajo el control del promotor 35S del CaMV.

Las líneas T1 35S::amiR-FUL mostraron fenotipos similares a los causados por la pérdida de función de *FUL*. Estas plantas tardaron más tiempo en florecer (Fig. 3-6 B) y desarrollaron silicuas con alteraciones morfológicas que recordaban a los fenotipos presentados por los mutantes débiles *ful* (Fig. 3-6 D). También incrementaron la producción de frutos llegando a producir alguna de las líneas hasta 95 frutos en la inflorescencia principal, lo cual indicaba que el amiR-FUL diseñado sí que era capaz de dirigir la degradación de *FUL* y que quizá el promotor de *FD* utilizado no lo expresara a niveles suficientes en el SAM para inducir los fenotipos esperados.



**Figura 3-6: Fenotipos presentados por las plantas 35S::amiR-FUL.** A y C) Col; B y D) Fenotipos representativos de líneas T1 independientes de 35S::amiR-FUL. Barras de escala: 10 cm (A y B); 5 mm (C y D).

**pFD::FUL:VP16**

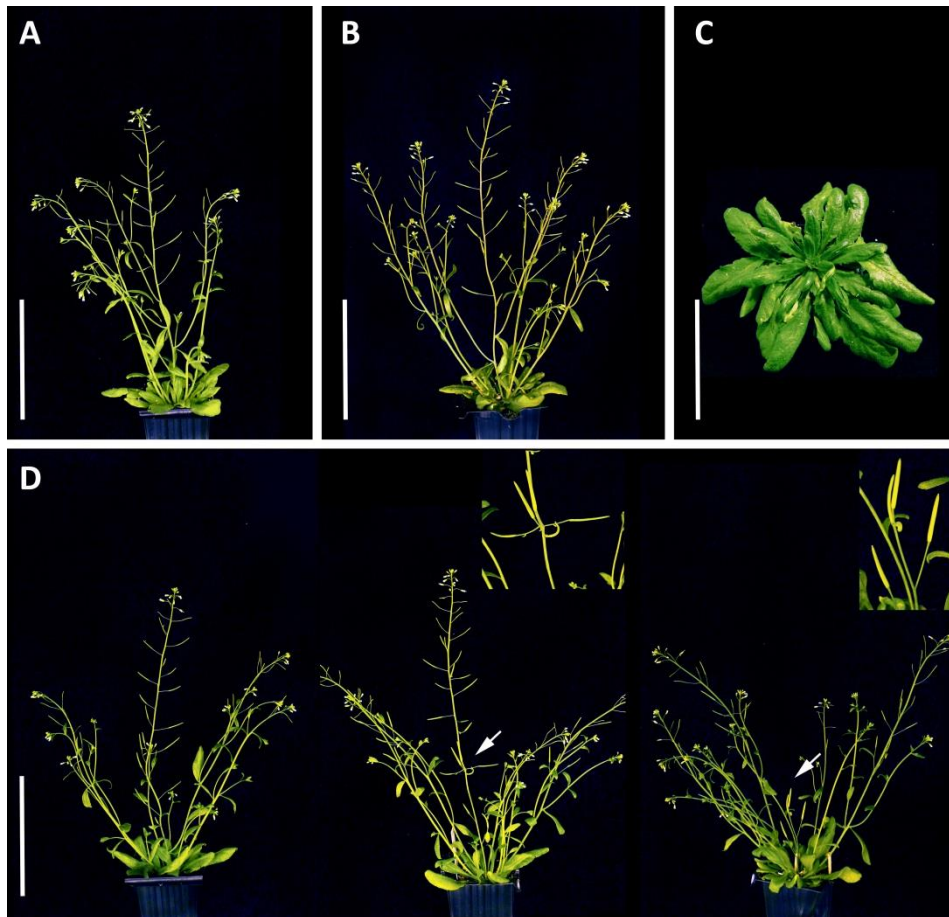
Una estrategia alternativa al silenciamiento de *FUL* en el SAM fue la expresión dirigida a este dominio de un alelo de *FUL* con actividad modificada mediante la fusión en su extremo 3' de una secuencia codificante de dominios de activación transcripcional.

La construcción pFD::FUL:VP16 contiene la secuencia promotora de *FD* y la región genómica codificante de *FUL* fusionada, en su extremo 3', a la secuencia del dominio de activación viral VP16 (Cress and Triezenberg, 1991; Triezenberg *et al.*, 1988). El propósito de esta construcción fue producir en el SAM una proteína *FUL* con una actividad transcripcional modificada que se comportara como un activador transcripcional constitutivo. Con este nuevo alelo de *FUL*, al ser un activador dominante de la transcripción, pretendíamos aumentar el nivel de expresión de *AP2* en el SAM y obtener fenotipos similares a los mostrados por el mutante *ful*.

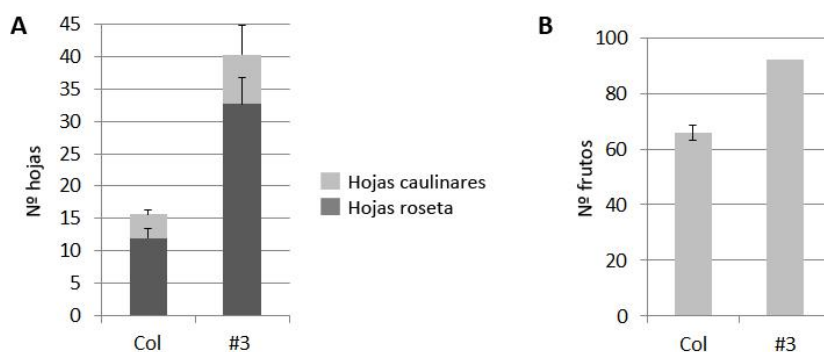
**Evaluación del desarrollo general de la planta y los frutos**

Durante la caracterización de las líneas pFD::FUL:VP16 la mayoría de las líneas evaluadas mostraron fenotipos similares a las plantas silvestres, sin cambios en su arquitectura o en el desarrollo de las flores y frutos (Fig. 3-7 B). Tan solo dos líneas presentaron diferentes alteraciones en el desarrollo de la plantas. La línea #3 floreció mucho más tarde que las plantas silvestres (Fig. 3-7 C), tras la producción de 32 hojas de roseta y 7 hojas caulinares, frente a las 12 hojas de roseta y 3 hojas caulinares del silvestre (Fig. 3-8 A). Aunque esta línea no nos interesaba debido al prolongado tiempo necesario para su floración, posiblemente causado por la cosupresión de *FD*, también estudiamos la producción de frutos en el tallo principal, obteniendo un 37% de incremento en la producción de frutos respecto al silvestre, con la producción de 92 frutos, mientras que Col solo produjo 66 frutos (Fig. 3-8 B). En la línea #14 encontramos plantas de crecimiento normal (Fig. 3-7 D izquierda) y plantas con cambios en la arquitectura de la inflorescencia, como la ausencia de elongación de los primeros entrenudos (Fig. 3-7 D centro) o la determinación del SAM en una flor terminal tras la producción de unas pocas flores (Fig. 3-7 D derecha).





**Figura 3-7: Fenotipos observados en las líneas pFD::FUL:VP16.** A) Col; B) Líneas con fenotipo normal, de desarrollo similar a las plantas silvestres; C) Línea #3, con retraso severo de la floración; D) Línea #14. Plantas de fenotipo normal a la izquierda, con alteración de la arquitectura de la inflorescencia en el centro y con determinación del meristemo floral en una flor terminal a la derecha. Las flechas marcan la región ampliada en la parte superior del panel. Barras de escala: 10 cm.



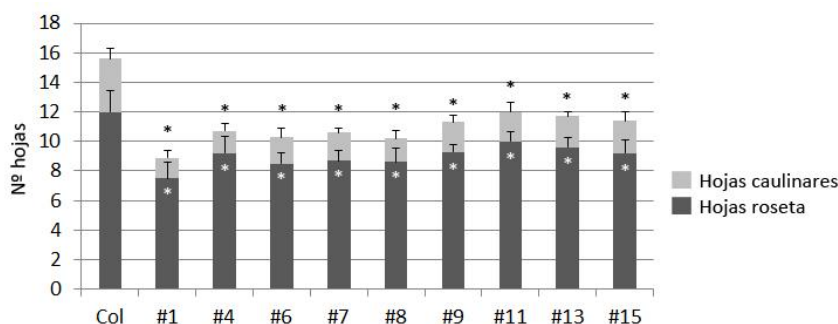
**Figura 3-8: Tiempo de floración y producción de frutos de la línea pFD::FUL:VP16 #3.** A) Nº de hojas de roseta y hojas caulinares producidas por Col y la línea #3. Se muestra la media de al menos 3 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. B) Nº de frutos producidos en la inflorescencia principal. Para la línea #3 solo se consiguió recoger datos de una planta.



### Caracterización fenotípica

✓ Tiempo de floración:

En las nueve líneas que mostraban un desarrollo aparentemente normal, evaluamos el tiempo de floración. Todas ellas adelantaron la transición floral, reduciendo el número de hojas de roseta y hojas caulinares producidas (Fig. 3-9).

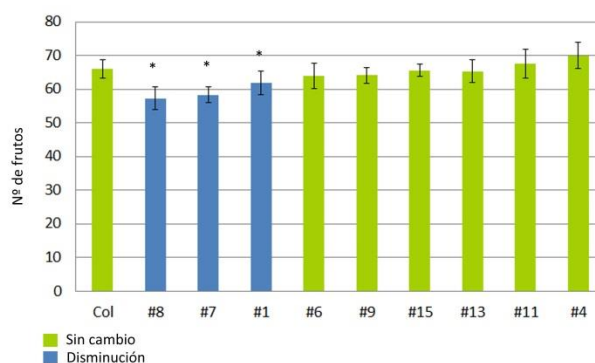


**Figura 3-9: Tiempo de floración de las líneas pFD::FUL:VP16, determinado mediante el recuento del nº de hojas de roseta y hojas caulinares producidas.** Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos blancos y negros representan diferencias significativas respecto a Col en número de hojas de roseta y hojas caulinares respectivamente, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

✓ Número de frutos en la inflorescencia principal:

Cuando cuantificamos el número de frutos producidos en la inflorescencia principal, seis de las líneas mostraron la misma producción que las plantas silvestres y tres líneas produjeron menor número de frutos (Fig. 3-10).

Según los resultados obtenidos, esta estrategia no produjo mejoras evidentes en el rendimiento en frutos o semillas, por lo que decidimos no continuar trabajando con estas líneas y probar con otro tipo de estrategias.



**Figura 3-10: Producción de frutos de las líneas FD::FUL:VP16.** Se muestra el número de frutos producidos en la inflorescencia principal. Las diferentes líneas transgénicas están ordenadas de menor a mayor producción de frutos. Aparecen coloreadas en verde aquellas líneas que no muestran diferencias significativas respecto a Col y en azul las líneas que presentan disminución del rendimiento en frutos. Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. \* representa diferencias significativas respecto a Col con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

## ESTRATEGIA 2:

### SOBREENPRESIÓN DE AP2 EN EL SAM

Para sobreexpresar AP2 en el meristemo apical del tallo empleamos diferentes alelos de AP2 resistentes a la represión de miR172, así como un “mimicry” o RNA complementario al miR172 que mimetiza la secuencia de sus dianas, uniéndose a él de forma permanente e impidiendo que pueda ejercer su función reguladora.

#### **pTFL1::AP2<sup>170</sup> y pFD::AP2<sup>170</sup>**

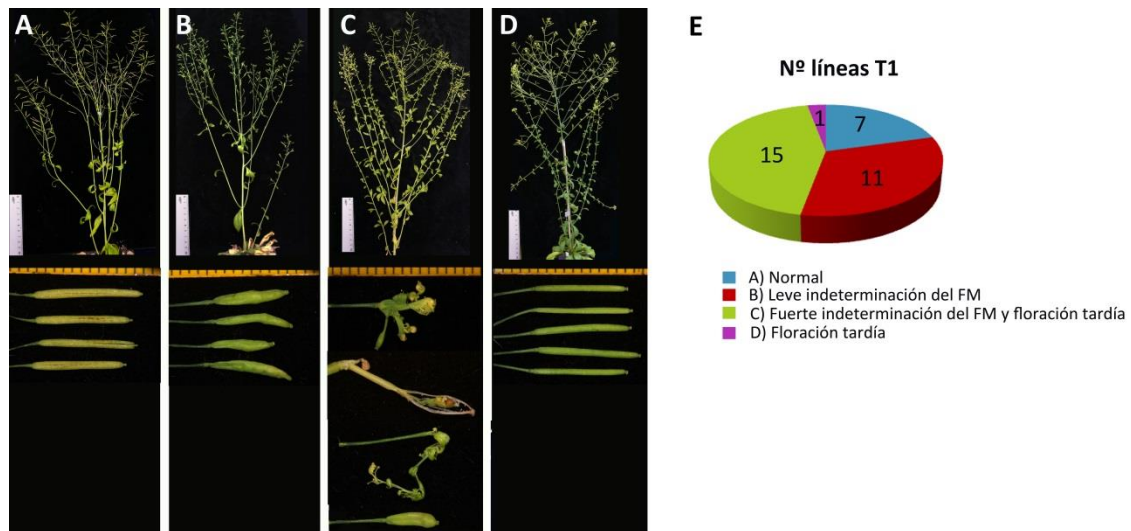
El alelo AP2<sup>170</sup> es parcialmente resistente a la represión del miR172. Como ya se ha descrito en la introducción, contiene una mutación puntual en la zona de reconocimiento del miR172, impidiendo un apareamiento perfecto con este. Además el cambio de nucleótido de G a A genera un cambio de aminoácido, que tal vez podría estar afectando a la funcionalidad de la proteína.

#### Evaluación del desarrollo general de la planta y los frutos

Cuando transformamos *Arabidopsis* con el alelo AP2<sup>170</sup> bajo el control del promotor de *FD*, en las plantas T1 obtuvimos dos tipos de fenotipos desfavorables en distintos grados: por un lado, la indeterminación del meristemo floral y por otro, retraso en el tiempo de floración. Clasificamos los fenotipos que habíamos observado en cuatro categorías: Fenotipo normal, con plantas de desarrollo similar a las plantas silvestres (Fig. 3-11 A); fenotipo débil, donde las plantas mostraban una débil indeterminación del meristemo floral (FM) causante de la aparición de alguna valva extra y un ligero retraso de la transición floral (Fig. 3-11 B); fenotipo fuerte con indeterminación del FM, donde agrupamos plantas con un fuerte retraso en la transición floral pero además con fuertes fenotipos de indeterminación del FM, produciendo flores y frutos aberrantes con estructuras carpelares dentro del carpelo (Fig. 3-11 C); y fenotipo fuerte sin indeterminación del FM, donde las plantas presentan un fuerte retraso en la transición floral, produciendo un número elevado de hojas caulinares antes de florecer, pero las flores y frutos se desarrollaban con normalidad (Fig. 3-11 D). La mayoría de las líneas T1 obtenidas se agruparon en el fenotipo fuerte de indeterminación del FM y retraso de la transición floral, con 15 líneas, seguido por el fenotipo débil de indeterminación del FM con 11 líneas (Fig. 3-11 E).

Caracterizamos en la generación T2 las líneas que en T1 habían presentado un fenotipo normal, pero en esta generación algunas plantas de cada una de las líneas transgénicas también presentaron también indeterminación del meristemo floral. Posiblemente esas plantas fueran las que contenían en homocigosis el transgén.

Según los resultados obtenidos de la evaluación de las plantas en la generación T1 y T2, la estrategia de expresar el alelo AP2<sup>170</sup> bajo el control del promotor del gen *FD* no era útil para aumentar la producción de frutos de la planta, puesto que con este promotor el alelo AP2<sup>170</sup> también se estaba expresando en el meristemo floral y ello estaba causando, en mayor o menor medida, su indeterminación, con el consiguiente desarrollo anormal de los frutos. Por ello decidimos abandonar la caracterización de estas líneas y continuar con otras alternativas, como la expresión de AP2<sup>170</sup> bajo el control del promotor del gen *TFL1*.



**Figura 3-11: Fenotipos observados en la generación T1 de las líneas pFD::AP2<sup>170</sup>:** A) Plantas normales; B) Plantas con indeterminación débil del meristemo floral y leve retraso de la transición floral; C) Plantas con fuerte retraso de la floración e indeterminación fuerte del meristemo floral; D) Plantas con fuerte retraso de la floración y desarrollo normal de las silicuas. E) Gráfico del número de líneas incluidas dentro de cada fenotipo.

Con la construcción pTFL1::AP2<sup>170</sup>, dos de las líneas T1 obtenidas mostraron defectos severos en el desarrollo de la planta, presentando fenotipos similares a los mostrados por mutantes *ap2* (en la figura 3-12 A se muestra el fenotipo de la línea #2 en comparación al mutante *ap2-12* en la determinación del SAM con la formación de una flor terminal, la morfología de las flores y de los frutos), por lo que fueron descartadas. El resto de las líneas presentaron un crecimiento normal y produjeron frutos que se desarrollaron aparentemente sin defectos; únicamente aparecieron de forma esporádica en algunas líneas defectos en algún fruto de inflorescencias terciarias o cuaternarias, como frutos con valvas extra, varias silicuas desarrolladas a partir del mismo meristemo floral o flores con mayor número de órganos florales (Fig. 3-12 B), relacionados todo ellos con la indeterminación del meristemo floral, o bien, en otras líneas, fenotipos similares a los del mutante *ap2-12*, con sépalos carpeloides que no senescen ni se separan del fruto y carpelos que no llegan a polinizarse correctamente (Fig. 3-12 C arriba), así como en algún caso muy aislado, la determinación del SAM en una flor terminal (Fig. 3-12 C abajo), todo ello probablemente causado por la cosupresión de la expresión de AP2. Sin embargo, como la frecuencia de aparición de dichas alteraciones era muy baja y tampoco afectaba a la totalidad de los frutos desarrollados, sino que se restringía a unos pocos frutos en inflorescencias laterales, continuamos con su evaluación en la siguiente generación.



**Figura 3-12: Defectos en el desarrollo de algunas líneas transgénicas  $pTFL1::AP2^{170}$ .** La línea #2 cosuprime la expresión de *AP2* y presenta fenotipos similares a mutantes *ap2-12* (A). En el panel B y C se muestran defectos que aparecen ocasionalmente en inflorescencias terciarias y cuaternarias de algunas líneas transgénicas: B) indeterminación del meristemo floral; C) cosupresión de *AP2* en el meristemo floral produciendo defectos típicos en fruto del mutante *ap2-12* (arriba) y en el SAM causando su determinación en una estructura carpelar (abajo).

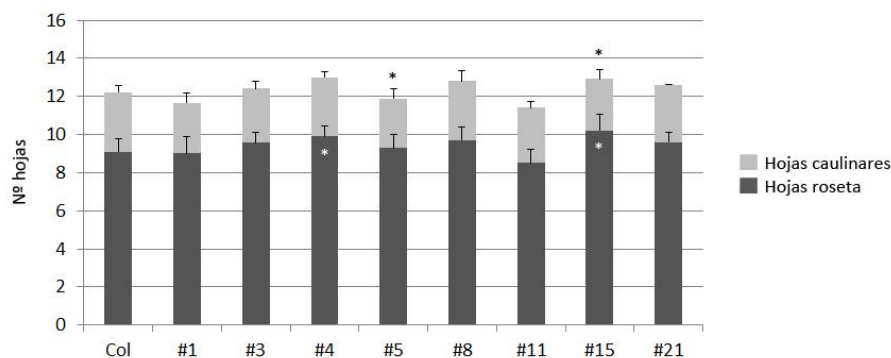
Barras de escala: 5 mm.

Como en la caracterización preliminar del número de frutos producidos en la inflorescencia principal no observamos ningún incremento notable de producción, tan solo seleccionamos en la generación T2 líneas que presentaban una única inserción del transgén. Durante el crecimiento de estas plantas tampoco observamos anomalías en el desarrollo de la planta o de los frutos que comprometieran el rendimiento de la planta, por lo que procedimos a la selección de líneas homocigóticas en la generación T3 con las que realizar la caracterización fenotípica.

### Caracterización fenotípica

#### ✓ Tiempo de floración:

*AP2* también interviene en el control del tiempo de floración, reprimiendo la expresión de genes que promueven la transición floral (Aukerman and Sakai, 2003; Yant *et al.*, 2010). Aunque el mutante *ap2-170* no presenta variación en el tiempo de floración, los mutantes nulos *ap2* adelantan la transición floral. Para estudiar el efecto del transgén sobre el tiempo de floración, se cuantificó el número de hojas producidas en la roseta y el número de hojas caulinares. Las líneas #4 y #15 produjeron más hojas de roseta que las plantas silvestres ( $9,90 \pm 0,57$ ,  $10,22 \pm 0,83$  y  $9,10 \pm 0,70$  hojas de roseta respectivamente), mientras que las líneas #5 y #15 produjeron menor número de hojas caulinares que el silvestre ( $2,60 \pm 0,52$ ,  $2,7 \pm 0,48$  y  $3,31 \pm 0,33$  hojas caulinares respectivamente) (Fig. 3-13). Según el papel que se ha descrito de *AP2* en el control de la transición floral, al aumentar el nivel de expresión de *AP2* en el meristemo apical vegetativo mediante esta estrategia biotecnológica, podría esperarse un retraso en el tiempo de floración. Sin embargo, esa situación solo la observamos en dos de las líneas transgénicas caracterizadas, que, como se ha descrito, florecieron ligeramente más tarde. Para comprobar cuál era el efecto de la expresión del alelo  $AP2^{170}$  sobre la parada de la actividad meristemática y si la variación en el tiempo de floración de algunas de las líneas podría estar influyendo en ello, procedimos a evaluar la producción de frutos en la inflorescencia principal.



**Figura 3-13: Tiempo de floración de las líneas pTFL1::AP2<sup>170</sup>, determinado mediante el recuento del nº de hojas de roseta y hojas caulinares producidas.** Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos blancos y negros representan diferencias significativas respecto a Col en número de hojas de roseta y hojas caulinares respectivamente, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

✓ Número de frutos en la inflorescencia principal:

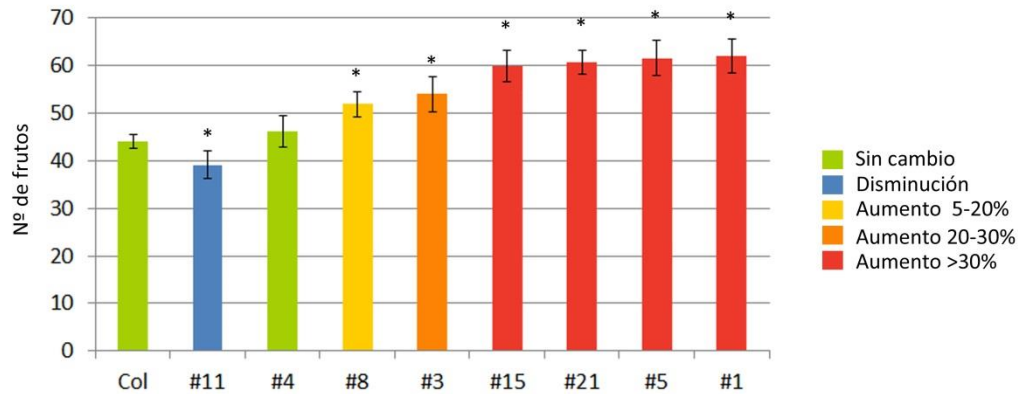
Los resultados del recuento de frutos producidos en la inflorescencia principal por las líneas transgénicas pTFL1::AP2<sup>170</sup> mostraron que de las ocho líneas homocigóticas independientes que fueron evaluadas, seis produjeron más frutos, una produjo menos y otra línea no mostró cambios significativos respecto a las plantas silvestres (Fig. 3-14). Clasificamos las líneas que aumentaron la producción de frutos en tres categorías en función del porcentaje de aumento del rendimiento:

- Incremento de 5-20%: Línea #8.
- Incremento de 20-30%: Línea #3.
- Incremento de más del 30%: Líneas #1, #5, #15 y #21.

Las mejores líneas llegaron a producir hasta un 40% más frutos que las plantas silvestres (39,68% la línea #5 y 40,59% la línea #1).

Estos resultados podrían servir por lo general como estimadores de la producción total de la planta, ya que el efecto del transgén sobre la prolongación de la vida del SAM ocurriría de igual manera en los meristemos apicales de todas las inflorescencias de la planta. Las únicas excepciones podrían ser las líneas #5 y #15, donde habíamos observado la reducción en el número de hojas caulinares producidas y por tanto de coflorescencias secundarias. En dichas líneas, probablemente, la producción del número de frutos en la inflorescencia principal no fuera un buen estimador de la producción total de la planta.

Por otro lado, el retraso de floración que habían presentado las líneas #4 y #15 no parecía estar involucrado en la producción de frutos en la inflorescencia principal, puesto que tan solo en la línea #15 había aumentado la producción de frutos.



**Figura 3-14: Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::AP2<sup>170</sup>.** Las diferentes líneas transgénicas están ordenadas de menor a mayor producción de frutos. Aparecen coloreadas en verde aquellas líneas que no muestran diferencias significativas respecto a Col, en azul las líneas que presentan disminución del rendimiento en frutos, en amarillo las líneas con un incremento de la producción del 5-20%, en naranja las líneas con un incremento del 20-30% y en rojo las líneas con un incremento superior al 30%. Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. \* representa diferencias significativas respecto a Col con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

✓ Número y peso de semillas:

Continuamos con la caracterización fenotípica cuantificando la producción de semillas únicamente en cuatro de las líneas más productivas en cuanto a número de frutos en la inflorescencia principal. Calculamos la producción media de semillas por fruto y su peso a partir del número de semillas producidas en cinco frutos de 5-10 plantas de cada línea transgénica, y posteriormente estimamos el peso de 100 semillas (Fig. 3-15 A). Las líneas #15 y #21 produjeron significativamente un mayor número de semillas por silicua que el silvestre, lo que unido a la producción de frutos en la inflorescencia principal generaba un incremento en la producción de semillas en la inflorescencia principal del 49% y el 59% respectivamente. Las líneas #1 y #5, más productivas respecto a frutos en el tallo principal, alcanzaban un incremento estimado de semillas del 39%, algo menor que en las líneas anteriores. En cuanto al peso de las semillas por fruto no observamos diferencias significativas entre las líneas transgénicas estudiadas y el silvestre, así como tampoco apreciamos cambios en el tamaño y la morfología de las semillas (Fig. 3-15 B).

Según los resultados obtenidos con la caracterización fenotípica realizada, las líneas pTFL1::AP2<sup>170</sup> más productivas fueron la #15 y la #21, con un incremento en la producción de frutos en la inflorescencia principal del 36% y el 37,87% respectivamente, lo cual, sumado a la mayor producción de semillas por silicua, producía un incremento de producción de semillas en la inflorescencia principal del 49% y el 59% respectivamente. Estas líneas no mostraron defectos en el desarrollo de la inflorescencia ni de las flores y frutos, así como tampoco variaciones en la morfología o el tamaño de las semillas.

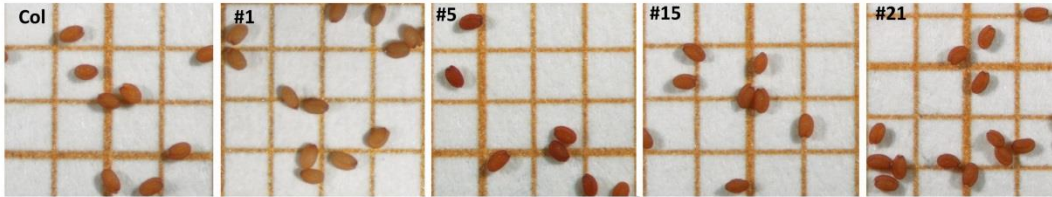
Los resultados obtenidos con esta construcción mostraban que la estrategia de sobreexpresar AP2 en el SAM era más eficiente para aumentar la producción de frutos que la estrategia de reducir la expresión de FUL en el SAM. Por tanto decidimos seguir testando nuevos abordajes para incrementar la expresión de AP2 únicamente en el meristemo apical del tallo.

**A**

Línea	Frutos en el tallo principal	Semillas/fruto	Estimación del nº de semillas en el tallo principal	Peso semillas/fruto (mg)	Peso 100 semillas (mg)
Col	44,10 ± 1,45	54,00 ± 4,32	2381,40	1,21 ± 0,14	2,24
pTFL1::AP2 <sup>170</sup>	#15	60,00 ± 3,32*	59,31 ± 4,29*	3558,67	1,14 ± 0,12
	#21	60,80 ± 2,53*	62,24 ± 4,05*	3784,19	1,23 ± 0,14
	#5	61,60 ± 3,66*	53,96 ± 5,24	3323,66	1,21 ± 0,05
	#1	62,00 ± 3,58*	54,27 ± 2,9	3364,53	1,20 ± 0,13

**B**



Tamaño de semilla (mm<sup>2</sup>): Col 0,112 ± 0,008; #1 0,115 ± 0,059; #5 0,117 ± 0,009; #15 0,109 ± 0,006; #21 0,113 ± 0,008

**Figura 3-15: A) Producción de semillas de algunas de las líneas pTFL1::AP2<sup>170</sup> seleccionadas por presentar mayor producción de frutos en la inflorescencia principal.** Los valores mostrados indican la media ± SD. La media del nº de frutos producidos en la inflorescencia principal por las diferentes líneas transgénicas y Col se ha calculado a partir de al menos 10 plantas por línea. La media del nº y peso de semillas por fruto se ha calculado a partir de las semillas producidas en cinco frutos de 5-10 plantas por línea. El peso de 100 semillas se ha estimado con la fórmula peso semillas por fruto/ semillas por fruto x 100. La producción total de semillas en la inflorescencia principal se ha estimado con la fórmula semillas por fruto x nº frutos en el tallo principal. \* indica diferencias significativas respecto a Col con p ≤ 0,05. Prueba T-Student. **B) Comparación de la morfología de las semillas.** El tamaño de cada celda es de 1 mm<sup>2</sup>. En la parte inferior de cada imagen se muestra el área media en mm<sup>2</sup> ± SD de las semillas.

### pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172

Si con un alelo parcialmente resistente al miR172 habíamos conseguido bloquear lo suficiente la represión del miR172 sobre AP2 como para retrasar el GPA y conseguir hasta un 40% más de producción de flores, era posible pensar que pudiéramos mejorar los resultados si usábamos un alelo totalmente resistente a la degradación mediada por el miR172. En la bibliografía se encuentran descritas una serie de mutaciones en la secuencia de reconocimiento del miR172 que impiden totalmente el apareamiento eficiente del mensajero de AP2 con el miR172. Seleccionamos el alelo AP2m3, que incluye seis cambios de nucleótidos en la secuencia diana del miR172 pero no introduce cambios en la secuencia de la proteína (Chen, 2004).

Por otra parte, puesto que nuestros resultados indicaban que no solo AP2 participa en la regulación del GPA, sino que posiblemente también estarían participando el resto de miembros de la familia AP2-like regulados por el miR172 (Capítulo 1), podíamos predecir que aumentando la expresión de más miembros de esta familia en el SAM también podríamos aumentar la producción de frutos. Para ello empleamos una herramienta que permite bloquear la acción de un miRNA determinado mediante la expresión de un RNA artificial *mimicry*, o MIM-RNA capaz de secuestrar los complejos RISC<sup>miRNA</sup> y así reducir la actividad de los miRNAs endógenos (Todesco *et al.*, 2010). En este estudio utilizamos el MIM172, cuya funcionalidad ya ha sido validada anteriormente (Todesco *et al.*, 2010).



Para sobreexpresar el alelo de *AP2* totalmente resistente a la represión del miR172, así como para sobreexpresar todos los miembros de la familia de factores de transcripción *AP2* únicamente en el SAM, generamos las construcciones pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172. Posteriormente transformamos *Arabidopsis* con estas construcciones y se seleccionaron por lo menos 25 líneas T1 independientes en cada una de las construcciones. El procedimiento que se siguió a continuación se encuentra descrito en el esquema de trabajo detallado al inicio de este capítulo.

### Evaluación del desarrollo general de la planta y los frutos

Durante la selección de líneas T1 de ambas construcciones encontramos algunas plantas que mostraron defectos en la determinación del meristemo floral. Los fenotipos encontrados eran similares a los observados en plantas 35S::AP2m3 (Fig. 3-16 A) (Chen, 2004): flores con mayor número de órganos florales, frutos que desarrollan en su interior nuevos órganos carpeloides o, en los casos con fenotipos más débiles, aparición de valvas extra (Fig. 3-16 B). Estos fenotipos indicaban que probablemente estábamos aumentando el nivel de expresión de *AP2* en estas líneas, pero también que en algunos casos el promotor de *TFL1* no estaba dirigiendo su expresión específicamente al SAM. Por ello seleccionamos únicamente líneas T1 donde no se observaran fenotipos de indeterminación del meristemo floral y realizamos una cuantificación preliminar del número de frutos producidos en la inflorescencia principal. Tras el análisis de segregación de la resistencia realizado con las semillas de la generación T2 observamos que 2 líneas de la construcción pTFL1::MIM172 que habían mostrado un considerable aumento de producción de frutos en la inflorescencia principal en la generación T1 eran portadoras de dos copias del transgén insertadas en localizaciones independientes del genoma. Aunque por lo general durante este trabajo únicamente seleccionábamos líneas portadoras de una única inserción del T-DNA, para esta construcción hicimos una excepción e incluimos en la caracterización fenotípica también esas líneas con dos inserciones.



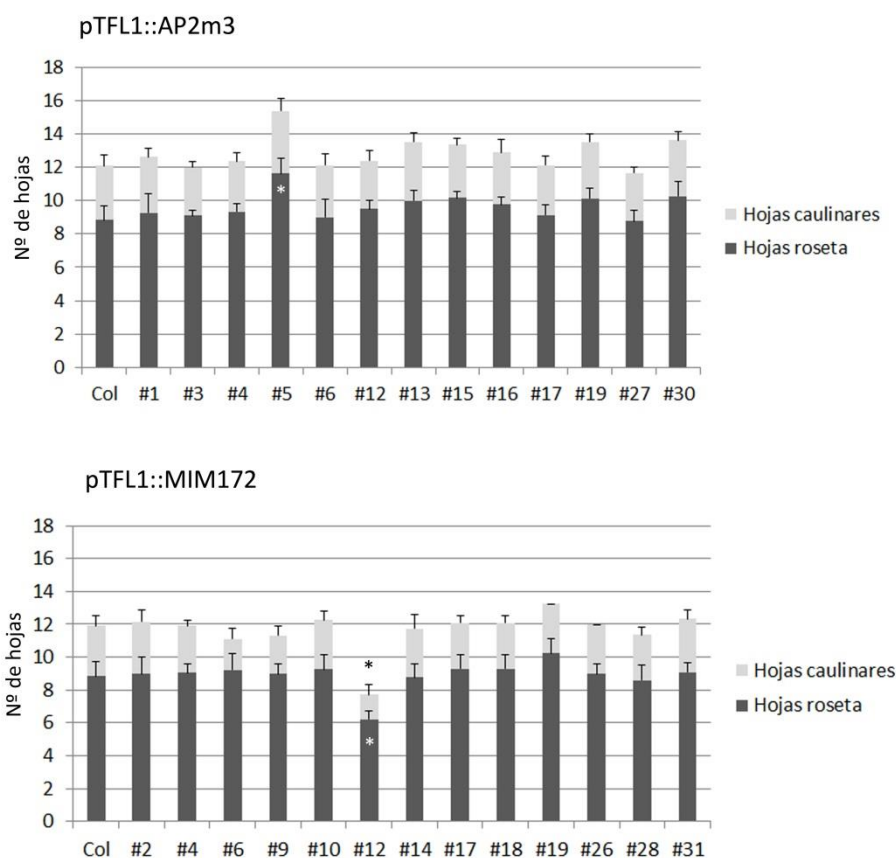
**Figura 3-16:** A) Fenotipo propio de flores 35S::AP2m3. Extraído de (Zhao et al., 2007). B) Indeterminación del meristemo floral en algunas líneas transgénicas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172. Los defectos que suelen aparecer con estas construcciones son la presencia de flores con multitud de órganos florales o silicuas que desarrollan en su interior nuevos primordios florales, causado por la adquisición de indeterminación del meristemo floral. Barra de escala: 5 mm.



Caracterización fenotípica

✓ Tiempo de floración:

El recuento de hojas de roseta y hojas caulinares en algunas de las líneas de ambas construcciones indicaba que ninguno de los dos transgenes alteraba notablemente la transición floral de las plantas transformadas respecto a plantas silvestres (Fig. 3-17). Como no habíamos encontrado diferencias importantes en el tiempo de floración de las líneas estudiadas, decidimos no ampliar la evaluación al resto de las líneas y continuar con la caracterización de la producción de frutos en la inflorescencia principal.

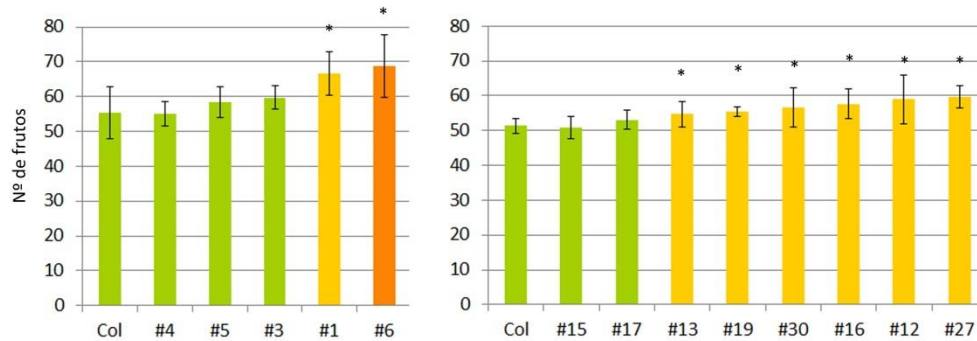


**Figura 3-17 : Tiempo de floración de las líneas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172, determinado mediante el recuento del nº de hojas de roseta y hojas caulinares producidas.** Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos blancos y negros representan diferencias significativas respecto a Col en número de hojas de roseta y hojas caulinares respectivamente, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

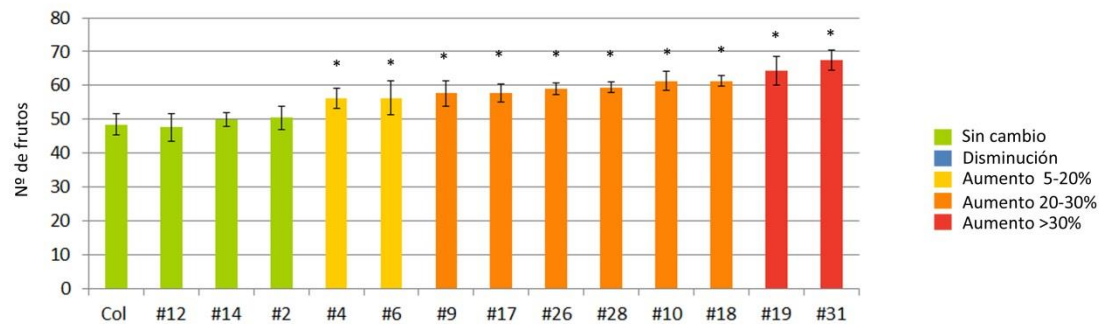
✓ Número de frutos en la inflorescencia principal:

Con la construcción pTFL1::AP2m3, de las 13 líneas homocigóticas caracterizadas conseguimos siete que aumentaban la producción de frutos entre un 5 y un 20% y una línea que aumentaba un 24%. Con la construcción pTFL1::MIM172, para la que también fueron caracterizadas 13 líneas homocigóticas, encontramos dos líneas en las que el número de frutos producidos aumentó entre un 5 y un 20%, seis en las que aumentó entre 20-30% y dos que llegaron a producir hasta un 25-40% más de frutos en la inflorescencia principal que el silvestre (Fig. 3-18).

pTFL1::AP2m3



pTFL1::MIM172



**Figura 3-18: Producción de frutos en la inflorescencia principal de las líneas transgénicas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172.** Para pTFL1::AP2m3 se incluyen dos gráficas porque la caracterización se realizó en tiempos distintos y la variación de las condiciones de crecimiento alteró el nivel de producción de todas las plantas, incluyendo las silvestres. Las diferentes líneas transgénicas están ordenadas de menor a mayor producción de frutos. Aparecen coloreadas en verde aquellas líneas que no muestran diferencias significativas respecto a Col, en azul las líneas que presentan disminución del rendimiento en frutos, en amarillo las líneas con un incremento de la producción del 5-20%, en naranja las líneas con un incremento del 20-30% y en rojo las líneas con un incremento superior al 30%. Se muestra la media de 10 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. \* representa diferencias significativas respecto a Col con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

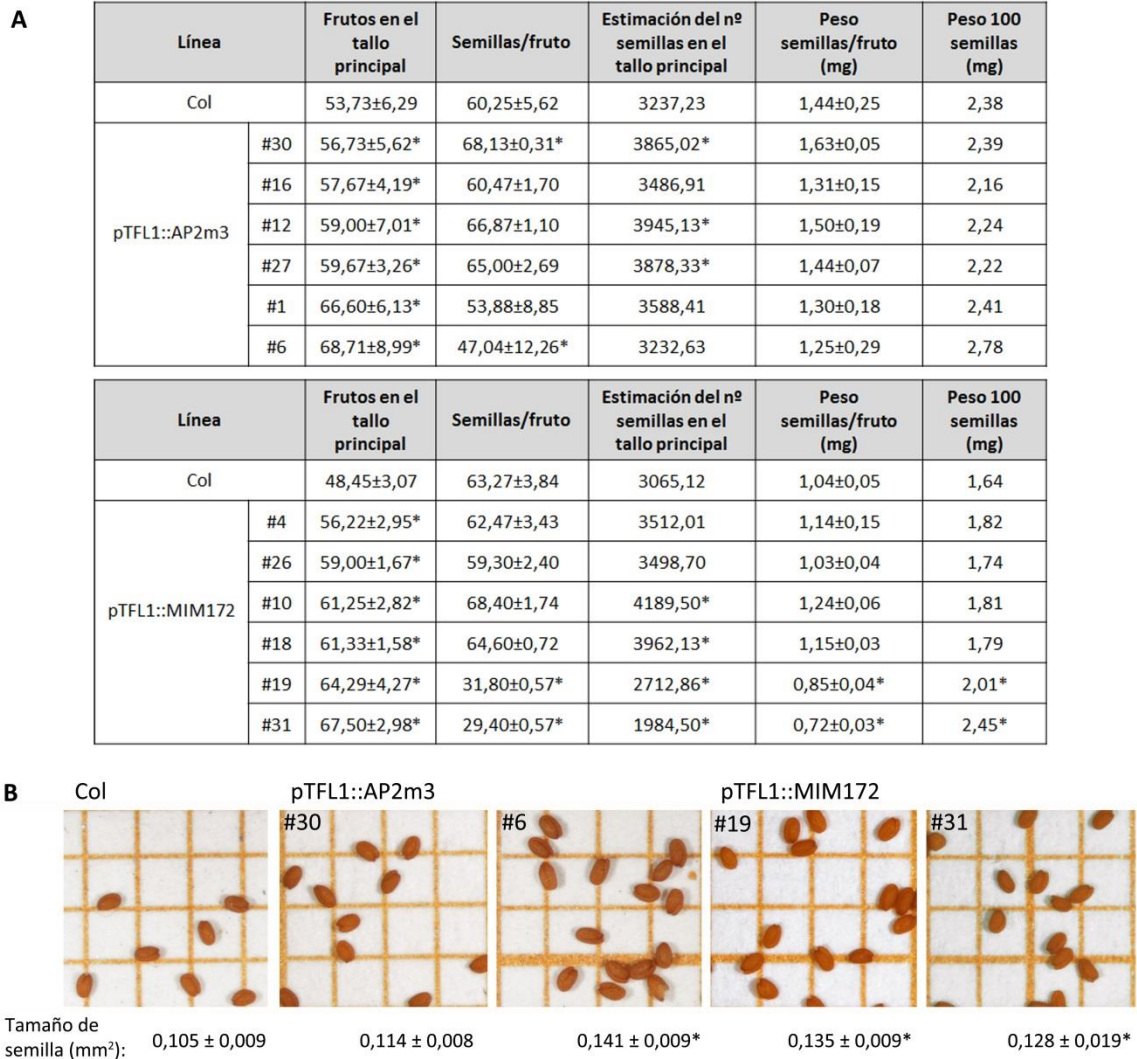
## ✓ Número y peso de semillas:

Para realizar la caracterización de la producción de semillas seleccionamos algunas de las líneas que habían presentado mejores valores de rendimiento en número de frutos en la inflorescencia principal. Al igual que con las construcciones anteriormente descritas, calculamos el número medio de semillas por fruto y su peso mediante el recuento de las semillas producidas en cinco silicuas de al menos tres plantas en cada una de las líneas evaluadas.

Según los resultados obtenidos, las líneas pTFL1::AP2m3 #6 y pTFL1::MIM172 #19 y #31, que fueron las que habían tenido mejor rendimiento en frutos, produjeron menor número de semillas por silicua, aunque las semillas eran más grandes y pesaban más (Fig. 3-19). En el caso de pTFL1::AP2m3 #6, la reducción de semillas por fruto se compensaba con el aumento de frutos en la inflorescencia principal, con lo que finalmente la producción de semillas en la inflorescencia principal fue similar a la de las plantas silvestres. Esto no ocurría con las líneas pTFL1::MIM172 #19 y #31, donde la producción de semillas en la inflorescencia no se llegaba a compensar, sino que se veía reducida significativamente.

La línea pTFL1::AP2m3 #30 produjo unas ocho semillas más que Col por silicua, pero no se observaron cambios significativos en el peso de éstas (Fig. 3-19 A) ni en su tamaño (Fig. 3-19 B). Aunque el incremento de frutos en la inflorescencia principal de esta línea solo había sido del 10,51%, al sumarle el aumento en la producción de semillas por silicua, esta línea llegaba a producir 19,25% más semillas en el tallo principal que las plantas silvestres.

Tras evaluar todos los resultados de la caracterización en conjunto, decidimos eliminar las líneas pTFL1::AP2m3 #6 y pTFL1::MIM172 #19 y #31, a pesar de que habían resultado ser las más productivas en cuanto a la producción de frutos en la inflorescencia principal, debido a la reducción en la producción de semillas por silicua, que afectaba de forma negativa en la producción de semillas total. En cambio, seleccionamos las siguientes líneas más productivas en cuanto a número de frutos y con una producción de semillas por silicua similar al silvestre, las líneas pTFL1::AP2m3 #27 y #1, con un incremento de producción de frutos en la inflorescencia principal del 16% y 20%, y las líneas pTFL1::MIM172 #10 y #18, con un incremento de producción de frutos del 28,7% y 28,8%.



**Figura 3-19: A) Producción de semillas de algunas de las líneas pTFL1::AP2m3 y pTFL1::MIM172 seleccionadas por presentar mayor producción de frutos en la inflorescencia principal.** Los valores mostrados indican la media ± SD. La media del nº de frutos producidos en la inflorescencia principal por las diferentes líneas transgénicas y Col se ha calculado a partir de al menos 10 plantas por línea. La media del nº y peso de semillas por fruto se ha calculado a partir de las semillas producidas en cinco frutos de 3-10 plantas por línea. El peso de 100 semillas se ha estimado con la fórmula peso semillas por fruto/ semillas por fruto x 100. La producción total de semillas en la inflorescencia principal se ha estimado con la fórmula “semillas por fruto x nº frutos en el tallo principal”. Como los datos de cada construcción procedían de experimentos realizados en tiempos distintos, la estimación de la producción de semillas en el tallo principal se ha calculado respecto a los valores de producción presentados por el Col incluido en el experimento correspondiente. \* indica diferencias significativas respecto a Col con p≤0,05. Prueba T-Student. **B) Comparación de la morfología de las semillas.** El tamaño de cada celdas es de 1 mm<sup>2</sup>. En la parte inferior de cada imagen se muestra el área media en mm<sup>2</sup> ± SD de las semillas. \* indica diferencias significativas respecto a Col con p≤0,05. Prueba T-Student.

## Validación de la estrategia más efectiva

### Reproducibilidad de los valores de producción de las líneas pTFL1::AP2<sup>170</sup>

Para asegurarnos de que los resultados obtenidos se debían al efecto del transgén y no a variación ambiental entre experimentos, repetimos la caracterización de la producción de frutos en la inflorescencia principal de las mejores líneas pTFL1::AP2<sup>170</sup> en diferentes ensayos independientes. En la tabla 3-2 se muestra el número de frutos producidos en la inflorescencia principal por las líneas transgénicas y por plantas silvestres Col en los diferentes ensayos realizados, así como el incremento de producción obtenido frente al silvestre en cada uno de ellos.

En todos los experimentos las líneas caracterizadas produjeron mayor número de frutos en la inflorescencia principal que las plantas silvestres, aunque el incremento de producción en cada uno de los experimentos fue variable. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en cuanto a producción de frutos en la inflorescencia principal, la media del incremento de rendimiento de las líneas #1, #3, #5, #15 y #21 fue de 29,19%, 21,9%, 30%, 32,87% y 37,52% respectivamente (Tabla 3-2).

Por tanto, podemos asegurar la eficacia de esta estrategia, ya que aunque los valores de producción fluctúan según las condiciones de crecimiento, las tendencias se mantienen, produciendo en todos los casos mayor número de frutos que el control silvestre.

Tabla 3-1 : Producción de frutos en la inflorescencia principal de las mejores líneas TFL1.:AP2<sup>170</sup> en diferentes experimentos.

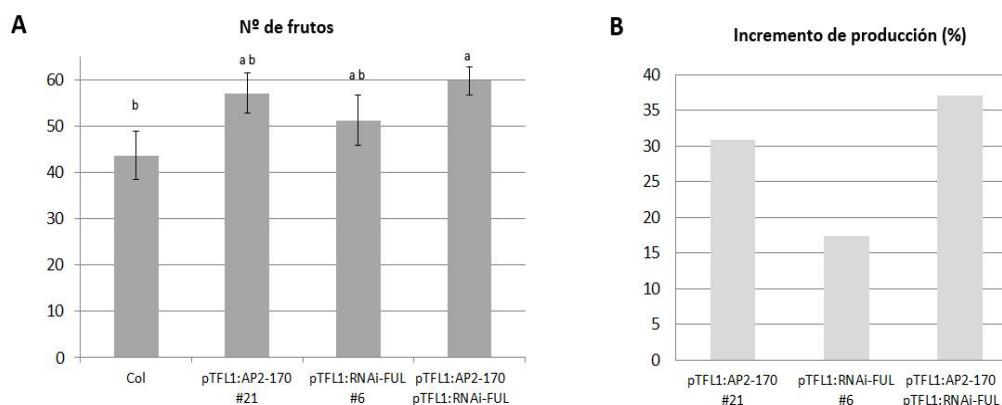
Línea	1º		2º		3º		4º		5º		media incremento de rendimiento en frutos (%)
	Frutos en el tallo principal	Incremento rendimiento (%)	Frutos en el tallo principal	Incremento rendimiento (%)	Frutos en el tallo principal	Incremento rendimiento (%)	Frutos en el tallo principal	Incremento rendimiento (%)	Frutos en el tallo principal	Incremento rendimiento (%)	
Col	44,10±1,45	-	44,50±4,35	-	56,43±3,87	-	56,30±3,99	-	50,74±3,77	-	-
#1	62,00±3,58	40,59	57,86±5,46	30,01	-	-	65,86±8,25	16,98	-	-	29,19
#3	54,00±3,79	22,45	54,00±3,79	21,34	-	-	-	-	-	-	21,9
#5	61,60±3,66	39,68	-	-	79,24±5,01	40,42	62,80±10,33	11,55	66,26±3,87	30,58	30
#15	60,00±3,34	36,05	-	-	77,25±5,31	36,90	70,75±4,06	25,67	-	-	32,87
#21	60,80±2,53	37,87	-	-	76,95±4,35	36,37	85,50±11,56	51,87	63,35±4,62	24,85	37,52

Frutos en la inflorescencia principal: Los valores mostrados indican la media de al menos 10 plantas ± SD. Incremento de rendimiento en frutos (%): El porcentaje de incremento de producción de frutos en la inflorescencia principal se ha calculado respecto a la producción de las plantas silvestres en cada uno de los ensayos.

## Efecto aditivo de la sobreexpresión de AP2 y silenciamiento de FUL en el SAM sobre la producción de flores y frutos

Los mutantes *ap2-170* y *ful* retrasaban el GPA y producían un 20 y 50% más flores que las plantas silvestres respectivamente, mientras que el doble mutante *ful-1 ap2-170* superaba la producción de los mutantes simples, aumentando el número de flores generadas en la inflorescencia principal hasta un 81%.

Esto sugería que combinando las líneas transgénicas que habíamos generado quizá podríamos incrementar aún más la producción de flores y frutos en la planta. Para ello generamos la línea pTFL1::AP2<sup>170</sup> pTFL1::RNAi-FUL mediante la fertilización cruzada de las mejores líneas seleccionadas de cada una de las construcciones: pTFL1::AP2<sup>170</sup> #21, que tras diferentes experimentos es la que mayor producción de frutos presenta de media, y pTFL1::RNAi-FUL #6. En F2 identificamos plantas que poseían ambos transgenes, mediante la amplificación por PCR del T-DNA, y recogimos sus semillas. En la generación F3, nuevamente identificamos la presencia de ambos transgenes en todas las plantas sembradas, aunque no podemos asegurar que se encontraran en homocigosis, y realizamos el recuento de frutos.



**Figura 3- 22: Producción de frutos en la inflorescencia principal:** A) Frutos producidos en la inflorescencia principal. Se muestra la media de al menos 5 plantas. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. a y b representan diferencias significativas respecto a Columbia y TFL1::AP2<sup>170</sup> TFL1::RNAi-FUL respectivamente, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student. B) % de incremento de producción respecto al silvestre.

En este experimento la línea TFL1::AP2<sup>170</sup> #21 produjo 57 frutos en la inflorescencia principal y la línea TFL1::RNAi-FUL #6, 51 frutos, lo que representa un incremento de producción frente a Col de 31% y 17% respectivamente, mientras que la línea doble produjo 59,75 frutos en la inflorescencia principal, aumentando la producción de frutos en un 37% frente a las plantas silvestres. El aumento que mostró la línea doble fue estadísticamente superior al incremento de frutos de las plantas pTFL1::AP2<sup>170</sup>, por lo que al igual que en el doble mutante, en la doble transgénica había mayor efecto sobre el control del GPA que con las líneas simples.





## DISCUSIÓN

La ruta FUL-AP2 de mantenimiento de la actividad meristemática podría tener una importante aplicación biotecnológica en la mejora genética de los cultivos incluidos dentro del grupo de las plantas monocárpicas.

En esta parte de la tesis hemos pretendido aplicar el conocimiento obtenido previamente sobre la regulación de la actividad meristemática por parte de FUL y AP2. Hemos propuesto una serie de estrategias que convergen en aumentar el nivel de expresión de AP2 únicamente en el SAM mediante el empleo de promotores específicos de tejido. Estas estrategias se han centrado en el silenciamiento de FUL, la expresión de una variante artificial de FUL que actuara como activador dominante (FUL:VP16), la expresión de alelos de AP2 resistentes a la regulación del miR172 o el bloqueo de la acción de dicho microRNA mediante la expresión de un RNA complementario al miR172 que dificulta la unión a sus dianas (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Todesco *et al.*, 2010).

Conseguir que todas las construcciones diseñadas, que llevarían al silenciamiento de FUL o a una disminución de la acción del miR172, se expresaran únicamente en el SAM era clave para el éxito de estas estrategias. Tanto FUL como AP2 intervienen en múltiples procesos del desarrollo de la planta, como el tiempo de floración, el desarrollo de las hojas caulinares, el desarrollo de flores, frutos y semillas, etc. (Aukerman and Sakai, 2003; Balanzà, 2011; Ferrandiz *et al.*, 2000b; Gu *et al.*, 1998; Jofuku *et al.*, 1994) y, de hecho, en los mutantes *ful* o *ap2-170* ya se observa un GPA tardío y un incremento en la producción de frutos del 45 y el 22% respectivamente, pero también múltiples efectos pleiotrópicos desventajosos desde el punto de vista de la producción (Balanzà, 2011). Por tanto, el uso de estos alelos o de construcciones diseñadas para disminuir la expresión de FUL o para aumentar la de AP2 que no fueran específicas del SAM no serían útiles para la mejora de los cultivos monocárpicas.

No hemos encontrado en la literatura ningún promotor que se haya descrito como específico del SAM. Muchos de los genes relacionados con el funcionamiento de los meristemas y que se expresan en éste, como *WUS*, *CLV3*, *STM*, etc. también se expresan en el meristemo floral, por lo que si empleáramos su promotor para dirigir la expresión de las construcciones que queríamos generar, también podríamos dirigir el silenciamiento de FUL o la sobreexpresión de AP2 a los meristemas florales, con la consiguiente malformación de las flores o los frutos. Otros genes que se ha descrito que se expresan en el SAM inflorescente, generalmente relacionados con la inducción floral, como *SOC1*, *FD* o *AGL24*, también se expresan en otros órganos como hojas, meristemas u órganos florales y por tanto tampoco serían óptimos (Abe *et al.*, 2005; Hepworth *et al.*, 2002; Michaels *et al.*, 2003; Wigge *et al.*, 2005). Aun así, seleccionamos dos genes cuyo patrón de expresión parecía ser compatible con nuestro diseño experimental. *TFL1* muestra una expresión localizada en una pequeña región en el centro del meristemo apical del tallo (Fig. 3-1 A), en el centro de los meristemas inflorescentes axilares (Bradley *et al.*, 1997; Conti and Bradley, 2007; Kobayashi *et al.*, 1999), el tejido vascular del tallo de la inflorescencia (Bradley *et al.*, 1997) y la raíz (Sohn *et al.*, 2007), pero no se ha observado en los meristemas florales o los gineceos y frutos. Por otro lado, el promotor del gen *FD* ha sido ampliamente utilizado en otros trabajos para dirigir la expresión de genes de interés al SAM (Galvao *et al.*, 2015; Ryu *et al.*, 2014). *FD* presenta una expresión en el SAM más extendida, abarcando todo el domo del meristemo de un modo similar a FUL, y también se expresa en los meristemas axilares. Sin embargo, se ha detectado

expresión de *FD* en los primordios de hoja, y también, aunque en menor nivel, en el centro de los meristemas florales a partir de estadio 3 (Fig. 3-1 B) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). Como se discute más adelante, los resultados que hemos obtenido con el promotor de *TFL1* son en general bastante específicos, cumpliendo con nuestras expectativas, aunque al tratar de silenciar a *FUL* no sea del todo eficiente. Por otro lado el empleo del promotor de *FD*, ha ocasionado con bastante frecuencia alteraciones relacionadas con la expresión en el meristemo floral, invalidando su empleo al menos en las estrategias que alteran la regulación del miR172.

Por todo ello, sería conveniente seguir buscando promotores alternativos. El promotor “ideal” para nuestro proyecto debería expresarse en todo el SAM inflorescente (y meristemas axilares), pero no en otros tejidos, y además su expresión debería mantenerse o incluso aumentar con el tiempo. Aunque en la literatura no hay tantos promotores analizados donde se detalle con precisión su patrón espacial y temporal, podemos recurrir a otras fuentes. Actualmente existen multitud de bases de datos de RNAseq y similares que podrían analizarse para encontrar genes compatibles con el patrón de expresión que requerimos. Posteriormente, se analizarían más en detalle, mediante el empleo de líneas reportadoras o hibridación *in situ* del RNA.

De igual forma, si queremos extender las estrategias propuestas a otras especies, sería necesario la validación de los promotores empleados o la búsqueda de promotores específicos de SAM en esas otras especies.

### **El silenciamiento postranscripcional de *FUL* en el SAM incrementa la producción de frutos sin alterar su desarrollo.**

La primera estrategia que planteamos para retrasar el GPA fue eliminar la expresión de *FUL* mediante silenciamiento postranscripcional. Para ello generamos dos construcciones, una que contenía un RNAi-*FUL* dirigido por el promotor de *TFL1* y otra con un amiR-*FUL* bajo el control del promotor de *FD*. Con ambas construcciones conseguimos incrementos en la producción de frutos en la inflorescencia principal del 10-18% en el caso de TFL1::RNAi-*FUL* y 6-10% para FD::amiR-*FUL* sin que se produjeran otros efectos desventajosos en el desarrollo .

A pesar de que el promotor de *TFL1* se expresa en un dominio muy restringido en el SAM mientras que *FD*, que tiene una expresión más similar a la de *FUL*, se expresa en todo el meristemo, la construcción TFL1::RNAi-*FUL* funcionó mejor que la FD::amiRNAi-*FUL*. Inicialmente habríamos esperado lo contrario, que con el promotor de *FD* llegáramos a silenciar más la expresión de *FUL* y hubiéramos obtenido mejores resultados.

Una de las posibles explicaciones es que el RNAi dirija de forma más eficiente el silenciamiento de *FUL* que el amiR empleado, aunque según el fenotipo presentado por las plantas 35S::amiR-*FUL*, en particular el efecto de retraso del GPA en alguna de las líneas T1, sí se estaba induciendo el silenciamiento de *FUL*. No obstante no sabemos cómo se habría comportado el RNAi-*FUL* bajo el control del promotor 35S, si hubiera presentado fenotipos similares a los de 35S:amiR-*FUL* o por el contrario hubiera tenido fenotipos más severos. Al igual que tampoco hemos estudiado el comportamiento del amiR-*FUL* bajo el control del promotor de *TFL1*. Por tanto, no podemos estimar si la eficiencia del silenciamiento mediante el RNAi o amiR empleados son similares. La

forma más directa de comprobar si el silenciamiento de *FUL* en ambos tipos de líneas está siendo similar, es la cuantificación mediante Q-RT-PCR de *FUL*. Sin embargo, como queremos detectar la variación de expresión en el SAM, y la expresión en otros tejidos lo enmascararía, deberíamos recurrir a técnicas algo más sofisticadas para la recolección del material a estudiar, como la microdissección laser del SAM.

Por otro lado, podrían existir otras posibilidades que explicaran los peores resultados obtenidos con las líneas FD::amiR-*FUL*. Tal vez, la disminución de los niveles de *FUL* en el meristemo estuviera reduciendo de alguna forma a la expresión de *FD*, y por tanto también el amiR-*FUL*, y eso haría que finalmente el silenciamiento no fuera demasiado efectivo. Sin embargo, hasta el momento en la literatura solo está descrito que *FD*, junto a *FT* o los factores de transcripción SPL3/4/5 activan la expresión de *FUL* (Jung *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009), pero no al revés.

Pese a que los resultados con el RNAi-*FUL* y el amiR-*FUL* hayan diferido de algún modo de lo esperado, con ambos tipos de estrategias hemos conseguido incrementar la producción de la planta, que era nuestro objetivo.

### **FUL como activador transcripcional en el SAM no produce cambios en el rendimiento de frutos**

Según el modelo de regulación de la actividad meristemática que hemos propuesto, *FUL* reprime de forma indirecta la expresión de *WUS* en el SAM mediante la represión directa de *AP2*. Por tanto, además del silenciamiento de *FUL*, también probamos a intentar aumentar la expresión de *AP2* en el SAM generando un alelo de *FUL* que se comportara como un activador dominante, en concreto, FD::*FUL*:VP16. Con esta construcción esperábamos que *FUL*:VP16 activara la expresión de *AP2*, compitiendo con la versión endógena de *FUL*, que seguiría ejerciendo su función represora.

Los resultados obtenidos fueron en general peores que con las estrategias de silenciamiento de *FUL*. Estas líneas no presentaron defectos en el desarrollo de los frutos, pero ninguna incrementó la producción, sino que incluso algunas de ellas se redujo el número de frutos producidos en la inflorescencia principal. Por otro lado, la característica más relevante de estas líneas es que todas florecieron antes que el control silvestre. Aunque en un principio nuestro objetivo no fuera conseguir plantas con floración temprana, esta estrategia podría tener ciertas ventajas. Podría emplearse para mejorar los cultivos reduciendo el periodo vegetativo y adelantando la fase productiva de la planta sin afectar a su rendimiento. Además, esta estrategia, dependiendo del sistema de cultivo utilizado, como la producción en invernadero, donde se pueden realizar varias generaciones de cultivo al año, podría permitir aumentar el número de cultivos al año, con lo cual al final estaríamos aumentando también la producción.

Estos resultados se pueden explicar con el papel de *FUL* en la promoción de la floración. *FUL* activa a genes integradores de la transición floral y genes de identidad de meristemo floral actuando a través de diferentes rutas, como la ruta del fotoperiodo (Melzer *et al.*, 2008; Teper-Bamnlker and Samach, 2005; Wigge *et al.*, 2005) o la ruta endógena de la edad (Balanzà *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2009). El empleo del activador dominante *FUL*:VP16 estaría potenciando esa

activación, causando el adelanto de la floración. Sin embargo habríamos esperado que también mantuviera la actividad meristemática del SAM al final del desarrollo de la planta mediante la activación de la expresión de *AP2* y según los resultados obtenidos no parece que estuviera ocurriendo. Esto podría deberse a que la expresión de *FD* no se mantenga con el tiempo o que disminuya considerablemente, de hecho los datos disponibles en las bases de datos indican un descenso en la expresión de *FD* en el meristemo inflorescente tras la transición floral, aunque no se ha llegado a estudiar su nivel de expresión hasta el GPA (<http://bar.utoronto.ca>; <http://travadb.org>). Si esto fuera así, el efecto de *FUL:VP16* sería más fuerte durante las primeras etapas del desarrollo, mientras que al final del desarrollo sus niveles serían más bajos y competirían con el alelo endógeno *FUL* así como con el miR172 en el control de la expresión de *AP2*, por lo que finalmente la expresión de *AP2* disminuiría y se produciría el GPA. Podríamos estudiar cual es el efecto si se dirige la expresión de *FUL:VP16* con el promotor de *TFL1*. Los resultados que hemos obtenido en este capítulo indican que este promotor es útil para dirigir la expresión al meristemo durante las fases finales del desarrollo. Por tanto, es posible que las plantas *TFL1::FUL:VP16* consiguieran retrasaran el GPA.

### **Reduciendo la represión del miR172 se consigue aumentar el rendimiento en frutos de las plantas hasta en un 41%.**

El segundo grupo de estrategias que utilizamos para retrasar el GPA fue aumentar el nivel de expresión de *AP2* en el SAM disminuyendo el efecto de la represión del miR172 sobre *AP2* y otros genes de la familia de factores de transcripción *AP2*-like con distintas aproximaciones.

En primer lugar, quisimos dirigir la expresión del alelo *AP2*<sup>170</sup> únicamente al SAM con las construcciones *TFL1::AP2*<sup>170</sup> y *FD::AP2*<sup>170</sup>. Las líneas *FD::AP2*<sup>170</sup> mostraron por lo general severos defectos en el desarrollo floral relacionados con la indeterminación del meristemo floral. Estos fenotipos, aunque menos severos, recordaban a los que produce la sobreexpresión o expresión ectópica en la flor de alelos de *AP2* en los que se ha mutado el sitio de reconocimiento del miR172 y que se han relacionado con una actividad de *WUS* temporalmente prolongada durante el desarrollo floral (Chen, 2004; Liu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2007). Por un lado, esto nos permite concluir que la expresión de *FD* en el meristemo floral es significativa y al menos solapa temporalmente con la ventana en la que *WUS* debe ser reprimido para una correcta terminación del meristemo, lo cual disminuye su utilidad en este tipo de estrategias. Por otro, que *AP2*<sup>170</sup> es probablemente capaz de activar a *WUS* no solo en el SAM sino también en otro tipo de meristemas, lo cual de nuevo supone un apoyo a nuestro modelo de regulación temporal de la actividad proliferativa de los mismos.

Con la construcción *TFL1::AP2*<sup>170</sup>, la mayoría de las líneas mostraron un incremento de la producción (medida como número de frutos en la inflorescencia principal) de entre un 18 y un 40%. Repetimos la evaluación de estas líneas transgénicas durante varios experimentos independientes y aunque el rendimiento varió de uno a otro, las tendencias se mantuvieron. En todos los experimentos realizados, las líneas *TFL1::AP2*<sup>170</sup> caracterizadas fueron más productivas que el control silvestre, y no presentaban otros efectos negativos en el desarrollo de la planta. Por tanto, esta estrategia cumplía con los objetivos que habíamos planteado.

La mutación que porta el alelo *AP2*<sup>170</sup> tan solo cambia un nucleótido en el sitio de reconocimiento del miR172, reduciendo la estabilidad del apareamiento entre ambos y también introduciendo un cambio de aminoácido en la secuencia codificante de *AP2* (Balanzà, 2011). Se ha descrito otro alelo artificial, *AP2m3* en el que se han introducido seis mutaciones silenciosas y que, en principio, anula la regulación por el miR172 (Chen, 2004), por lo que era de esperar que una estrategia equivalente pero que empleara el alelo *AP2m3* sería más eficiente. Sin embargo, aunque la mayoría de las plantas *TFL1::AP2m3* también aumentaron la producción de frutos en la inflorescencia principal, el incremento tan solo varió entre el 6 y el 24%, quedando por debajo de los resultados obtenidos con la versión *AP2*<sup>170</sup>. Por un lado, esto sugiere que aumentar los niveles de expresión de *AP2*, en este caso impidiendo su reconocimiento por el miR172, es suficiente para mantener la capacidad proliferativa de los meristemas. Por otro, también sugiere que el cambio en la secuencia de aminoácidos que incorpora la variante *AP2*<sup>170</sup> es importante para la función de la proteína y que quizá sería interesante explorar nuevas variantes alélicas con otros cambios en la secuencia de la proteína en este dominio.

Como se ha planteado durante el primer capítulo de esta tesis, no solo *AP2* participa en el control del GPA, sino que también parecen estar implicados otros miembros de la familia *AP2-like*, por lo que nos planteamos incluirlos también en este tipo de estrategias. Pensamos que si aumentáramos conjuntamente el nivel de expresión de todos ellos se podría obtener un efecto significativo en el incremento de producción de la planta, por lo que generamos la construcción *TFL1::MIM172* para reducir la actividad de los miR172 endógenos y consecuentemente aumentar la actividad de sus dianas, los genes *AP2-like*. De nuevo, la mayoría de las líneas mostró un GPA tardío, consiguiendo incrementos del rendimiento en frutos del 18 al 41%, resultados muy similares a los obtenidos con las líneas transgénicas *TFL1:AP2*<sup>170</sup>, aunque en este caso, la proporción de líneas con rendimiento mayor del 30% fue mucho mayor, lo cual apoyaba la hipótesis de que en el control genético del GPA participaban varios miembros de la familia *AP2-like*.

### **La estrategia más efectiva para incrementar el rendimiento en frutos en plantas monocárpicas ha sido reducir la represión del miR172**

La disminución en la expresión de *FUL* en el dominio de expresión de *TFL1* o *FD* ha conseguido retrasar ligeramente la parada de la actividad meristemática del SAM, aumentando la producción de frutos en el tallo principal en un 10% en el caso de *pFD::amiR-FUL* o un 17% con *TFL1::RNAi-FUL*, sin ocasionar defectos en el desarrollo de la inflorescencia, flores, frutos o semillas. La estrategia de aumentar el nivel de expresión de *AP2* en el SAM interfiriendo de un modo u otro en su regulación por el miR172 ha producido resultados variables, dependiendo principalmente del promotor empleado para dirigir la expresión del transgén. Cuando se empleó el promotor de *FD* para expresar el alelo *AP2*<sup>170</sup>, parcialmente resistente a la represión del miR172, obtuvimos fenotipos de indeterminación del meristemo floral que alteraban el desarrollo de los frutos y repercutían negativamente en el rendimiento en semillas de la planta. Sin embargo, aumentando la expresión de *AP2* en el dominio de expresión de *TFL1*, hemos obtenido líneas donde el desarrollo de los frutos es normal y se eleva el rendimiento de la planta., llegando a incrementos de la producción de frutos en la inflorescencia principal del 20% con

### CAPÍTULO 3

pTFL1::AP2m3, 29% con pTFL1::MIM172 y 38% con pTFL1::AP2<sup>170</sup> y en la mayoría de los casos, el incremento fue aún mayor en el rendimiento en número de semillas en la inflorescencia principal, llegando a valores de 35, 20 y 59% respectivamente (Tabla 3-2).

**Tabla 3-2: Resumen de las líneas seleccionadas en cada una de las construcciones realizadas.**

Construcción	Línea seleccionada	Incremento rendimiento en frutos (%)	Incremento rendimiento en semillas (%)
pTFL1::RNAi-FUL	#6	18	21
pFD::amiR-FUL	#17	10	4
pTFL1::AP2 <sup>170</sup>	#15	36	49
	#21	38	59
pTFL1::AP2m3	#1	20	0
	#27	16	20
pTFL1::MIM172	#10	29	35
	#18	29	29

Tras analizar en conjunto los resultados de todos los abordajes realizados, se puede ver que aunque la estrategia de disminuir el nivel de expresión de *FUL* en el SAM consigue ligeros incrementos en la producción de frutos, destacando la construcción pTFL1::RNAi-FUL, la estrategia que realmente se ha mostrado más eficiente para prolongar la actividad del SAM e incrementar así la producción de frutos, ha sido la sobreexpresión de *AP2* en el SAM. Dentro de esta estrategia, las construcciones con mejores resultados han sido pTFL1::AP2<sup>170</sup> y TFL1::MIM172.

Todo ello nos lleva a pensar en diseñar nuevas alternativas que pudieran aportar mejoras en el rendimiento. Por un lado sería necesario continuar con la búsqueda de promotores que fueran específicos del SAM, pero con una expresión fuerte y por todo el meristemo, que permitieran silenciar con mayor eficiencia a *FUL*. Por otro, se podrían probar combinaciones de las diferentes estrategias propuestas, ya que en un primer estudio realizado con la combinación de TFL1::RNAi-FUL y TFL1::AP2<sup>170</sup>, observamos que las plantas TFL1::RNAi-FUL TFL1::AP2<sup>170</sup> aumentaron la producción respecto a las que solo portaban una de las construcciones. También se podrían probar otras variantes alélicas de *AP2* o de otros *AP2-like*. Por ejemplo se podría probar a expresar en el SAM una variante alélica de *AP2* totalmente resistente a la regulación del miR172 pero que además incorporara el mismo cambio de nucleótido presente en la mutación *AP2*<sup>170</sup>, que podría estar causando un ligero cambio en la estructura cuaternaria de la proteína o algún otro efecto funcional, ya que con el alelo *AP2*<sup>170</sup> se han obtenido mejores resultados que con *AP2m3*. También se podría explorar si otros cambios de aminoácido en la región de reconocimiento del miR172, en la misma posición que el cambio de la mutación *ap2-170* o en otras, tienen mejores efectos. Según los resultados que hemos obtenido, tanto en el estudio de la línea 35S:miR172 en el capítulo 1 como TFL1::MIM172 en este capítulo, otros miembros de la familia *AP2-like* podrían estar regulando la actividad meristemática. Por tanto, también se podría probar a diseñar alelos mutantes equivalentes en otros genes *AP2-like*. De hecho aunque todos los *AP2-like* están regulados por el miR172, la secuencia de reconocimiento no es idéntica en todos ellos. Como la acción del miR172 se da tanto a nivel de regulación de la cantidad de transcrito como de la traducción, es posible que los diferentes tipos de alelos de *AP2* (*AP2*<sup>170</sup> y

*AP2m3*) estén alterando la regulación del miR172 a diferente nivel. Por ello, adquirir una mejor comprensión del comportamiento del transcrito o de la proteína podría ser útil para optimizar cualquier tipo de estrategia para incrementar la producción de la planta.

### **Aplicación a otros cultivos de importancia económica**

Mediante las estrategias de transformación genética propuestas en este trabajo se ha conseguido incrementar la producción de *Arabidopsis thaliana*, pero el siguiente paso es la aplicación de esta herramienta biotecnológica a otras plantas monocárpicas que se cultiven por su importancia económica.

Algunos cultivos pertenecientes a la familia de las Brassicaceas, como la colza (*Brassica napus*) o las mostazas (*Sinapis* sp.), cultivadas para la producción de semillas, son las primeras dianas para la aplicación de esta tecnología, ya que al pertenecer a la misma familia que *Arabidopsis*, existe un alto grado de conservación genética y funcional (Cavell *et al.*, 1998; Lukens *et al.*, 2003). En *Brassica napus* se identificó el gen *BnAP2*, ortólogo de *AtAP2* (Yan *et al.*, 2012) y se vio que en líneas transgénicas RNAi-BnAP2, donde se elimina la expresión de este gen, aparecían los mismos defectos en el desarrollo de las flores que en los mutantes *ap2* de *Arabidopsis*. Aunque habría que comprobar si el gen *BnAP2* también participa en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática y si es regulado por los mismos factores que en *Arabidopsis*, es muy probable que la introducción de las construcciones genéticas diseñadas en este trabajo causen en colza el mismo efecto que han producido en *Arabidopsis*.

Otros cultivos más alejados filogenéticamente, como las leguminosas, también podrían ser mejorados mediante esta estrategia. Diferentes trabajos realizados en guisante han mostrado que en esta especie se produce también el GPA y que la eliminación de los frutos retrasa su aparición (Lockhart and Gottschall, 1961; Wang and Woolhouse, 1982), al igual que en *Arabidopsis*, por lo cual podrían estar conservados los mecanismos de regulación. Esta hipótesis está en parte apoyada por el trabajo que hemos realizado en el último capítulo de esta tesis, donde hemos estudiado la conservación funcional de *FUL* en el control del GPA en guisante.

Sin embargo no hay que olvidar que estas estrategias, que conllevan el incremento en la producción de frutos y semillas de forma escalada no son aplicables a todos los cultivos monocárpicas. En algunos cultivos interesa la producción de hojas, tallos o raíces, como en el caso de *Brassica oleracea* o *Solanum tuberosum*. Y en los cultivos aprovechados por los frutos o las semillas hay ocasiones donde una producción escalada, donde habrá que ir recolectando los frutos a medida que vayan alcanzando su grado óptimo de maduración, no interesa y tradicionalmente se han seleccionado variedades que produzcan el máximo antes de una única cosecha.





## **CAPÍTULO 4:**

**Estudio de la conservación funcional de la ruta  
FUL-AP2 en otras especies y posible aplicación para  
la mejora genética de los cultivos.**



Gran parte de las especies cultivadas en la actualidad por su alto valor económico se incluyen dentro del grupo de las plantas monocárpicas. Por ejemplo, dentro de este grupo encontramos monocotiledóneas como el trigo, la cebada o el arroz y dicotiledóneas como las pertenecientes a la familia de las brasicáceas, destacando la colza o la camelina, que tienen gran importancia en la industria de producción de biofuel, y la familia de las leguminosas, que representan más de un cuarto de la producción primaria de cultivos en el mundo con múltiples cultivos de importancia proteaginosos, como soja, guisante, lenteja, habas y garbanzos.

Estudiar los mecanismos que regulan la actividad y el momento de parada del SAM en estos cultivos y la obtención de recursos genéticos que se puedan emplear para la mejora de la producción o la mejor adaptación a diversos ambientes puede reportar grandes beneficios económicos a los productores y a toda la cadena productiva.

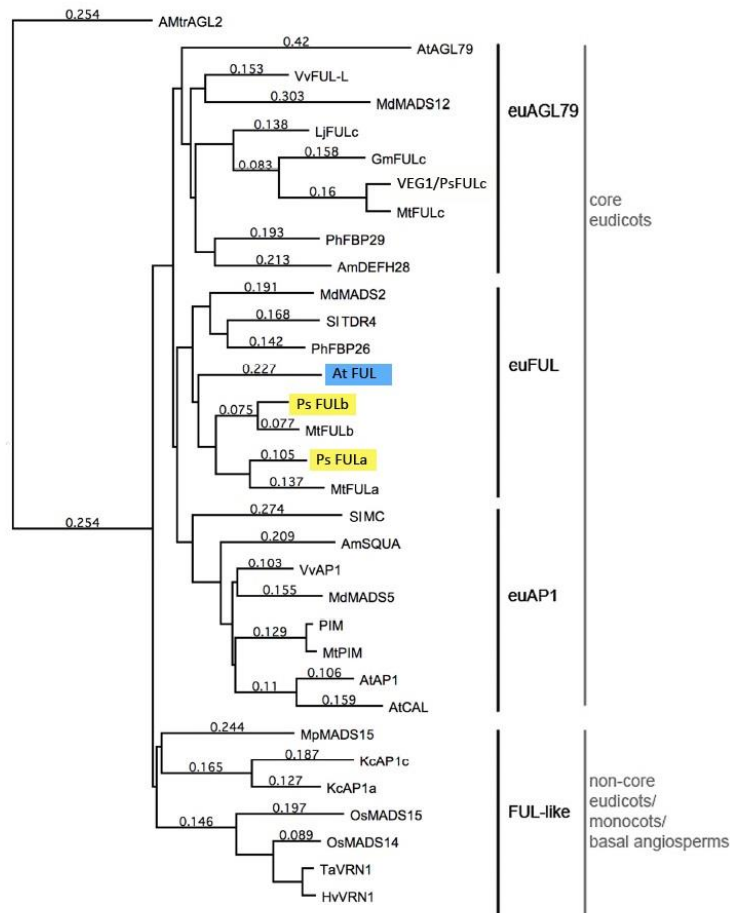
Las estrategias propuestas en el capítulo anterior para incrementar la producción en *Arabidopsis* mediante la prolongación de la actividad del SAM podrían ser aplicadas en otros cultivos. Principalmente los cultivos susceptibles de ser mejorados mediante esta tecnología serían colza, camelina o mostazas, puesto que todos ellos pertenecen a la misma familia que *Arabidopsis* y se ha reportado que tanto los genes *FUL* y *AP2* como sus funciones están bastante conservadas dentro de la familia. Por tanto, cabría esperar que las estrategias planteadas podrían funcionar en cualquiera de estos cultivos, adaptando mínimamente las construcciones para introducir las secuencias propias de cada una de las especies.

Sin embargo, para poder utilizar estas estrategias en otras familias menos emparentadas, es necesario establecer si las funciones de *FUL* y/o los genes *AP2-like* en otras especies están conservadas.

Las leguminosas constituyen la tercera familia más numerosa de las angiospermas, con más de 700 géneros y 20.000 especies (Lewis, 2005). La mayoría son variedades silvestres o semi-domesticadas, pero con un gran potencial para el cultivo. Principalmente se emplean para la producción de alimentos y piensos, ya que son una importante fuente de proteína y en muchas regiones del mundo son cultivos básicos (Vaz Patto *et al.*, 2015). También son útiles como cultivo de cobertura o para la rotación de cultivos, ya que las leguminosas juegan un papel clave restaurando, manteniendo o enriqueciendo la fertilidad del suelo a través de la fijación simbiótica de nitrógeno. Por tanto su cultivo evita la necesidad de fertilizantes nitrogenados en los cultivos subsiguientes, reduce la transmisión de plagas y patógenos entre los cereales y por tanto la necesidad de plaguicidas, y aumenta la biodiversidad que soporta insectos polinizadores (Jeromela *et al.*, 2017).

En nuestro grupo existe una extensa tradición en el estudio de diferentes especies de leguminosas, por lo que disponíamos de los recursos necesarios para su cultivo, así como acceso a numerosas herramientas genéticas, entre ellas, la disponibilidad de mutantes en *Pisum sativum*. Por todo ello decidimos comenzar a estudiar la conservación funcional de *FUL* en leguminosas, concretamente en esta especie.

Dentro de los genes MADS-box, *FUL* pertenece al clado *APETALA1 (AP1)/FUL*. Diferentes duplicaciones durante la evolución de las eudicotiledóneas generaron los linajes *euAP1*, *euFUL* y *euAGL79*. Los genes *euFUL* son los que presentan mayor similitud de secuencia y patrón de expresión con los genes *FUL-like* de las angiospermas basales, probablemente sus homólogos funcionales, mientras que los genes *euAP1* y *euAGL79* presentan cambios significativos en la secuencia y el patrón de expresión, que probablemente favorecen su neofuncionalización (Ferrandiz and Fourquin, 2014). Dentro del linaje *euFUL*, se agrupan en el mismo clado que el gen *AtFUL* de *Arabidopsis* los genes *PsFULa* y *PsFULb* de *Pisum sativum* (Fig. 4-1).



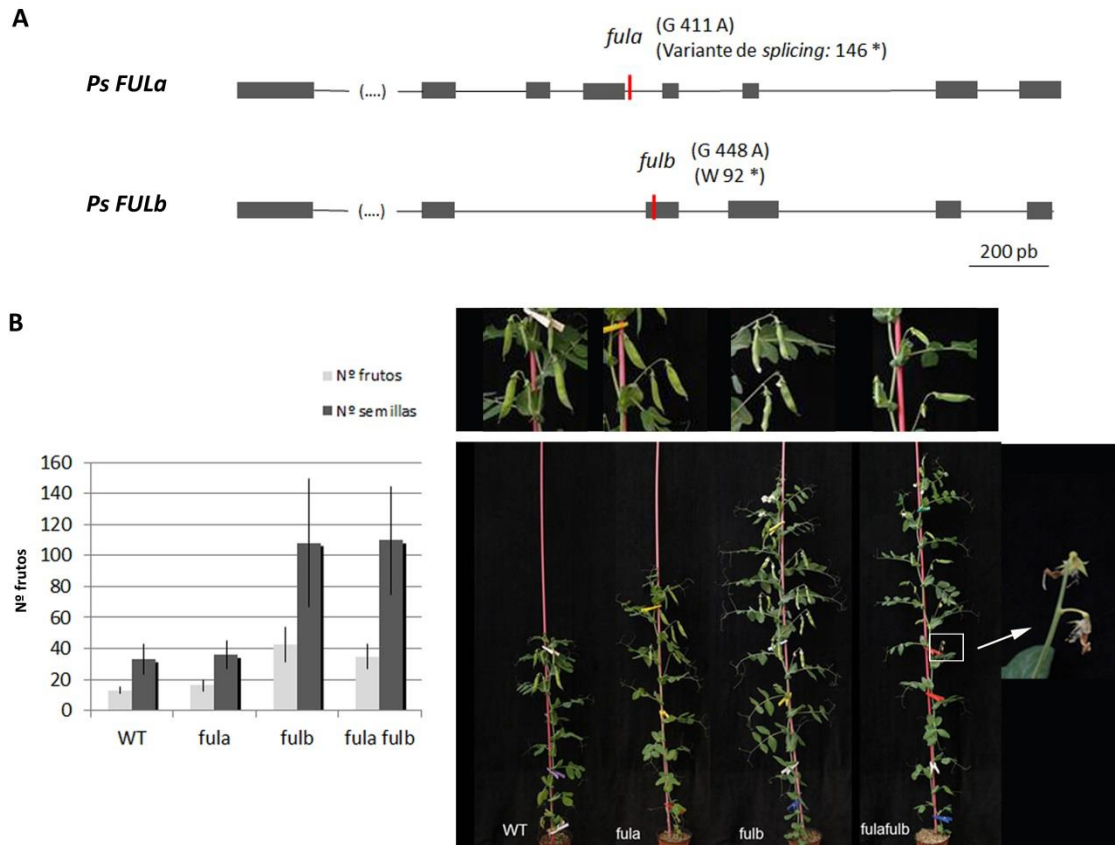
**Figura 4-1: Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de la familia AP1/FUL.** *AtFUL*, *PsFULa* y *PsFULb* se agrupan dentro del mismo clado del linaje *euFUL*. Nombre de las especies: Amtr, *Amborella thrichopoda*; At, *Arabidopsis thaliana*; Vv, *Vitis vinifera*; Md, *Malus domestica*; Ps, *Pisum sativum*; Mt, *Medicago truncatula*; Ph, *Petunia hybrida*; Am, *Antirrhinum majus*; Sl, *Solanum lycopersicum*; Mp, *Magnolia praecocissima*; Kc, *Crocus sativus*; Os, *Oryza sativa*; Ta, *Triticum aestivum*; Hv, *Hordeum vulgare*. Imagen modificada a partir de Berbel *et al.*, 2012 .

En trabajos previos realizados en nuestro grupo se habían identificado mutantes para los genes *PsFULa* y *PsFULb* en una colección mutagenizada con EMS mediante una estrategia de TILLING (Dalmais *et al.*, 2008). El mutante *fula* presentaba un cambio de nucleótido (G a A) a 411 pb del final del segundo exón ocasionando una variante de *splicing* que incorporaba a la secuencia de la proteína dos aminoácidos (I, C) y un codón de parada prematuro en la posición 146, generando una proteína truncada. En el mutante *fulb* se había producido un cambio de nucleótido (G a A) a 448 pb del final del segundo exón, apareciendo un codón de parada prematuro en la posición 92 y generando una proteína truncada. Ambas proteínas no eran funcionales, por lo que ambos mutantes probablemente puedan considerarse alelos nulos (Fig. 4-2 A). Al contrario que en *Arabidopsis*, los mutantes *fula* y *fulb* no causaban defectos en el desarrollo de los frutos, aunque las plantas frecuentemente presentaban abortos florales. Sin embargo, las mutaciones *fula* y *fulb* tenían un efecto positivo en la prolongación de la vida de la planta, que producía un mayor número de nudos reproductivos y de frutos (Fig. 4-2 B) (Chloé Fourquin, datos no publicados).

Estos resultados, aunque preliminares, eran muy prometedores ya que significaban que estos nuevos alelos de *FUL* se podrían emplear en programas de mejora para incrementar el rendimiento del cultivo de guisante, y posiblemente para extender esta estrategia a otras leguminosas.

Los mutantes obtenidos mediante la técnica de TILLING procedían de una población mutagenizada con EMS, en la que se había estimado que, de media, podía haber  $2,93 \times 10^4$  mutaciones inducidas por el mutágeno por individuo (Dalmais *et al.*, 2008). Aunque la mayoría se localizarían en regiones del genoma no codificantes, ocasionando mutaciones silenciosas, una pequeña proporción de ellas podría estar comprometiendo la función de algunos genes. Por esto, no podíamos descartar el posible efecto de otras mutaciones sobre el fenotipo observado en los mutantes *fula* y *fulb*.

Como primer objetivo de este capítulo nos propusimos realizar una serie de retrocruces entre los mutantes *fula* y *fulb* con el cultivar parental Caméor para eliminar otras mutaciones no ligadas, y posteriormente caracterizarlos fenotípicamente para comprobar si el retraso del GPA que se había observado previamente estaba causado por las mutaciones en los genes *fula* y *fulb* o si por el contrario era debido a otras mutaciones.



**Figura 4-2: Mutantes *fula* y *fulb* en *Pisum sativum* procedentes de una población de EMS seleccionada mediante TILLING.** A) Posición de las mutaciones en los genes *FULa* y *FULb*. Los rectángulos corresponden a los exones y las líneas a los intrones. Las marcas rojas marcan la posición de las mutaciones. Posición del cambio de nucleótido respecto al final del segundo exón. B) Efecto fenotípico de las mutaciones *fula* y *fulb* sobre el desarrollo de la planta (Chloé Fourquin, datos no publicados).

### Caracterización fenotípica de los mutantes *fula* y *fulb* en *Pisum sativum*

Para eliminar otras mutaciones realizamos una serie de retrocruces entre el doble mutante *fula fulb* con el cultivar Caméor, seleccionando en cada generación plantas *fula fulb* heterocigóticas, que se utilizaron a su vez en el siguiente cruce con Caméor. Los retrocruces y la selección de plantas se realizaron durante 6 generaciones como se muestra en la figura 4-3. En la generación 7 se seleccionaron plantas doble heterocigóticas y se recogieron las semillas resultantes de su autofecundación. Estas dieron lugar a una población segregante en la que se seleccionaron individuos *fula*, *fulb* y el doble mutante *fula fulb*. Puesto que tras cinco retrocruces la proporción del genoma del parental donante (mutantes *fula fulb* del TILLING) tan solo era del 1/64, se habrían eliminado la mayoría de las mutaciones accesorias, pudiendo haberse mantenido tan solo 1-2% de mutaciones.

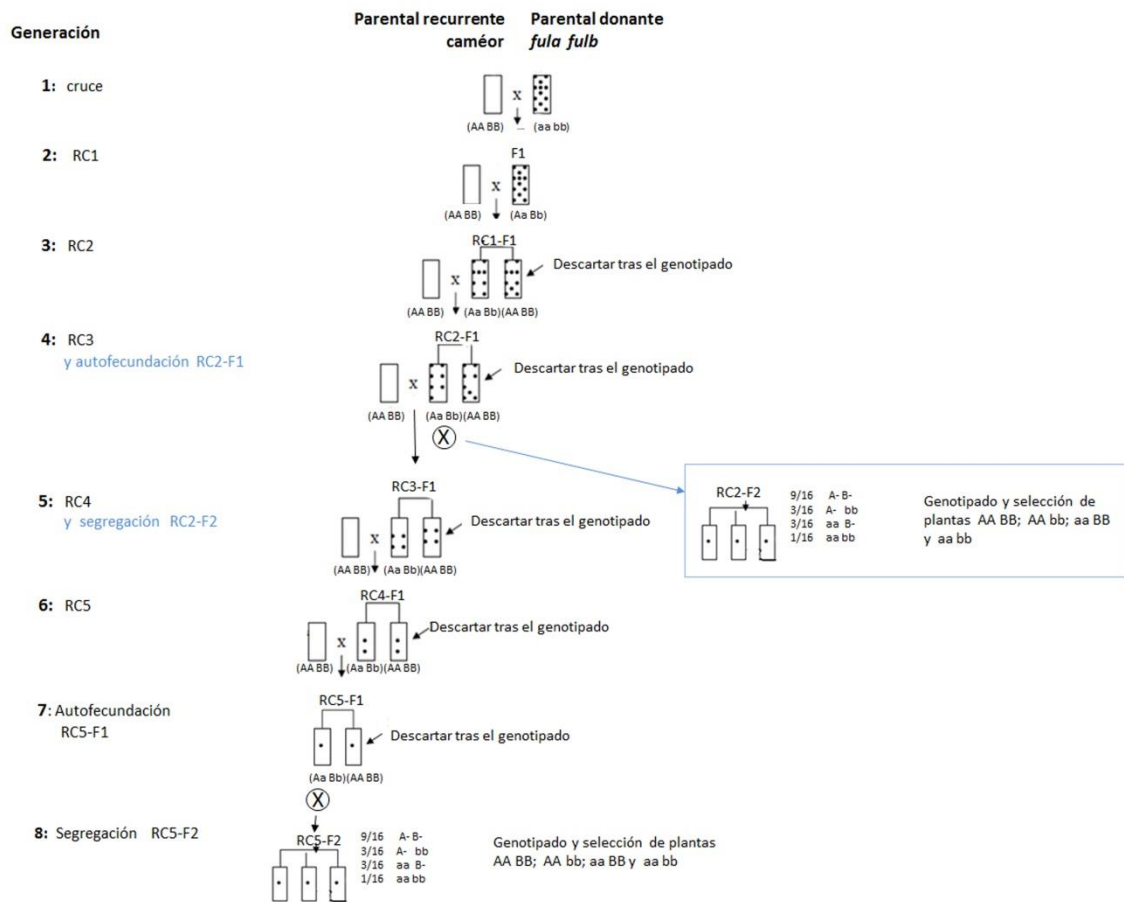


Figura 4-3: Esquema de retrocruces seguido para la eliminación de otras mutaciones presentes en las plantas *fula* y *fulb* procedentes de una población mutagenizada con EMS.

Debido a que en nuestras condiciones de crecimiento cada ciclo de crecimiento duraba cuatro meses y así completar la serie de retrocruces llevaría al menos 2 años y medio, decidimos realizar una caracterización previa de los mutantes a partir del RC2 (1/8 del genoma procedente de los mutantes originales), mientras continuábamos con el programa de retrocruces hasta el RC5.

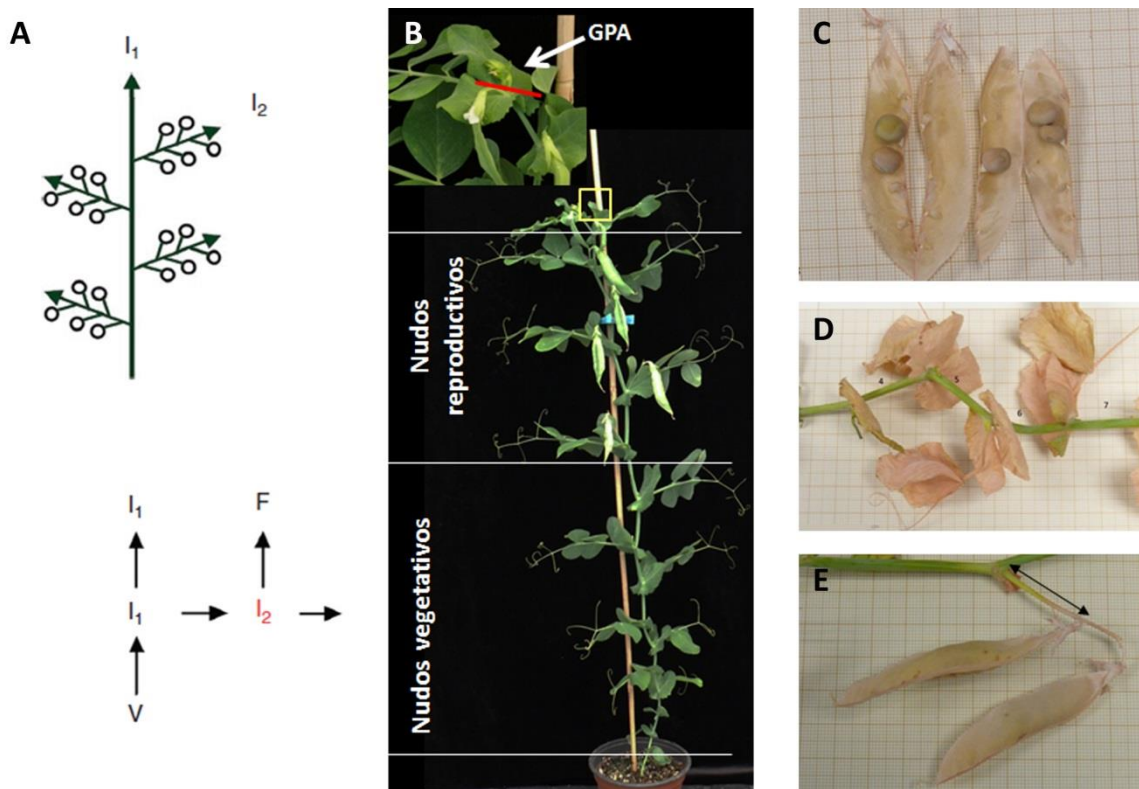
Por tanto, en la tercera generación, además de realizar el retrocruce 3, se recolectó la descendencia de las plantas *fula/+ fulb/+* autofecundadas del retrocruce 2 y en la siguiente generación identificamos mediante genotipado individuos *fula*, *fulb* y el doble mutante *fula fulb* (Fig. 4-3).

En total seleccionamos tres plantas silvestres, dos plantas *fula*, una planta *fulb* y tres plantas doble mutantes *fula fulb*, que caracterizamos fenotípicamente.

La inflorescencia de *Pisum sativum* es un racimo compuesto, típico de muchas leguminosas. Durante la fase vegetativa, el meristemo apical del tallo genera hojas compuestas con un meristemo axilar que generalmente permanece latente hasta que se produce la transición floral.

Tras la transición floral, el SAM se convierte en un meristemo inflorescente primario ( $I_1$ ), con crecimiento indeterminado, que produce en sus flancos meristemos inflorescentes secundarios ( $I_2$ ). Los  $I_2$  producen a su vez un número variable de meristemos florales, según la variedad, antes de terminar en un órgano residual filiforme.

Teniendo en cuenta el tipo de inflorescencia que presenta este cultivo, decidimos evaluar los siguientes caracteres: número de nudos vegetativos, como medida del tiempo en el que las plantas florecían; nudos reproductivos, como medida del tiempo que se mantenía activo el SAM; y otros caracteres descriptivos de la producción de la planta como el número total de frutos producidos por la planta, número total de semillas producidas por la planta, semillas por vaina y peso total de las semillas producidas por la planta, además de otros parámetros que nos permitirían evaluar la calidad de frutos y semillas y la arquitectura de la planta, como el tamaño de los frutos, peso de las semillas, composición de las semillas, longitud de entrenudos y longitud de los pedúnculos de las inflorescencias secundarias (Fig. 4-4).



**Figura 4-4:** La inflorescencia de *Pisum sativum* es un racimo compuesto. Tras la transición floral el meristemo inflorescente primario ( $I_1$ ) genera meristemos inflorescentes secundarios ( $I_2$ ), a partir de los cuales se desarrolla un número variable de meristemos florales antes de agotarse en un órgano residual (A). B-E) Algunos de los caracteres evaluados durante este trabajo. B) Número de nudos vegetativos, desde el nudo con la primera hoja compuesta hasta el nudo anterior a la floración. Número de nudos reproductivos, desde el primer nudo con flor hasta el nudo donde se produce el GPA. C) Número y longitud de las vainas. Número y tamaño de las semillas. D) Longitud de los entrenudos. E) Longitud de los pedúnculos de las  $I_2$ , desde el tallo principal hasta la inserción de la primera flor.



No observamos que la mutación en *FULa* ocasionara alteraciones en el GPA, ya que produjo un número de nudos reproductivos similar al silvestre, mientras que la mutación en *FULb* sí que tenía un claro efecto en el control de la parada de la actividad meristemática, aumentando la producción de nudos reproductivos al doble del silvestre. Por otro lado, el mutante *fula fulb* se comportó prácticamente como *fulb*, sugiriendo que *FULa* no tiene un papel clave en la regulación del GPA (Fig. 4-5 A, B, I) al menos en el fondo Caméor.

Los mutantes *fula* y *fulb*, así como el doble mutante, produjeron una única flor en cada nudo, mientras que las plantas silvestres, aunque por lo general presentaban una flor por nudo, en ocasiones tenían dos flores por inflorescencia secundaria (I2) (Fig. 4-5 A). También observamos que una pequeña proporción de los frutos abortaban en estadios tempranos del desarrollo, tanto en los mutantes como el silvestre.

Estudiando el número total de frutos producidos por la planta, la mutación en *FULb* aumentó la producción de frutos, ya que los mutante *fulb* y *fula fulb* produjeron 11 y 10 frutos respectivamente, en comparación al silvestre o el mutante *fula*, que produjeron 6 y 7 frutos (Fig. 4-5 A y C). Teniendo en cuenta los parámetros descritos hasta el momento, este incremento de la producción de frutos se debió al aumento de nudos reproductivos.

Estudiando el número de semillas llenas por vaina, así como el número de semillas abortadas por vaina no observamos diferencias significativas entre el silvestre y los mutantes. Sin embargo, debido nuevamente a la mayor producción de nudos reproductivos, la producción total de semillas en la planta se incrementó considerablemente en los genotipos que contenían la mutación en *FULb*, con 38 o 37,7 semillas por planta en los mutantes *fulb* y en el doble mutante *fula fulb* respectivamente, en comparación a las 18 semillas por planta de *fula* o 14,5 del silvestre (Fig. 4-5 A y D), lo que significó un incremento de semillas por planta del 132-162% en presencia del alelo *fulb*.

Para comprobar que los frutos y las semillas de los mutantes se desarrollaban de igual forma que en las plantas silvestres, evaluamos el tamaño de los frutos midiendo su longitud y el tamaño de las semillas midiendo el área de la proyección de su circunferencia máxima, así como la estimación del peso de 100 semillas (peso semillas por planta/total semillas por planta x 100). En el doble mutante *fula fulb* observamos que las vainas eran un 16% más cortas que las del silvestre (Fig. 4-5 F). En cuanto al tamaño de las semillas, en presencia del alelo *fulb* (mutante simple y doble mutante) las semillas mostraban un área de la proyección de su circunferencia máxima un 12% menor que en las semillas silvestres (Fig. 4-5 F). Aunque tanto el mutante *fulb* como el mutante *fula fulb* habían mostrado tener semillas de menor tamaño, al estimar el peso de 100 semillas, tan solo el doble mutante presentó una disminución significativa de peso, con una reducción del 22% del peso de 100 semillas respecto al silvestre (Fig. 4-5 A). Sin embargo, el gran incremento en la producción de semillas de estos genotipos, suplen las ligeras deficiencias que puedan tener en el tamaño de las vainas o de las semillas, obteniendo un rendimiento en peso de semilla por planta de 82 a 123% mayor con la mutación en *FULb* que en las plantas silvestres.

Para comprobar que la calidad de las semillas no se estaba viendo afectada a causa de las mutaciones en *FULa* y *FULb*, evaluamos la composición de las semillas en colaboración con la doctora Maria Carlota Vaz Patto, del Instituto de Tecnología Química e Biológica (Universidade

Nova de Lisboa, Portugal). Según los resultados obtenidos, no existen diferencias de composición de proteínas, grasas, fibra o residuo mineral entre los mutantes y el silvestre (Fig4-5 G)

Como hemos descrito en el capítulo anterior, *FUL* interviene en el control del tiempo de floración en *Arabidopsis*. Trabajos realizados en *Medicago truncatula* sugerían que esta función podría estar conservada en leguminosas, puesto que la sobreexpresión en *Arabidopsis* de los ortólogos de *FUL* de *Medicago*, *MtFULa* y *MtFULb*, adelantaban la floración (Jaudal *et al.*, 2015). Además, en *Pisum sativum* se está investigando la posible participación de los genes *PsFUL* en la ruta de respuesta al fotoperiodo, donde estaría actuando posiblemente bajo la regulación de *LATE BLOOMER1* (*LATE1*, un ortólogo del gen *GIGANTEA* de *Arabidopsis*, implicado en el reloj circadiano) y *LATE BLOOMER2* (*LATE2*) (Hecht *et al.*, 2007) y *PHYTOCHROME A* (*PHYA*) (Weller *et al.*, 2004) (Weller, comunicación personal). Para evaluar si en los mutantes *fula* y *fulb* de guisante se estaba alterando el tiempo de floración, también incluimos en la caracterización fenotípica el recuento de nudos vegetativos, y la medición de la longitud de entrenudos y de los pedúnculos de las inflorescencias secundarias, todos ellos caracteres relacionados con la respuesta al fotoperiodo (Weller *et al.*, 1997).

Mientras que el silvestre produjo 8,5 nudos vegetativos, el mutante *fulb* produjo 9 y los mutantes *fula* y el doble *fula fulb* 10 y 9,7 nudos respectivamente (Fig. 4-5 A y B). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, aunque podría deberse a causa del bajo número de plantas estudiadas.

En cuanto a la elongación de los entrenudos, observamos que en todas las plantas, tanto silvestres como mutantes, la longitud aumentaba de un entrenudo al siguiente, hasta que la planta comenzó a producir flores (entrenudo 10-11). Aproximadamente tras haber producido dos 12, los siguientes entrenudos que se formaron tuvieron menor longitud a medida que se acercaba el nudo de parada del SAM. En los cuatro genotipos, el aumento de longitud fue similar hasta el entrenudo 6. Sin embargo, *fulb* a partir de ese punto, y *fula* y el doble mutante a partir del entrenudo siguiente, presentaron un mayor aumento en la longitud de los entrenudos que las plantas silvestres. A partir del entrenudo 10-11 la disminución de la longitud de los entrenudos consecutivos fue menos acusada en los mutantes que en el silvestre, posiblemente a causa del aumento del número de entrenudos, puesto que en todas las plantas el último entrenudo mostró una longitud similar, independientemente del genotipo (Fig. 4-5 G).

La longitud que alcanzan los pedúnculos de las inflorescencias secundarias se redujo paulatinamente desde el primer nudo reproductivo hasta el nudo de parada del SAM, tanto en el silvestre como en los mutantes, pero en presencia de la mutación en *FULb*, la longitud de todos los pedúnculos fue mayor que en el silvestre y que en el mutante *fula* y la disminución de la longitud del pedúnculo de un nudo al siguiente fue más gradual (Fig. 4-4H). Estos resultados sugerían que los genes *FUL* podrían estar respondiendo a la ruta del fotoperiodo.

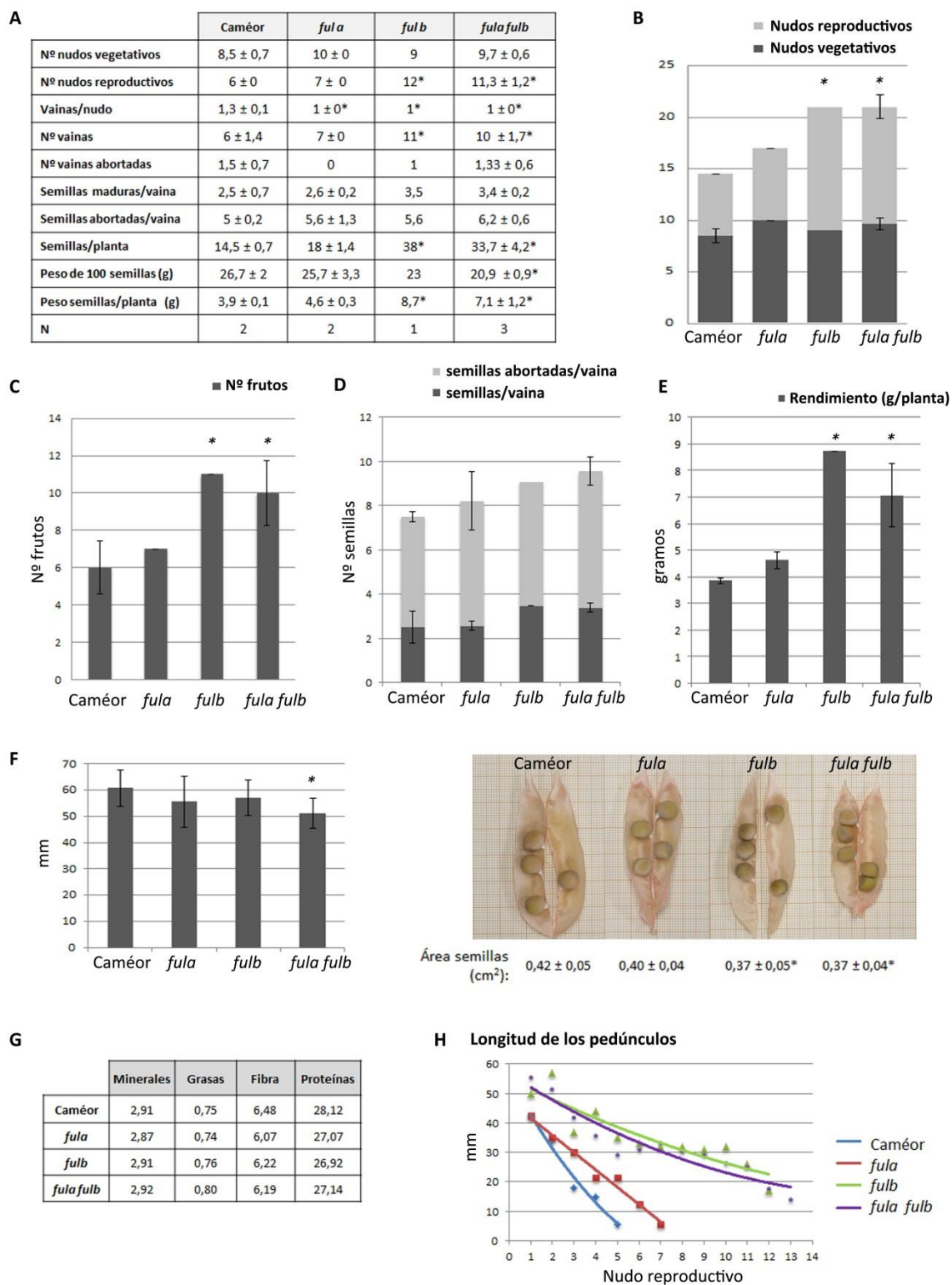
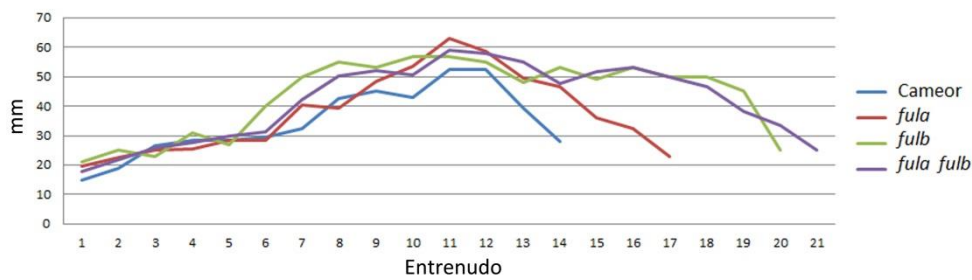


Figura 4-5: Caracterización fenotípica de los mutantes *fula*, *fulb* y *fula fulb* procedentes del RC2-F2. (Continúa en la página siguiente).

**I Longitud de los entrenudos**



**Figura 4-5: Caracterización fenotípica de los mutantes *fula*, *fulb* y *fula fulb* procedentes del RC2-F2.** A) Tabla resumen de los parámetros evaluados. Se muestra la media  $\pm$  SD de dos plantas silvestres, 2 plantas *fula*, 1 planta *fulb* y 3 plantas *fula fulb*. B) Número de nudos vegetativos y nudos reproductivos. C) Número total de vainas producidas en el tallo principal. D) Semillas maduras y semillas abortadas por vaina, la barra completa indica el número de óvulos formados/vaina. E) Peso total de las semillas producidas por la planta (rendimiento en peso de semilla). F) A la izquierda Longitud de las vainas. A la derecha vainas abiertas de la planta silvestre y de los diferentes mutantes. Se puede observar la diferencia en la longitud de las vainas y del tamaño de las semillas. Bajo la imagen se indica el área media de la proyección de la circunferencia máxima de al menos 10 semillas de cada planta  $\pm$  SD. G) Composición de las semillas. H) Longitud de los pedúnculos. Se muestra las líneas de tendencia polinómicas que se ajustan a los valores obtenidos. I) Longitud de los entrenudos. J) Comparación del aspecto fenotípico de los genotipos evaluados. Barra de escala: 20 cm. B-F) Se muestra la media de dos plantas silvestres, 2 plantas *fula*, 1 planta *fulb* y 3 plantas *fula fulb*. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

Todos los resultados que obtuvimos de la caracterización fenotípica de los mutantes *fula* y *fulb* apuntaban a que el gen *FULb* estaría implicado en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática en el SAM, mientras que *FULa* no participaría en ese proceso. Por otro lado, aunque no habíamos observado un claro efecto sobre el tiempo de floración, los resultados de la medición de la longitud de entrenudos sugerían que ambos podrían estar interviniendo en la respuesta al fotoperiodo, aunque ninguno de los mutantes aumentó significativamente el número de nudos vegetativos. Además, *FULa* y *FULb* actuarían redundantemente en la regulación del desarrollo del fruto, apareciendo vainas más cortas únicamente en el doble mutante. Sin embargo para poder sacar conclusiones sería necesario contar con un mayor tamaño muestral al disponible en este ensayo.

Por ello, tras la multiplicación de las semillas de este mismo RC2 por autofecundación, realizamos dos nuevos ensayos, con diez plantas de cada genotipo en cada uno de los ensayos.

El segundo ensayo se llevó a cabo en la misma cabina de cultivo donde se había realizado la caracterización fenotípica anterior, que contaba con fotoperiodo largo (16h luz/8h oscuridad) y una temperatura máxima de 21,5°C y mínima de 15°C. Sin embargo, debido a diferentes problemas con el riego y plagas, hubo gran número de frutos abortados en todas las plantas, tanto mutantes como silvestres (Fig. 4-6 G). Por esta razón consideramos necesario realizar la caracterización fenotípica una vez tercera vez. El tercer ensayo, por motivos ajenos a este trabajo, hubo que realizarlo en otra cabina de cultivo que contaba con fotoperiodo largo (16h luz/8h oscuridad) y temperatura máxima de 23,5°C y mínima de 15°C.

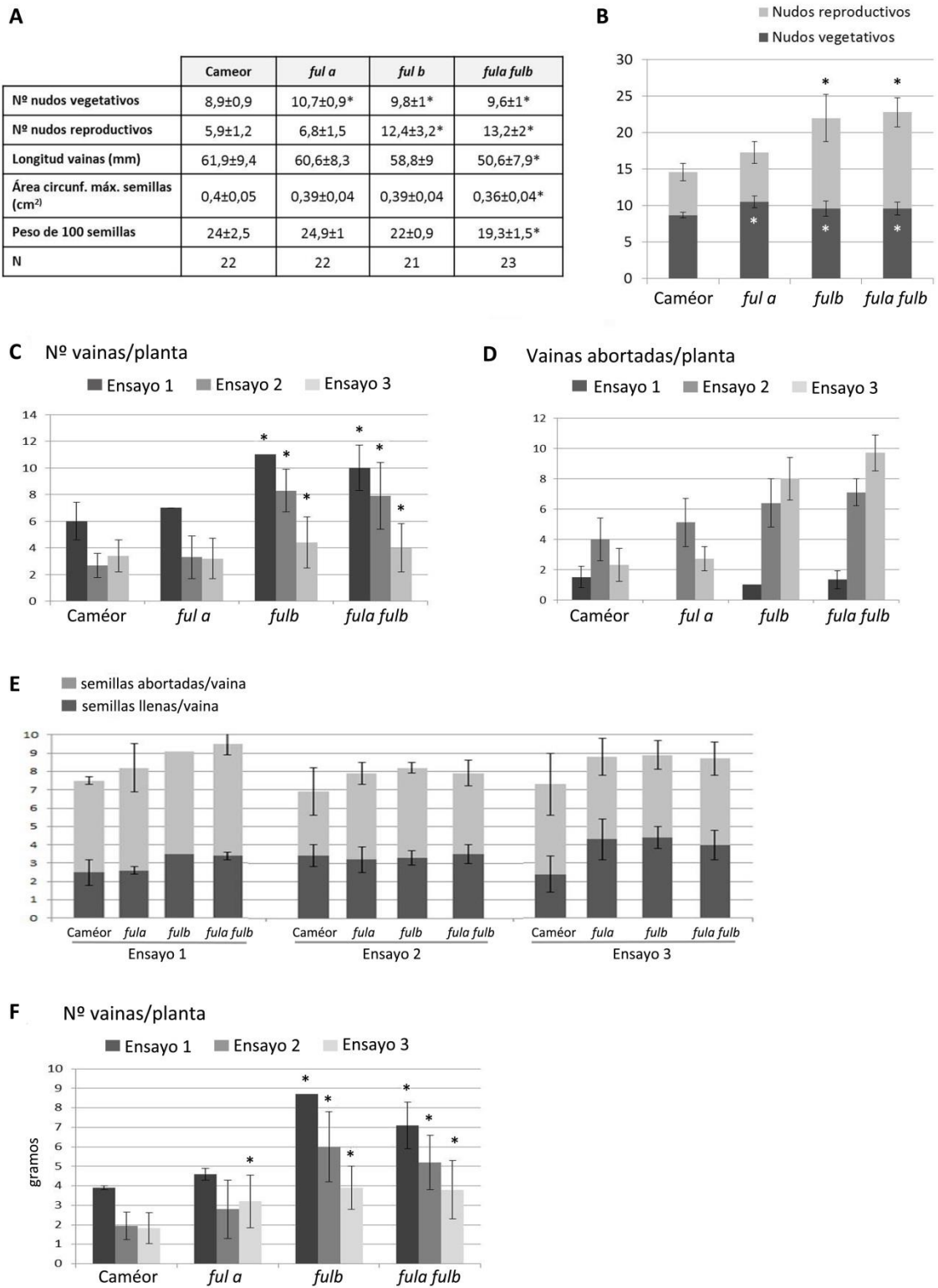
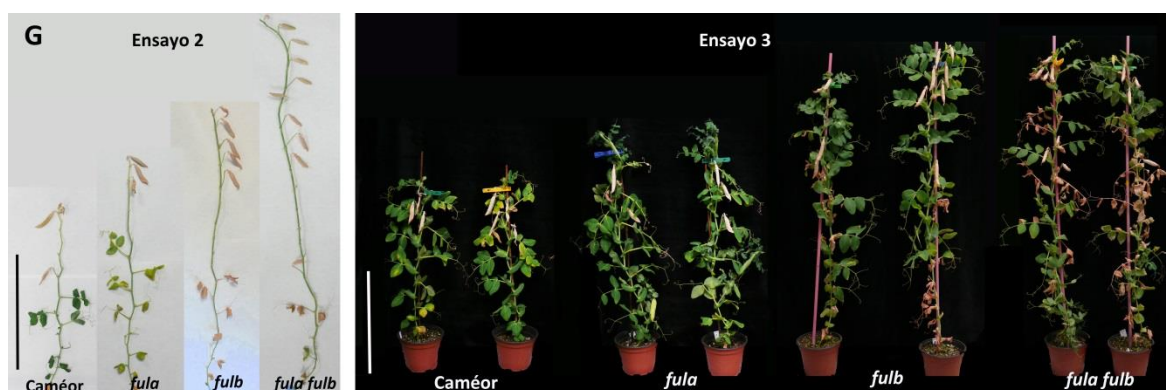


Figura 4-6: Resumen de la caracterización fenotípica de los mutantes *fula*, *fulb* y *fula fulb* procedentes del RC2 en tres ensayos independientes. (Continúa en la página siguiente).



**Figura 4-6: Resumen de la caracterización fenotípica de los mutantes *fula*, *fulb* y *fula fulb* procedentes del RC2 en tres ensayos independientes.** A) Caracteres que mostraron el mismo comportamiento en los tres ensayos. Se muestra la media de los tres ensayos  $\pm$  SD,  $n=21-23$ . B) Número medio de nudos vegetativos y nudos reproductivos de los tres ensayos. Los mutantes mostraron diferencias significativas respecto al silvestre en cuanto a nudos vegetativos. Para los nudos reproductivos tan solo el mutante *fulb* y *fula fulb* mostraron diferencias con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student. C-F) La tendencia de producción de vainas y semillas entre el silvestre y el mutante se mantuvo a lo largo de los ensayos, aunque debido a diferentes factores externos los valores variaron de un ensayo a otro. Por tanto, para los caracteres que dependen de dichos valores, se muestran de forma independiente los resultados obtenidos en cada ensayo. Las barras de error indican la desviación estándar de cada media. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student. C) Número total de vainas producidas en el tallo principal. D) Número de vainas abortadas en el tallo principal. E) Semillas maduras y semillas abortadas por vaina, la barra completa indica el número de óvulos formados/vaina. F) Peso total de las semillas producidas por la planta (rendimiento en peso de semilla). G) Comparación del aspecto fenotípico de los genotipos evaluados durante el segundo y tercer ensayo. En la imagen de la izquierda se han eliminado las hojas de los nudos reproductivos para poder apreciar los nudos con frutos abortados.

Tras analizar los resultados obtenidos en los tres ensayos, observamos que algunos caracteres se mantuvieron estables a pesar de los cambios en las condiciones de crecimiento, como el número de nudos vegetativos y reproductivos, la longitud de las vainas y el tamaño y peso de las semillas (estimado a través el área de la proyección de su circunferencia máxima y del peso de 100 semillas). Sin embargo, otros variaron considerablemente de un ensayo a otro, como el número de vainas producidas por planta, el número de semillas maduras o abortadas por vaina, el número de semillas producidas por planta y el peso de éstas. La variación en los resultados de estos caracteres se debió exclusivamente a la variación en el número de frutos abortados y semillas abortadas, ocasionado por problemas con el riego, las plagas y el aumento de la temperatura de crecimiento. No obstante, la tendencia de producción de frutos y semillas observada en el primer ensayo se mantuvo en las caracterizaciones posteriores, siendo los mutantes *fulb* y *fula fulb* los más productivos.

Para los caracteres que no variaron considerablemente entre ensayos, tratamos conjuntamente todos los datos para contar con un mayor tamaño muestral (Fig. 4-6 A), mientras que aquellos relacionados con el aborto de frutos y semillas, los tratamos de forma independiente para cada ensayo.

Observamos que tan solo los mutantes *fulb* y *fula fulb* incrementaron el número de nudos reproductivos, aunque todos los mutantes produjeron uno o dos nudos vegetativos más que el silvestre (Fig. 4-6 A y B). Además, la longitud de los entrenudos, así como la longitud de los

pedúnculos de las I2, mantuvieron la tendencia observada en el primer ensayo. Estos resultados apoyaban la idea previa de que el gen *FULb* sería el único implicado en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática en el SAM, mientras que ambos genes, *FULa* y *FULb*, podrían tener un papel en la regulación del tiempo de floración o la respuesta al fotoperiodo.

En cuanto al desarrollo de las vainas y las semillas, *FULa* y *FULb* podrían estar actuando redundantemente, y tan solo al mutar ambos genes observamos vainas más cortas y semillas maduras más pequeñas (Fig. 4-6 A). Sin embargo, estos pequeños defectos mostrados por el doble mutante no repercutieron en el rendimiento en semillas de la planta, gracias a que en presencia de la mutación en *FULa* y/o *FULb* se formaron más óvulos (Fig. 4-6 E) y, aunque cierta proporción de semillas abortó, dependiendo de las condiciones de crecimiento, la cantidad de semillas maduras final resultó mayor en los mutantes que en el silvestre (Fig. 4-6 A).

Por otro lado, aunque pudiera parecer que el mutante *fulb* fue más sensible a las condiciones de crecimiento, presentando más frutos abortados (Fig. 4-6 D), es un efecto indirecto de la mayor producción de nudos reproductivos, puesto que si se normaliza el número de vainas abortadas por el número de nudos reproductivos generados, la proporción resultante no varía mucho entre los diferentes genotipos.

### **Efecto del estrés hídrico sobre la producción de los mutantes *fula* y *fulb*.**

Durante la caracterización fenotípica, además de estudiar parámetros de producción y efectos sobre el tiempo de floración o el desarrollo de los frutos y las semillas, también observamos a grandes rasgos el desarrollo radicular. Tras limpiar las raíces de los cuatro genotipos estudiados de restos de vermiculita en la que se crecieron las plantas, observamos que en presencia de la mutación *fulb* el desarrollo de la raíz fue mayor (Fig. 4-7). No llegamos a identificar si el aumento en la masa de raíces se debía a un mayor crecimiento de la raíz principal o a un mayor desarrollo de las raíces secundarias, aunque en estudios similares realizados en nuestro grupo en *Arabidopsis thaliana*, se observó que en el mutante *ful* las raíces secundarias crecían más que en el silvestre (Vicente Balanzà, comunicación personal).

Para estudiar si este fenotipo podría representar una ventaja en condiciones de crecimiento de estrés hídrico, característica que suele estar presente cuando se cultiva en campo, nos planteamos caracterizar el desarrollo de los mutantes *fula*, *fulb* y *fula fulb* crecidos en dichas condiciones.



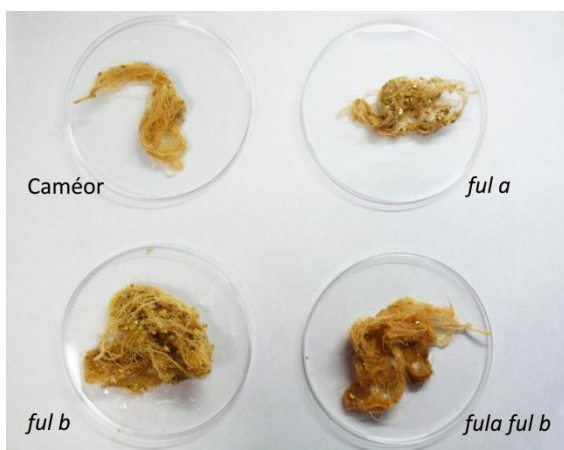


Figura 4-7: Comparación del desarrollo radicular de plantas silvestres y mutantes *fula* y *fulb*. En presencia de la mutación en el gen *FULb* hay mayor desarrollo de la raíz.

Inicialmente realizamos una prueba con plantas silvestres, privándolas intermitentemente de riego con solución nutritiva durante la fase vegetativa de la planta. En total se ensayaron cinco tratamientos de estrés hídrico. Los tratamientos consistieron en realizar ciclos de uno a cinco días sin riego, dependiendo del tratamiento, seguido de un día con riego, es decir, que las plantas se regaron cada 2-6 días según el tratamiento. Los tratamientos se aplicaron durante tres semanas, desde que la hoja del segundo nudo se había desplegado hasta la aparición de las primeras flores en antesis. Tras completar los tratamientos se recogió toda la parte aérea de las plantas y se pesó, para cuantificar en qué medida la privación del riego había afectado a la biomasa. Según los resultados que obtuvimos, la biomasa de las plantas fue disminuyendo un 10% con cada día que las plantas eran privadas de riego, produciendo un 90%, 81%, 71%, 66% y 50% de biomasa tras haber regado cada dos a seis días durante tres semanas respectivamente, en comparación con plantas que se regaron todos los días (Fig. 4-8).

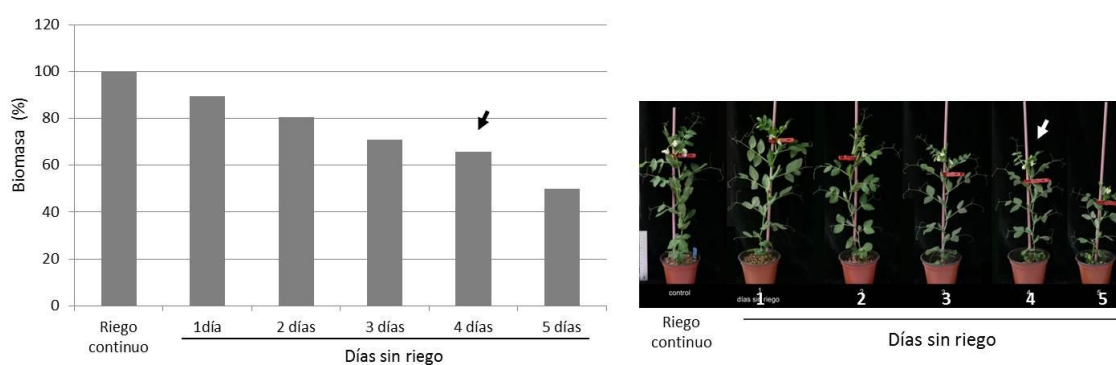


Figura 4-8: Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de plantas silvestres de *P. sativum* cv. *Caméor*. La biomasa de la planta disminuyó un 10% cada día de privación de riego. Para realizar el ensayo con los mutantes *fula* y *fulb* seleccionamos el tratamiento de estrés hídrico que conseguía reducir más de un 30% la biomasa de la planta, marcado por las flechas. La gráfica muestra la variación porcentual de biomasa, estimada a partir del peso fresco de la parte aérea de la planta. En la imagen se observa cómo el crecimiento de la planta se ve afectado por la ausencia de agua.

Para realizar el estudio del estrés hídrico sobre los mutantes *fula* y *fulb* elegimos el tratamiento que había conseguido reducir más del 30% la biomasa de las plantas (regar cada cinco días). Sembramos 30 plantas del genotipo silvestre y del doble mutante *fula fulb* y 20 plantas de los mutantes simples. Cuando las plantas florecieron comenzamos a aplicar el tratamiento de estrés hídrico a la mitad de las plantas, cortando el riego con solución nutritiva durante cuatro días y regando al quinto día, mientras que la otra mitad de las plantas mantuvo el riego habitual. El tratamiento de estrés hídrico se prolongó hasta que todas las plantas habían detenido su crecimiento (las plantas silvestres y las mutantes *fula* detuvieron su actividad meristemática aproximadamente una semana antes de parar el tratamiento de sequía).

El crecimiento de la planta se vio severamente afectado por la restricción hídrica impuesta. Tan solo el doble mutante continuó produciendo más nudos reproductivos, aunque las diferencias con el resto de genotipos fueron muy bajas (Fig. 4-9 A y B). A diferencia de lo que ocurre cuando las plantas se regaron normalmente, no hubo diferencias de producción de frutos por planta entre los cuatro genotipos regados cada cinco días, presentando estas plantas la misma producción que las plantas silvestres con riego continuo (Fig. 4-9 A y C). Por otro lado, en este experimento, la mayor producción de semillas maduras por vaina la encontramos en el mutante *fula* crecido bajo estrés hídrico (Fig. 4-9 A y D).

No observamos diferencias de rendimiento en peso de semillas de los genotipos mutantes frente al silvestre crecidos con menor aporte hídrico, y comparando con las plantas regadas, el rendimiento se redujo considerablemente en los mutantes, aunque las plantas silvestres apenas se vieron afectadas.

Una vez que se detuvo el crecimiento, pesamos la parte aérea de las plantas y calculamos el porcentaje de biomasa respecto a las plantas silvestres. En las plantas que se regaron cada cinco días, los mutantes *fulb* y *fula fulb* presentaban una fuerte disminución de biomasa, a pesar de que poseían uno o dos nudos más (Fig. 4-9 G). Esto se correlacionaba con que en estos genotipos los órganos vegetativos senescían antes que en las plantas silvestres o los mutantes *fula* (Fig. 4-9 F). Estos resultados sugerían que el alelo mutante *fulb* se adapta peor al estrés hídrico.

También observamos que bajo el estrés hídrico aplicado las vainas del mutante *fula fulb* fueron parcialmente dehiscentes, abriéndose algunas de las vainas en la planta (en algunas ocasiones todavía verdes). Esto no ocurrió en las plantas silvestres ni en los mutantes simples, así como tampoco en ninguno de los genotipos crecidos en condiciones de riego constante (Fig. 4-9 H e I).

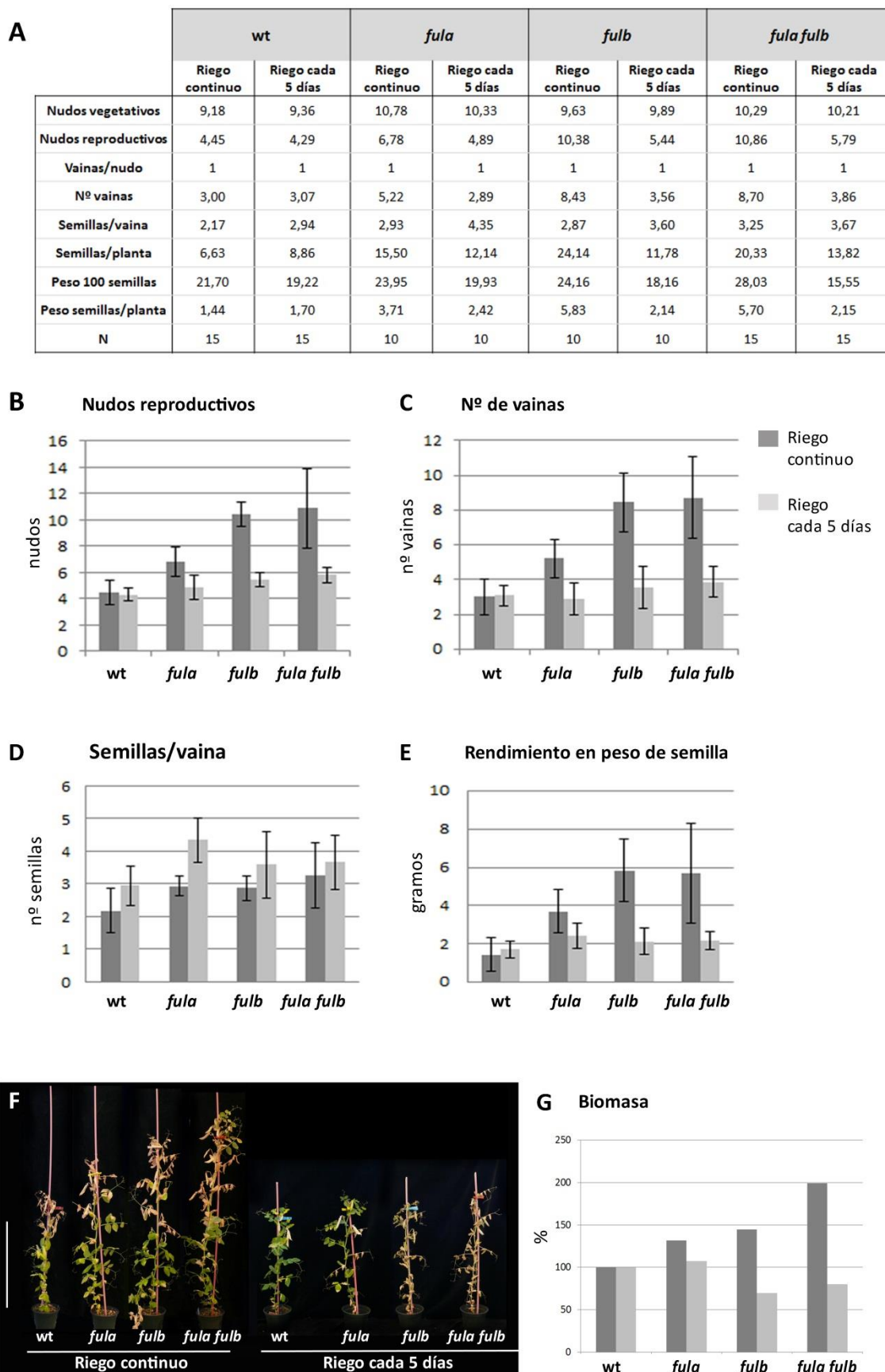
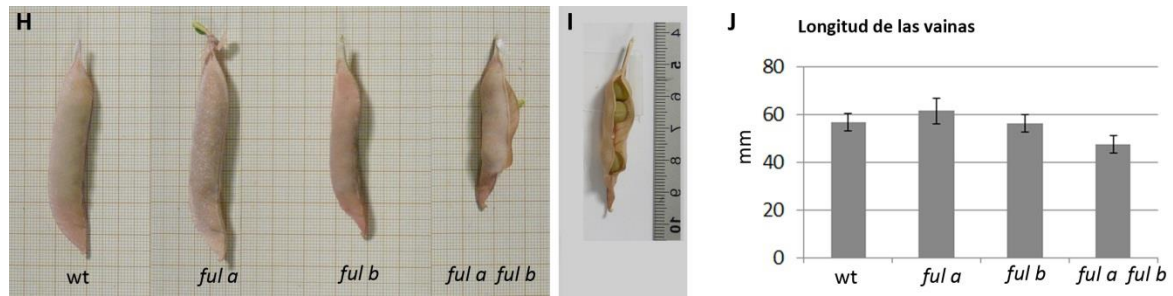


Figura 4-9: Caracterización fenotípica del efecto de ausencia de riego durante cinco días sobre el desarrollo y producción de los mutantes *fula* y *fulb*. (Continúa en la página siguiente).



**Figura 4-9: Caracterización fenotípica del efecto de ausencia de riego durante cinco días sobre el desarrollo y producción de los mutantes *fula* y *fulb*.** A) Tabla resumen de los parámetros evaluados. Se muestra la media  $\pm$  SD de 15 plantas silvestres, 10 plantas *fula*, 10 plantas *fulb* y 15 plantas *fula fulb*. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre Caméor, con  $p < 0,05$ . Prueba T-Student. B) Número de nudos reproductivos (desde el primer nudo con flor hasta el nudo de parada). C) Número total de vainas producidas en el tallo principal. D) Semillas maduras por vaina. E) Peso total de las semillas producidas por la planta (rendimiento en peso de semilla). F) Comparación del desarrollo de plantas de los cuatro genotipos regadas constantemente y plantas regadas cada cinco días. Barra de escala: 40 cm. G) Porcentaje de biomasa de los mutantes respecto a plantas silvestres con riego continuo o regadas cada cinco días. H) Vainas de plantas silvestres y mutantes simples y doble regados cada cinco días. I) Ampliación del fruto del doble mutante *fula fulb* regado cada cinco días. En estas condiciones de crecimiento las vainas son dehiscentes. J) Longitud de las vainas desarrolladas bajo estrés hídrico. Se muestra la media  $\pm$  SD de 15 plantas silvestres, 10 plantas *fula*, 10 plantas *fulb* y 15 plantas *fula fulb*.

## Ensayos de campo con los mutantes *fula* y *fulb*

El alelo mutante *fulb* en condiciones de crecimiento óptimas en invernadero había mostrado un considerable retraso del GPA, incrementando la producción de nudos reproductivos y frutos, sin afectar al desarrollo de los mismos. Los ensayos que realizamos en condiciones de restricción hídrica habían revelado que cuando se unían ambas mutaciones aparecían efectos en la dehiscencia del fruto, causando la apertura de las vainas, carácter no deseable para este cultivo y su posterior cosecha. Sin embargo, este carácter no lo observamos en el mutante simple *fulb*, que es el que realmente ejerce un claro efecto en la regulación de la actividad meristemática.

No obstante, para comprobar si estos alelos podrían ser de utilidad para incrementar la producción de los cultivos necesitábamos saber cuál sería su comportamiento en campo. Para ello, establecimos una colaboración con el grupo de Tom Warkentin y Shaoming Huang, de la Universidad de Saskatchewan (Canadá).

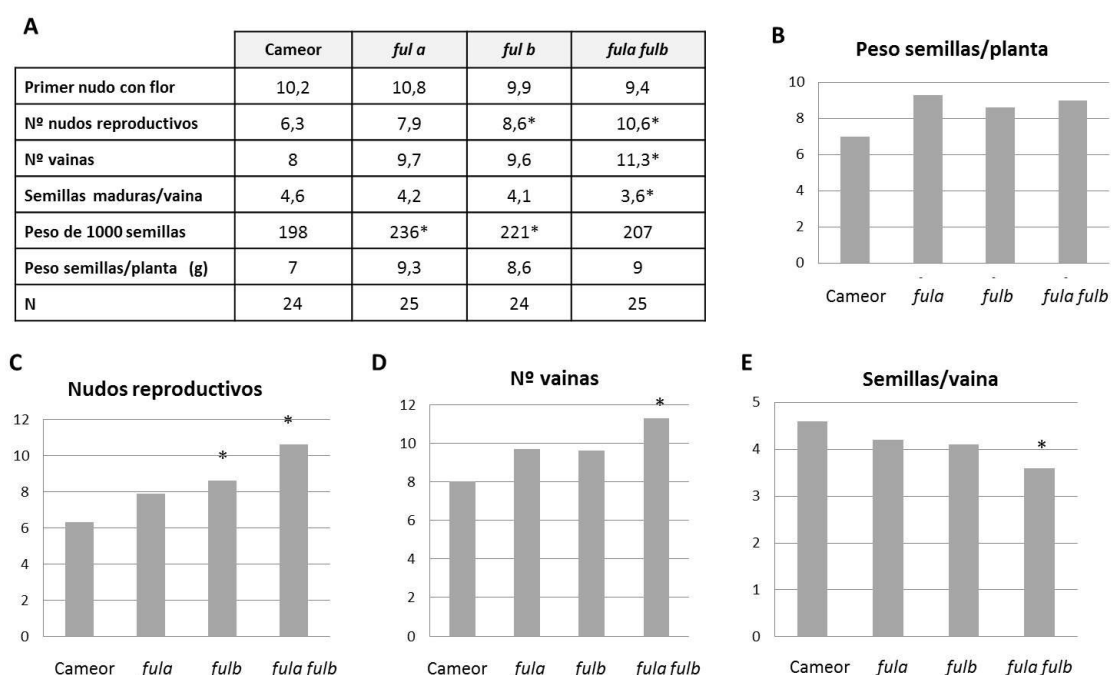
Setenta y cinco semillas de cada genotipo procedentes del RC2 fueron sembradas en campo, en Saskatchewan, en mayo de 2016. Cada línea se sembró en línea dejando 30 cm entre ellas. Finalmente, el número de plantas que germinaron fue de 33 silvestres, 44 *fula*, 37 *fulb* y 47 *fula fulb*.

Paralelamente a los ensayos de campo, también se realizó la caracterización en sus condiciones de crecimiento en invernadero, sembrando 25 semillas de cada genotipo.

Tanto en los ensayos de campo como en invernadero se tomaron datos de seis caracteres: primer nudo con flor, número de nudos reproductivos, número de vainas, número de semillas por vaina, peso de mil semillas y rendimiento de la planta (peso semillas por planta).

Los cuatro genotipos estudiados florecieron, tanto en invernadero como en campo, antes que los cultivares del oeste de Canadá, debido a que el fondo genético Caméor carece de un alelo funcional de *LATE FLOWERING (LF)*.

Los resultados de la caracterización fenotípica en invernadero mostraron que el doble mutante *fula fulb* tuvo un ciclo de vida más largo que las otras tres líneas, ya que requirió más días para la emergencia, floración y madurez de los frutos; también tuvo un periodo de floración más largo y produjo un mayor número de nudos reproductivos y vainas que el resto de líneas. Sin embargo, esta mayor producción se vio contrarrestada por tener menos semillas por vaina, por lo que finalmente, en sus condiciones de crecimiento en invernadero, el doble mutante no llegó a tener un mayor rendimiento en peso de semillas por planta que las otras líneas (Fig. 4-10).



**Figura 4-10: Caracterización fenotípica de los mutantes *fula* y *fulb* crecidos en invernadero en Saskatchewan.**

A) Resumen de los parámetros evaluados. Se muestra la media de 24-25 plantas. B) Peso total de las semillas producidas por la planta (rendimiento en peso de semilla). C) Número de nudos reproductivos en el tallo principal. D) Número total de vainas producidas en el tallo principal. E) Semillas maduras por vaina. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

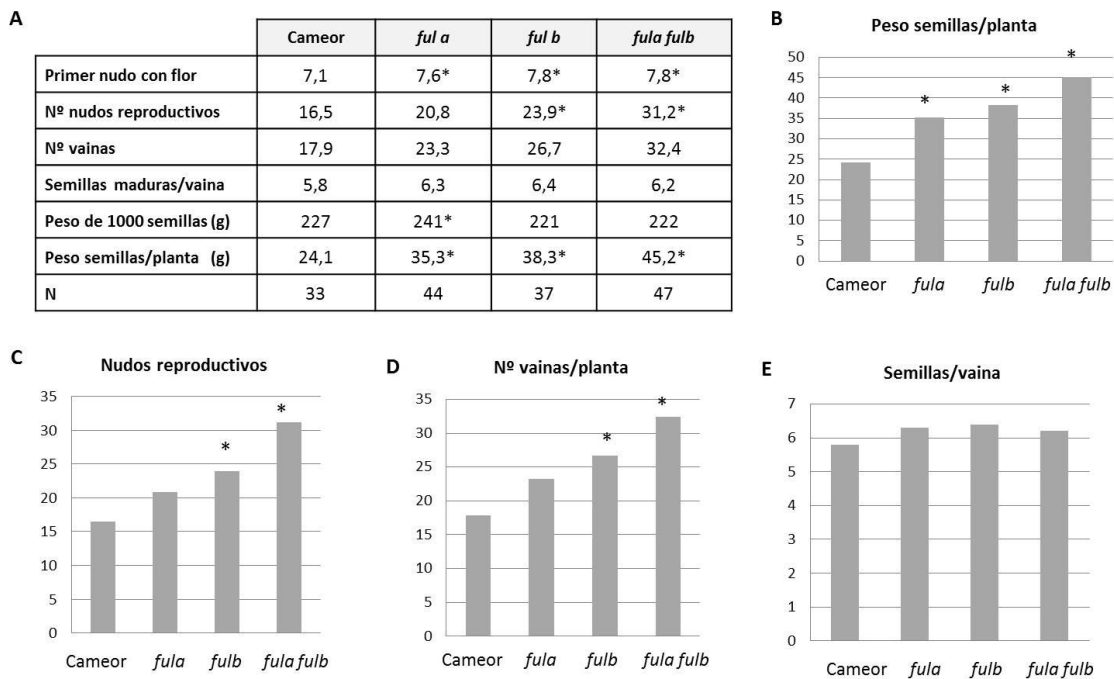
Cuando las plantas crecieron en campo mostraron algunas diferencias en el desarrollo de la planta frente al crecimiento en invernadero. En campo, las plantas desarrollaron más ramas basales y el periodo de floración y el ciclo de vida fue más largo. Mientras que los valores promedio de nudos reproductivos y número de vainas en el tallo principal fueron similares entre las condiciones de invernadero y de campo, la mayoría de las plantas en el campo desarrollaron más de una rama basal, por lo que el rendimiento promedio de una sola planta en el campo fue casi tres veces mayor que el rendimiento de la planta en invernadero.

Teniendo en cuenta el nudo donde aparece la primera flor, todos los mutantes florecieron algo más tarde que el silvestre (Fig. 4-11 A).

## CAPÍTULO 4

Los mutantes *fulb* y el doble mutante *fula fulb* mostraron mayor producción de nudos reproductivos y de número de vainas en el tallo principal que las plantas silvestres (Fig. 4-11 A, C y D). El número de semillas por vaina no varió entre los diferentes genotipos (Fig. 4-11 E), aunque el peso de mil semillas resultó ser mayor en *fula* (Fig. 4-11 A). Por ello, y por la producción de semillas en el resto de ramas de la planta, el rendimiento de la planta, medido como peso de semillas por planta, fue superior en todos los mutantes, siendo el doble mutante el genotipo más productivo, seguido por *fulb* y por *fula* (Fig. 4-11 B).

Los resultados obtenidos en los ensayos en campo sugieren que los alelos *fula* y *fulb* podrían ser un recurso genético útil para mejorar la productividad del cultivo de guisante y posiblemente también el de otras leguminosas.



**Figura 4-11: Caracterización fenotípica de los mutantes *fula* y *fulb* crecidos en campo.** A) Resumen de los parámetros evaluados. Se muestra la media de 33-47 plantas. B) Peso total de las semillas producidas por toda la planta (tallo principal más ramas laterales). C) Número de nudos reproductivos en el tallo principal. D) Número total de vainas producidas en el tallo principal. E) Semillas maduras por vaina. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre, con  $p \leq 0,05$ . Prueba T-Student.

## Introgresión de los alelos *fula* y *fulb* en variedades de élite

Como confirmación de que *fula* y *fulb* podría ser útil para mejorar la productividad del cultivo de guisante nos propusimos introgresarlo en variedades de élite cultivadas tanto en Europa como en Canadá.

La introducción de la mutación en los genes *FULA* y *FULB* en un fondo genético de élite nos permitiría estudiar si en variedades seleccionadas por su alta productividad se puede continuar mejorando su rendimiento.

Para esto, en colaboración con Tom Warkentin, de la Universidad de Saskatchewan (Canadá) y Gérard Duc, INRA (Francia), seleccionamos dos cultivares canadienses, CDC Amarillo y CDC Meadow y dos cultivares europeos, Kayanne y Kasard. Estos cultivares presentan un alto rendimiento y resistencia al encamado por presentar carácter áfilo o semiáfilo (los foliolos se transforman en zarcillos).

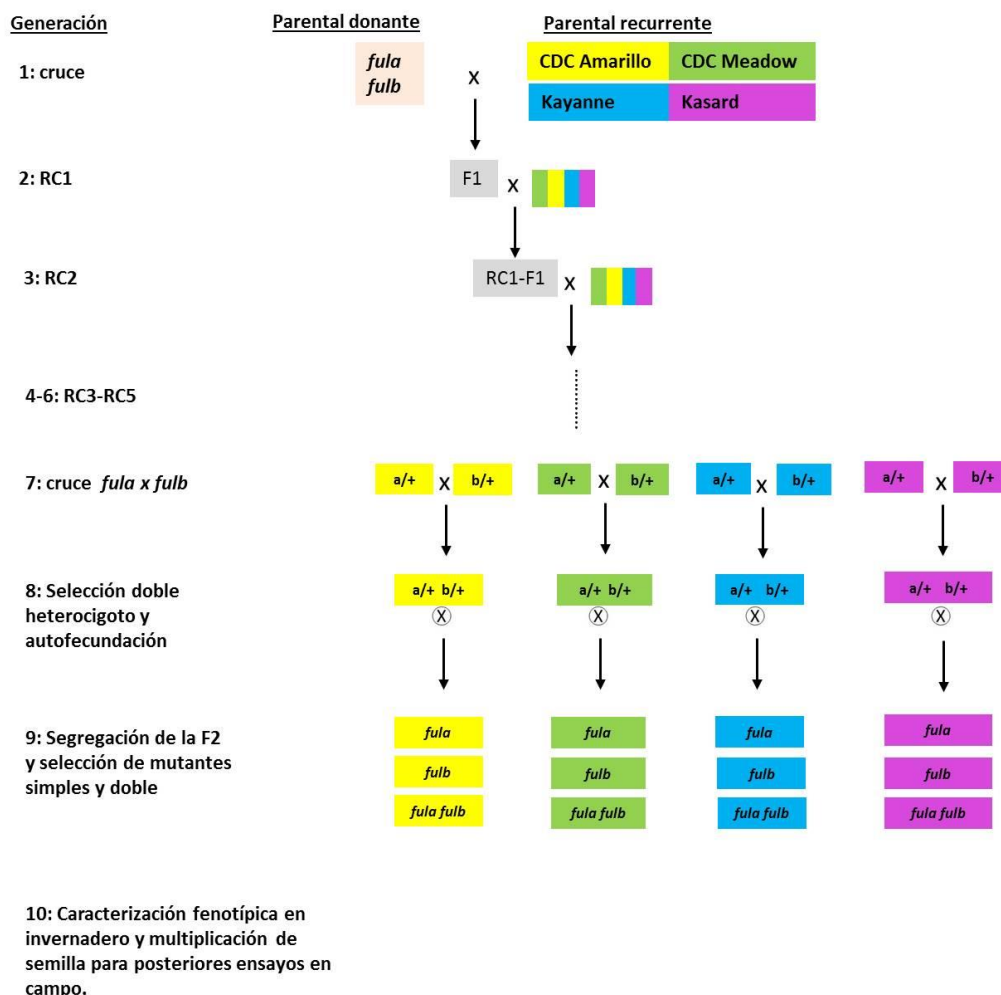


Figura 4-12: Esquema de introgresión de los alelos *fula* y *fulb* en variedades de élite.

## CAPÍTULO 4

Realizamos la introgresión de los alelos *fula* y *fulb* de forma separada, realizando una serie de retrocruces entre el mutante *fula* o *fulb* con el cultivar canadiense o europeo correspondiente. En cada generación seleccionamos mediante genotipado plantas *fula* o *fulb* heterocigóticas, que se emplearon para realizar el siguiente retrocruce con el cultivar de élite. Los retrocruces y la selección de plantas se realizaron durante 6 generaciones como se muestra en la figura 4-12, hasta completar el retrocruce 5. En la séptima generación, tras seleccionar mediante genotipado plantas *fula* o *fulb* heterocigóticas, procedimos a cruzarlas entre si. Debido a diferentes problemas de plagas y falta de espacio en el invernadero, durante esta tesis doctoral no pudimos continuar con el esquema de trabajo marcado, habiendo llegado hasta este punto. Continuaremos en la octava generación, con la identificación mediante genotipado de plantas doble heterocigóticas y recogeremos las semillas resultantes de su autofecundación, para en la siguiente generación seleccionar individuos *fula*, *fulb* y el doble mutante *fula fulb* de la población segregante. Una vez que contemos con los mutantes simples y el doble mutante en los cuatro fondos genéticos de élite, llevaremos a cabo diferentes pruebas en invernadero y en campo, para evaluar su rendimiento.



## DISCUSIÓN

En este capítulo, hemos abordado el estudio de la posible conservación de las rutas genéticas que controlan el GPA en especies distantes a *Arabidopsis*. Decidimos comenzar el estudio con la conservación funcional de *FUL* en guisante, ya que nuestro grupo poseía experiencia en el estudio de esta especie y disponíamos de mutantes para los dos ortólogos de *AtFUL* en guisante, *PsFULa* y *PsFULb*. Además, se conoce que las leguminosas tienen un GPA similar a *Arabidopsis*, gracias a que los primeros trabajos que se realizaron sobre el control de la parada meristemática emplearon guisante o soja para sus experimentos (Davies and Gan, 2012; Kelly *et al.*, 1988; Lockhart and Gottschall, 1961; Wang and Woolhouse, 1982).

La caracterización fenotípica de los mutantes *ful* de guisante nos ha permitido comprobar que, al menos *fulb* presenta un GPA tardío, pero ninguno de los mutantes *ful* muestran otros defectos evidentes en el desarrollo relacionados con las funciones descritas para *AtFUL* (regulación del tiempo de floración, regulación del desarrollo de hojas caulinares y del desarrollo de gineceo y fruto, etc.) (Balanza, 2011; Balanza *et al.*, 2014; Ferrandiz *et al.*, 2000b; Gu *et al.*, 1998).

Respecto a la regulación del momento de aparición del GPA en guisante, parece que el único ortólogo de *AtFUL* implicado es *FULb*, sin existir redundancia con *FULa*. Esta idea se basa en los resultados que hemos obtenido de la caracterización fenotípica de los mutantes simples y el doble mutante en diferentes ensayos. Mientras que la mutación en *FULb* de guisante tiene un claro efecto en el retraso de la parada de la actividad meristemática, con el mutante *fula* no observamos alteraciones en el GPA, produciendo el mutante simple un número de nudos reproductivos similar al silvestre, y el doble mutante un número de nudos reproductivos similar al mutante *fulb*. Esto sugiere varios posibles escenarios: por un lado, podría ser que *FULa* se hubiera convertido en un pseudogen, pero dado que este gen se expresa a niveles comparables al *FULb*, la secuencia de aminoácidos de la proteína es similar a la de *FULb* y además se ha visto que la sobreexpresión de *MtFULa* en *Arabidopsis* promueve la floración (Jaudal *et al.*, 2015), al igual que la sobreexpresión de *AtFUL* (Balanza *et al.*, 2014), esta hipótesis es poco probable. Por otro lado, es posible que se haya producido una subfuncionalización y que *FULb* haya adoptado la función de regulación meristemática, mientras que *FULa* lleve a cabo otras de sus funciones, como la regulación del tiempo de floración, desarrollo del carpelo, etc., aunque esto sea contradictorio con el desarrollo aparentemente normal de los mutantes *fula*. También es posible que otras funciones comunes o específicas de los genes *FULa* y *FULb* en guisante estén enmascaradas por redundancia funcional o epistasia con otros factores, e incluso por las condiciones de crecimiento de nuestros experimentos. Por ejemplo, todos los ensayos han sido realizados bajo condiciones de crecimiento de día largo, y, dado que en *Arabidopsis* se ha visto que el efecto del retraso de la floración del mutante *ful* es apreciable sobre todo en día corto (Balanza *et al.*, 2014), es posible que si creyéramos los mutantes *fula* y *fulb* de guisante en este régimen observáramos diferencias con los parentales silvestres. Por otro lado, Caméor es una variedad de guisante que se ha seleccionado por su floración temprana, causada por una mutación en el gen *LATE FLOWERING (LF)*, ortólogo del gen *TFL1* en *Arabidopsis*. *LF* controla la floración mediante la integración de diferentes señales endógenas y ambientales, incluido el fotoperiodo (Foucher *et al.*, 2003). Aunque el alelo *lf* presente en Caméor no es un alelo nulo, sí que afecta en gran medida a su funcionalidad, adelantando la floración de esta variedad en comparación a otros genotipos con un

alelo totalmente funcional. Así, sería interesante observar si las mutaciones *ful* tienen efecto en el tiempo de floración en un fondo genético con un alelo funcional de *LF*.

En el grupo del Dr. James Weller se está investigando si los genes *PsFULs* se sitúan aguas abajo de *PHYA*, *LATE1* y *LATE2*, todos ellos factores implicados en la ruta del fotoperiodo (Hecht *et al.*, 2007; Weller *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2009). Si los genes *PsFULs* están respondiendo al fotoperiodo, su pérdida de función debería mostrar algún tipo de cambio en los caracteres controlados por esta ruta. El fotoperiodo afecta sobre todo al nudo de floración en guisante, pero también hay otros caracteres que están regulados de forma indirecta por esta ruta, como puede ser la longitud de los entrenudos o la longitud de los pedúnculos de los I2. En nuestros ensayos, no observamos grandes cambios en el nudo de floración de los mutantes respecto al silvestre, pero sí en la longitud de los entrenudos o los pedúnculos de los I2, que en los mutantes fueron algo más largos, especialmente en *fulb* o el doble mutante, aunque en *fula* también se observó cierta variación frente al silvestre. Estos datos refuerzan la idea de que *FULA* no sea un pseudogen, sino que más bien esté participando en otras funciones, que posiblemente a causa del fondo genético empleado o de nuestras condiciones experimentales no somos capaces de detectar con claridad.

Respecto al desarrollo del fruto, también fue sorprendente que los mutantes *ful* no mostraran defectos claros en su desarrollo, ya que la regulación del desarrollo del carpelo y fruto es una de las funciones mejor caracterizadas de *FUL* en *Arabidopsis*.

El fruto de *Arabidopsis* es un fruto seco y dehiscente denominado silicua, similar al de guisante, aunque en *Arabidopsis* la silicua se origina a partir de un gineceo constituido por la fusión congénita de dos carpelos y en guisante consta de un solo carpelo (Smyth *et al.*, 1990). Cuando el gineceo de *Arabidopsis* ha alcanzado su estado maduro a lo largo del eje apical-basal se puede distinguir el estigma, estilo, ovario y ginóforo. El ovario ocupa la mayor parte del gineceo y externamente se pueden diferenciar dos valvas separadas por el replum. Entre la valva y el replum se localiza la zona de dehiscencia, compuesta por la capa de lignificación y la capa de separación. El nivel de lignificación de las diferentes zonas está finamente regulado, para permitir que una vez haya madurado el fruto, procesos mecánicos desencadenen la dehiscencia (Ballester and Ferrandiz, 2017; Ferrandiz and Fourquin, 2014). De forma muy resumida, algunos de los genes implicados en el correcto desarrollo del fruto y en concreto de la zona de dehiscencia son *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHP2*, *INDEHISCENT (IND)* y *ALCATRAZ (ALC)*, que se expresan en la zona de dehiscencia, donde promueven la lignificación y la formación de una capa de separación. La pérdida de función de estos genes produce frutos indehiscentes. Restringiendo la expresión de los genes anteriores al margen de valva se encontrarían *REPLUMLESS (RPL)*, que se expresa en el replum, y *FUL*, que se expresa en toda la valva y la vasculatura del estilo (Ballester and Ferrandiz, 2017; Ferrandiz and Fourquin, 2014). Cuando se pierde la función de *FUL*, la expresión de los genes de identidad de zona de dehiscencia se expanden a la valva, y por ello los frutos del mutante *ful* son más pequeños, al no poder elongar las células de la valva por estar lignificadas, mientras que las células del replum siguen su crecimiento por lo que finalmente el replum se ensancha y adquiere forma de zigzag (Ferrandiz *et al.*, 2000a; Ferrandiz *et al.*, 2000b; Gu *et al.*, 1998). Esta función de *FUL* parece estar conservada en varias especies alejadas filogenéticamente de guisante como *Medicago truncatula* o *Nicotiana benthamiana* (Ferrandiz and Fourquin, 2014; Pabón-Mora *et al.*, 2012) e incluso se ha reportado que *FUL* también participa en la regulación de

la maduración de especies más alejadas como tomate o melocotón (Bemer *et al.*, 2012; Tani *et al.*, 2007). Por tanto, es muy llamativo el hecho de que no hayamos encontrado defectos en el desarrollo de los frutos de los mutantes *fula fulb* en guisante, aparte de una ligera reducción en el tamaño de las vainas del doble mutante o la dehiscencia de algunos frutos de plantas *fula fulb* cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico. Tal vez, como el gineceo de guisante está compuesto por un único carpelo (Fourquin *et al.*, 2014), los procesos de regulación sean algo diferentes, aunque dada la conservación de la función de *FUL* en frutos con morfología y fisiología muy distinta, esta suposición es poco probable. Por otro lado, no hay que olvidar que las diferentes variedades de guisantes empleadas actualmente han pasado por un intenso proceso de selección en busca de variedades con menor dehiscencia. Por tanto, es posible que no estemos observando el efecto real de la pérdida de función de los genes *FUL* al estar presentes otras mutaciones que causan la indehiscencia del fruto. De hecho, en *Arabidopsis* el efecto fenotípico de la mutación *ful* en el desarrollo del fruto se suprime en gran medida en el doble mutante *ind ful*, ya que la ausencia de *ind* impide la lignificación ectópica de las células de la valva y la restricción de su crecimiento (Liljegren *et al.*, 2004). Así, podemos tener una situación análoga en el fruto de guisante a la que proponemos para explicar la falta de efecto de las mutaciones *ful* en el tiempo de floración por causa del genotipo *lf* del cultivar Caméor, es decir, que efectos epistáticos de otras mutaciones estén enmascarando la participación de los genes *FUL* en el desarrollo del fruto.

Todos estos datos estarían sugiriendo que gran parte de las funciones descritas para *FUL* en *Arabidopsis* podrían conservadas en guisante. Sin embargo, con los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral, la única función que claramente está conservada entre ambas especies es la regulación del GPA. Esto podría relacionarse con que la función más ancestral de *FUL* tal vez sea la regulación de la actividad meristemática. *FUL* forma parte del clado *AP1/FUL*, junto a *APETALLA1 (AP1)* y *CAULIFLOWER (CAL)*, y todos ellos actúan de forma redundante en la especificación de la identidad del meristemo (Ferrandiz *et al.*, 2000a). Este clado está presente tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas (Benlloch *et al.*, 2007; Preston and Kellogg, 2007), donde los procesos de duplicación que sufrieron a lo largo de la evolución fueron completamente distintos, por lo cual el clado *AP1/FUL* debería haber estado presente en un ancestro común previo a la separación de estos dos grandes grupos de angiospermas. En leguminosas está presente otro gen del clado *AP1/FUL*, *PsFULc/VEG1*, ortólogo de *AGL79* de *Arabidopsis*. Mientras que en *Arabidopsis* *AGL79* no tiene una función asignada, sino que se considera un pseudogen, en leguminosas juega un importante papel en la especificación de la identidad de meristemo inflorescente secundario (I2), y en su ausencia, la planta no llega a florecer, sino que en lugar de generarse I2 que darán lugar a flores, se generan ramas vegetativas (Berbel *et al.*, 2012).

Según el modelo de regulación de la actividad meristemática que hemos estudiado durante este trabajo de tesis doctoral en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, los niveles crecientes de *FUL* y el miR172 con la edad de la planta controlan la parada de la actividad meristemática mediante la regulación de la expresión de *AP2*. La conservación de la función de *FUL* en la regulación del GPA en guisante, unido a que no tenga efecto en el desarrollo del fruto, hace que el alelo mutante de *FULb* sea un recurso genético de gran valor para los programas de mejora en el cultivo de guisante. Aun así, queda por resolver si el resto de los integrantes de la ruta *FUL-AP2* tienen también funciones conservadas en guisante o si por el contrario, *FUL* está regulando el GPA a través de otras rutas genéticas en leguminosas

Según la información disponible en la literatura, tanto el miR172, como sus dianas, los factores de transcripción AP2, están presentes en angiospermas, gimnospermas e incluso pteridofitos (Axtell and Bartel, 2005; Luo *et al.*, 2013; Shigyo *et al.*, 2006). La mayoría de los estudios sobre el papel del miR172 en el desarrollo de la planta se han realizado en *Arabidopsis*, aunque algunos trabajos realizados en trigo, maíz, arroz, tomate, patata y otras plantas no modelo sugieren un alto nivel de conservación al menos en la regulación de la floración y la regulación de la actividad meristemática (Axtell and Bartel, 2005; Debernardi *et al.*, 2017; Greenwood *et al.*, 2017; Sunkar and Jagadeeswaran, 2008; Wang *et al.*, 2016; Willmann and Poethig, 2007; Zhang *et al.*, 2006).

Homólogos de AP2 se han encontrado en una amplia variedad de especies (Axtell and Bartel, 2005; Shigyo *et al.*, 2006) pero parece que los factores TOE2, TOE3, SMZ y SNZ son específicos de Brassicas (Wang *et al.*, 2016). Las filogenias tanto de gimnospermas como de angiospermas de la familia AP2 sugieren una significativa conservación del sitio de unión del miR172 (Shigyo *et al.*, 2006). Dentro de las angiospermas hay muy pocos cambios en la secuencia de nucleótidos del sitio de unión del miR172 de los genes AP2 de *Arabidopsis*, arroz, maíz y cebada (Zhu and Helliwell, 2011). Sin embargo, la información disponible sobre su conservación funcional es más escasa, aunque consistente con una conservación amplia de sus funciones. En *Antirrhinum majus* hay trabajos sobre la conservación en la regulación de la identidad de periantio, donde el doble mutante *lipless1/2* muestra la conversión homeótica de sépalos en hojas, sin afectar al desarrollo de los pétalos (Amy Litt, 2007; Keck *et al.*, 2003) y en tomate se ha visto que los ortólogos de AP2 desempeñan un papel en el desarrollo y la maduración del fruto (Chung *et al.*, 2010). Respecto a la actividad meristemática, se ha descrito la que sobreexpresión heteróloga de AP2L de *Picea abies* en *Arabidopsis* altera la expresión de *WUS* y *CLV3* (Nilsson *et al.*, 2007), y que la sobreexpresión de *AtAP2* en *N. benthamiana* también causa cambios en la expresión de *NbWUS* (Mlotshwa *et al.*, 2006). En maíz hay dos ortólogos tipo AP2, *INDETERMINATE SPIKELET1 (IDS1)*, que especifica la identidad de meristemo de espiga y limita el número de meristemas florales producidos (Chuck *et al.*, 1998), y *GLOSSY15 (GL15)*, que controla la fase de transición de estado juvenil a adulto (Moose and Sisco, 1994). En trigo, dos trabajos recientes muestran como la regulación de la expresión de AP2 mediante el miR172 controla el desarrollo de la espiga (Debernardi *et al.*, 2017; Greenwood *et al.*, 2017). Por último, ya dentro de las leguminosas, se ha estudiado en *Phaseolus vulgaris* el papel del módulo AP2/miR172 en el control de la nodulación, relacionándolo con la regulación de la expresión de genes de control de la actividad meristemática (Iniguez *et al.*, 2015; Nova-Franco *et al.*, 2015).

Los trabajos que se han realizado hasta el momento han mostrado la presencia del módulo AP2/miR172 en especies alejadas filogenéticamente con funciones conservadas en la regulación de distintos aspectos del desarrollo de la planta. Por tanto, cabría esperar que la función de regulación del GPA también estuviera conservada, aunque hasta el momento, y como consecuencia lógica de que este papel aún no ha sido descrito (Balanzà *et al.*, 2017), no hay ningún trabajo que se haya centrado en el estudio concreto del papel de AP2 en el mantenimiento de la actividad meristemática en las etapas finales del desarrollo. Por tanto, será interesante estudiar la conservación funcional de AP2/miR172 en la regulación de la actividad meristemática en leguminosas y otras especies de interés agronómico. Ese tipo de estudios posiblemente nos aportará nuevos recursos para mejorar el rendimiento de estos cultivos.

Por el momento la conservación de la función de FUL en la regulación del GPA en guisante nos ha permitido comenzar a aplicar directamente el uso de alelos mutantes para aumentar el rendimiento de este cultivo. Los experimentos que hemos llevado a cabo son preliminares, puesto que han sido realizados en el fondo genético Cameor, de gran utilidad en investigación por su floración temprana y menor tamaño de la planta entre otras características, pero que sin embargo no es una variedad élite que se cultive con fines productivos. Los resultados de producción que hemos obtenido en los ensayos de campo son muy positivos, pero quizá cuando evaluemos los mutantes introgresados en variedades élite queden atenuados, ya que dichas variedades ya son de alto rendimiento. No obstante, aunque el rendimiento solo se aumentara en un pequeño porcentaje, podría tener impacto en la producción. Además, es posible que no solo sea útil en guisante, sino que el empleo de alelos mutantes de *ful* en otras leguminosas, como *Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, etc., también domesticadas para ser indehiscentes, de lugar resultados similares.



# **CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

- ✓ La ruta *FUL-AP2* participa en la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática y el GPA. Con este trabajo, hemos demostrado que *AP2* actúa junto con otros miembros de la familia *AP2* regulados por el *miR172* en el control de este proceso. Además, nuestros resultados indican que la acción de *FUL* y *AP2* en el SAM es necesaria para prevenir la expresión ectópica de *AG* en el meristemo apical del tallo y mantener el hábito de crecimiento indeterminado. Por otro lado, hemos identificado nuevos factores potencialmente involucrados en el control del GPA como *BP*, *ER* o *ETT*, y que posiblemente estén participando en esta misma ruta.
- ✓ La inducción de la actividad *AP2* en meristemas que han experimentado el GPA es suficiente para inducir su reactivación y la formación de nuevas flores y frutos. El análisis de los cambios en el transcriptoma de meristemas reactivados de este modo, y su comparación con los reportados para meristemas proliferativos, reactivado o parados, realizados por otros grupos, nos ha permitido proponer hipótesis nuevas sobre los mecanismos moleculares y fisiológicos subyacentes a este proceso que serán la base de líneas de investigación futuras.
- ✓ La identificación y caracterización de mutantes estériles con GPA temprano nos puede permitir identificar factores implicados en el mecanismo de señalización entre las semillas en desarrollo y el SAM que desencadena el GPA. Por el momento, nos ha llevado a la identificación de un gen implicado en la metilación del DNA como un posible candidato a regular este proceso.
- ✓ Mediante la aplicación de diferentes estrategias biotecnológicas que pretenden silenciar la expresión de *FUL* o la desregulación de la acción del *miR172* en el SAM para conseguir aumentar el nivel de expresión de *AP2*, hemos conseguido incrementar el rendimiento en frutos de plantas de *Arabidopsis* hasta en un 40% sin que se produzcan efectos colaterales no deseados. Estos resultados avalan la utilidad de estos alelos como herramienta para aumentar la producción de otros cultivos de interés agronómico.
- ✓ En *Pisum sativum*, *FULb* regula el mantenimiento de la actividad meristemática. El mutante *fulb* podría representar un recurso genético útil para los programas de mejora genética del cultivo de guisante ya que no presenta defectos en el desarrollo de los frutos ni las semillas, pero sí un aumento significativo de nudos reproductivos/vainas, lo que hace que presente rendimientos en peso de semillas por planta del 82 al 173% superiores al presentado por las plantas silvestres.



## CONCLUSIONS

- ✓ The *FUL*-*AP2* pathway is involved in the regulation of maintenance of meristematic activity and GPA. With this work, we have demonstrated that *AP2* acts together with other members of the *AP2* family regulated by the *miR172* in the control of this process. In addition, our results indicate that the action of *FUL* and *AP2* in SAM is needed to prevent *AG* ectopic expression in the shoot apical meristem and to maintain the indeterminate growth habit. In addition, we have identified new factors potentially involved in GPA control such as *BP*, *ER* or *ETT*, which possibly participate in this same pathway.
- ✓ The induction of *AP2* activity in meristems that have undergone GPA is enough to induce their reactivation and the formation of new flowers and fruits. The analysis of transcriptomic changes of meristems reactivated in this way, and further comparison with those reported for proliferative, reactivated or arrested meristems performed by other groups, has allowed us to propose new hypotheses about the molecular and physiological mechanisms underlying this process. These results will be the basis of future lines of research.
- ✓ The identification and characterization of sterile mutants with early GPA may lead to identify factors involved in the signaling mechanism between the developing seeds and the SAM that triggers GPA. For the moment, it has led us to the identification of a gene involved in DNA methylation as a possible candidate to regulate this process.
- ✓ Through the application of different biotechnology strategies that seek to increase the level of expression of *AP2* in the SAM, either by silencing the expression of *FUL* or by impairing *miR172*-mediated regulation of *AP2-like* genes, we have succeeded in increasing the fruit yield of *Arabidopsis* plants up to one 40% without undesirable side effects. These results support the usefulness of these alleles as a tool to increase the production of other crops of agronomic interest.
- ✓ In *Pisum sativum*, *FULb* regulates the maintenance of meristematic activity. The *fulb* mutant could represent a useful genetic resource for pea breeding programs as it has no defects in fruit development or seed, but shows a significant increase in reproductive nodes/pods, reaching up to 82-173% higher yield (as seed weight per plant) than the parental cultivar.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## Material biológico y condiciones de cultivo

### Material microbiano

#### Cepas bacterianas utilizadas

Durante la realización de esta tesis se han utilizado las cepas bacterianas descritas en la tabla M-1.

**Tabla M-1: Cepas bacterianas empleadas durante la realización de este trabajo.**

CEPA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia Coli</i>	Clonaje de vectores	Clontech
Supercharge EZ10 <i>Escherichia Coli</i> DB3.1TM	Clonaje de vectores portadores del gen ccdB del sistema Gateway	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	(Koncz and Schell, 1986)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90 + pSOUP	Clonaje de vectores pGreen utilizados para transformación de plantas.	(Hellens <i>et al.</i> , 2005)

#### Cepas de levadura utilizadas

En este trabajo se han utilizado las cepas de levadura PJ69-4A y PJ69-4 $\alpha$ . Las características de estas cepas son las siguientes:

PJ69-4A: MAT $\alpha$ ; trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 (deleted) gal80 (deleted) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ.

PJ69-4 $\alpha$ : MAT $\alpha$ ; trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 (deleted) gal80 (delated) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ.

### Material vegetal

#### Genotipos de Arabidopsis utilizados

Durante la realización de este trabajo se han empleado los ecotipos silvestres de Arabidopsis Columbia-0 (Col) y Landsberg *erecta* (Ler). En la tabla M-2 se indican los diferentes genotipos de Arabidopsis con los que se ha trabajado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla M-2: Genotipos y líneas transgénicas utilizadas en este trabajo.**

Gen	Línea	Ecotipo	Referencia
<b>Mutantes</b>			
AP2	<i>ap2-12</i>	Col	(Yant <i>et al.</i> , 2010)
	<i>ap2-12 ful-2</i>	Col	(Balanzà, 2011)
AP2-like	<i>smz-2</i>	Col	(Mathieu <i>et al.</i> , 2009)
	<i>snz-1</i>	Col	(Mathieu <i>et al.</i> , 2009)
	<i>toe1-2</i>	Col	(Aukerman and Sakai, 2003)
	<i>toe2-1</i>	Col	(Aukerman and Sakai, 2003)
	<i>toe3-1</i>	Col	(Yant <i>et al.</i> , 2010)
	<i>toe1 toe2 toe3 smz snz ap2</i>	Col	(Yant <i>et al.</i> , 2010)
APS1	<i>aps1</i>	Col	(Ventriglia <i>et al.</i> , 2008)
BP	<i>bp-1</i>	Ler	(Koornneef <i>et al.</i> , 1983)
CER6	<i>cer6-2</i>	Ler	(Preuss <i>et al.</i> , 1993)
	Mutagenesis EMS en <i>cer6-2</i>	<i>cer6-2</i> (Ler)	(Alonso Cantabrana, 2005)
ER	<i>er-105</i>	Ler	(Shpak <i>et al.</i> , 2005)
ETT	<i>arf3-2</i>	Col	(Okushima <i>et al.</i> , 2005)
	<i>ett-13</i>	Col	(Pekker <i>et al.</i> , 2005)
	<i>ett-3</i>	Col	(Sessions <i>et al.</i> , 1997)
FUL	<i>ful-1</i>	Ler	(Gu <i>et al.</i> , 1998)
	<i>ful-2</i>	Col	(Ferrandiz <i>et al.</i> , 2000a)
GBS1	<i>gbs1</i>	Col	(Ortiz-Marchena <i>et al.</i> , 2014)
SEX1	<i>sex1</i>	Col	(Yu <i>et al.</i> , 2001)
<b>Líneas transgénicas</b>			
AP2	GT.100845 (AP2: GUS)	Col	(Sundaresan <i>et al.</i> , 1995)
	<i>ful-2</i> GT.100845 (AP2: GUS)	Col	(Balanzà, 2011)
	FUL:VP16 GT.100845 (AP2: GUS)	Col	(Balanzà, 2011)
	pAP2::AP2:YFP	Ler	(Wollmann <i>et al.</i> , 2010)
miR172	35S::miR172	Col	(Yant <i>et al.</i> , 2010)
AG	AG::GUS (KB9)	Col	(Busch <i>et al.</i> , 1999)
	<i>ful-2</i> AG::GUS	Col	(Balanzà, 2011)
	<i>ap2-12</i> AG::GUS	Col	(Balanzà, 2011)
ETT	pARF3::ARF3:GFP	Col	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
	pETT::GUS	Col	(Ng <i>et al.</i> , 2009)
	<i>ful-2</i> pETT::GUS	Col	(Balanzà, 2011)
	pFUL:FUL::VP16 pETT::GUS	Col	(Balanzà, 2011)



### Genotipos de *Pisum sativum* utilizados

Durante la realización de este trabajo se han empleado las variedades de *Pisum sativum* indicadas en la tabla M-3.

**Tabla M-3: Variedades de *Pisum sativum* utilizadas es este trabajo.**

<b>CULTIVARES:</b>		
<b>NOMBRE</b>	<b>ORIGEN</b>	
Caméor	-	
CDC Amarillo	Tom Warkentin (Universidad de Saskatchewan, Canadá)	
CDC Meadow	Tom Warkentin (Universidad de Saskatchewan, Canadá)	
Kasard	Gérard Duc (INRA, Francia)	
Kayanne	Gérard Duc (INRA, Francia)	

<b>MUTANTES:</b>		
<b>GENOTIPO</b>	<b>CULTIVAR</b>	<b>REFERENCIA</b>
<i>fula</i> (#999)	Caméor	(Dalmais <i>et al.</i> , 2008)
<i>fulb</i> (#4082)	Caméor	(Dalmais <i>et al.</i> , 2008)

### **Condiciones de cultivo de plantas**

#### Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en invernadero

Las semillas de *Arabidopsis* se sembraron en una mezcla 2:1:1 de turba:perlita:vermiculita y se estratificaron durante 4 días en oscuridad a 4°C para sincronizar la germinación, tras lo cual se pasaron a la cabina de cultivo.

Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero o en cámara de cultivo (fitotrón) con un fotoperiodo inductivo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (día largo, DL) y una temperatura que osciló entre 21 y 22°C durante el día y 15°C durante la noche. Se regó por inmersión dos veces a la semana con solución Hoagland nº 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

#### Cultivo de *Arabidopsis thaliana* en placas Petri.

Las semillas se esterilizaron y se sembraron en placas Petri que contenían medio MS (2.2g/L de sales MS de "Duchefa", 20g/L de sacarosa, 0.1g/L MES y 6g/L de agar, pH 5.9) más el agente de selección correspondiente en cada caso.

Tras la estratificaron durante 4 días a 4°C en oscuridad, las placas se pasaron a una cámara de cultivo in vitro, con temperatura constante de 24°C y fotoperiodo de DL (16 h de luz y 8 h de oscuridad).

### Cultivo de *Pisum sativum* en invernadero

Las semillas de guisante se sembraron en macetas (12cm de diámetro) con vermiculita. Las macetas se colocaron en mesas que disponían de riego automático. Las plantas fueron regadas con solución Hoagland nº 1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero con un fotoperiodo inductivo de 16h de luz y 8h de oscuridad, con luz natural suplementada con luz artificial mediante lámparas de vapor de mercurio de 400 W. Las condiciones de temperatura variaron según el experimento entre 21.5 y 23.5°C durante el día y 15°C durante la noche.

## Metodologías

### **Métodos de biología molecular.**

#### Extracción y purificación de ácidos nucleicos.

- ✓ Método de extracción de DNA genómico para genotipado de *Arabidopsis* por PCR

Se siguió el protocolo descrito en (Berendzen *et al.*, 2005) con alguna modificación. Se partió de aproximadamente de 10 mg de material (una hoja joven pequeña) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Se molió el tejido con 100 µl de una disolución de sacarosa: 50 mM Tris-HCl; pH7.5, 300 mM NaCl, 300 mM Sacarosa y agua hasta 20 ml. Posteriormente se añadieron 100 µl más de esta solución y se incubó inmediatamente a 95-100°C durante 10 min. Se centrifugó a 9000 rpm durante 15 seg. Finalmente se transfirieron 100 µl del sobrenadante a un nuevo tubo, sin arrastrar material vegetal, y se mantuvo en hielo o congelado a -20°C hasta realizar la PCR. Se utilizaron 2 µl para la reacción de PCR.

- ✓ Método de extracción de DNA genómico de alta calidad para *Arabidopsis*.

Se siguió el protocolo proporcionado por A. Sessions (comunicación personal), con alguna modificación. Se partió de aproximadamente de 10 mg de material (una hoja joven pequeña) y se congeló la muestra en nitrógeno líquido. Se molió el tejido congelado. Posteriormente se añadieron 600 µl de tampón de lisis al 1X (1x tampón de lisis 10X\*, 50 mM EDTA, 7 M urea, 2% sarcosyl) y se terminó de moler. A continuación, se incubaron las muestras a 37°C durante 10 min con agitación fuerte. Transcurrido ese tiempo se añadieron 300 µl de fenol/CHCl<sub>3</sub>/IsoOH y se sometieron a un nuevo periodo de incubación de 10 min. Tras centrifugar las muestras se transfirió la fase superior a un nuevo tubo y se añadieron 50 µl de NaOAc 3 M (pH=5) y 550 µl de isopropanol y se mezcló homogéneamente. Se centrifugaron las muestras y se decantó el sobrenadante. A continuación, se lavó el DNA con etanol al 70% y una vez que se hubo evaporado todo el etanol, se resuspendió en 100µl de H<sub>2</sub>O y se trató con RNAsa.

\*Tampón de lisis 10X: 3,5M NaCl, 10 mM Tris (pH=7,6), 10 mM EDTA (pH=8).

✓ Método de extracción de DNA genómico para *Pisum sativum*

Se siguió un protocolo adaptado a partir del método de extracción de ácidos nucleicos de alta calidad para *Arabidopsis*. Se partió de aproximadamente de una muestra de medio eppendorf de hojas jóvenes del ápice. Se congeló en nitrógeno líquido y con la ayuda de una varilla de plástico se molió. Posteriormente se añadieron 600 mL de tampón de lisis al 1X (1x tampón de lisis 10X\*, 50 mM EDTA, 7 M urea, 2% sarcosyl) y se terminó de moler. A continuación, se incubaron las muestras a 37°C durante 10 min con agitación fuerte. Transcurrido ese tiempo se añadieron 300 mL de fenol/CHCl<sub>3</sub>/IsoOH y se sometieron a un nuevo periodo de incubación de 10 min. Tras centrifugar las muestras se transfirió la fase superior a un nuevo tubo que contenía 50 µL de NaOAc 3 M (pH=5) y 550 µL de isopropanol. Con la ayuda de una varilla de vidrio se recogió el DNA precipitado y se lavó introduciéndolo varias veces en un eppendorf que contenía etanol al 70%. A continuación, se dejó secar y una vez que se hubo evaporado todo el etanol se resuspendió el DNA introduciendo la varilla de vidrio con el DNA en un eppendorf con H<sub>2</sub>O, tratando posteriormente con RNAsa durante al menos dos o tres horas.

\*Tampón de lisis 10X: 3,5 M NaCl, 10 mM Tris (pH=7,6), 10 mM EDTA (pH=8).

✓ Extracción y purificación de RNA total

Para la extracción de RNA se utilizaron los sistemas RNeasy Plant Minikit (Qiagen) y E.Z.N.A. Plant RNA KIT (OMEGA bio-tek). Si el objetivo final es cuantificar la expresión génica mediante Q-RT-PCR se requiere un paso previo a la síntesis de cDNA de eliminación de DNA genómico, debido a que en el protocolo de extracción de estos kits no está presente.

Para la extracción de RNA total destinado a la obtención de cDNA con el que se realizaría el RNA-seq se empleó el kit NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel) que incluye el tratamiento con DNAsa en la columna.

### Amplificación del DNA mediante PCR

A continuación, se detallan los diferentes protocolos de PCR que se han empleado durante la realización de este trabajo. En el Anexo I se recogen todos los cebadores empleados en esta Tesis.

✓ PCR tipo para amplificar cDNAs

Se empleó una polimerasa de alta fidelidad que posee una tasa de error mínima y actividad exonucleasa 3'-5'. Las condiciones generales seguidas fueron:

0.8 µM de cada cebador; 0.2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; 0.5 U Taq Phusion® High-Fidelity (New England Biolabs); Tampón de PCR 1X (New England Biolabs) y 200 ng de DNA molde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con una incubación inicial de 95°C 2 min; seguida de 30 a 35 ciclos de 95°C 30 seg, T<sub>anillamiento</sub> 30 seg y 72 °C t<sub>extensión</sub>; con una incubación final de 72°C 10 min. La temperatura de anillamiento (T<sub>anillamiento</sub>) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada (T<sub>m</sub>) de los cebadores empleados en la reacción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El tiempo de extensión ( $t_{\text{extensión}}$ ) dependía de la longitud del fragmento a amplificar que con esta polimerasa fue de 30 seg/kb.

### ✓ PCR tipo para genotipados

Para el genotipado mediante PCR se empleó 2 $\mu$ l de la extracción de DNA genómico de las diferentes plantas a analizar. Las condiciones generales seguidas fueron:

0.8  $\mu$ M de cada cebador; 0.2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; 2-3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U Taq DNA polimerasa EcoTaq (GoTaq); Tampón de PCR 5X (GoTaq) y DNA molde en concentración variable (2  $\mu$ l). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador con una incubación inicial de 94°C 5-10 min; seguida de 35 ciclos de 94 °C 40 seg,  $T_{\text{anillamiento}}$  40 seg y 72 °C  $t_{\text{extensión}}$ ; con una incubación final de 72°C 5 min. La temperatura de anillamiento ( $T_{\text{anillamiento}}$ ) se estimó en función de la temperatura de fusión aproximada ( $T_m$ ) de los cebadores empleados en la reacción. El tiempo de extensión ( $t_{\text{extensión}}$ ) dependía de la longitud del fragmento a amplificar, que con esta polimerasa fue de 1 min/Kb.

En el anexo II se muestran las combinaciones de cebadores utilizadas para el genotipado, así como el tamaño de los fragmentos esperados. En el caso de algunos mutantes aplicamos la técnica de dCAPS, donde el tamaño del fragmento obtenido para el alelo silvestre y el mutante es el mismo, pero la diferencia entre ellos es visible tras el tratamiento con un enzima de restricción.

### ✓ PCR semicuantitativa

Esta técnica se utilizó para detectar cambios en el nivel de expresión de los genes localizados en torno a la inserción del T-DNA del vector pSK015 empleado en la mutagenesis de Activation tagging. Se diseñaron cebadores para amplificar fragmentos de entre 500-600 pb (Anexo I). Como DNA molde se empleó el cDNA obtenido a partir de la retrotranscripción de RNA total de hojas de roseta. Además de la amplificación con cebadores específicos para cada gen de interés también se incluyó como control constitutivo la amplificación del gen endógeno *ACTINA*. En total se realizaron tres PCRs para cada uno de los genes estudiados, así como para el control de *ACTINA*. Cada una de las reacciones se detuvo a diferente número de ciclos (25, 27 y 30 ciclos) con el fin de establecer una relación lineal entre la cantidad de producto amplificado y la cantidad de transcrito inicial en la reacción y poder observar la existencia de cambios de expresión entre muestras silvestres y muestras mutantes.

### ✓ PCR cuantitativa en tiempo real (Q-RT-PCR)

Esta técnica se utilizó para estudiar el nivel de expresión de diferentes genes. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores se obtuvieron de la literatura o fueron diseñados mediante el programa Primer Express 2.0 utilizando los parámetros por defecto, que incluye entre otros,  $T_m$  entre 58-60 °C, contenido en GC 30-80% y amplicones entre 100-150 pb. En el anexo I se muestran los cebadores utilizados.

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l empleando 10  $\mu$ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1.2  $\mu$ l de cada uno de los cebadores a partir de un stock de 5  $\mu$ M (concentración final 0.3  $\mu$ M), en placas *MicroAmp Optical 96-well reaction plate* (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizaron tres PCRs idénticas (replicas técnicas) y se incluyeron controles negativos de la reacción para descartar contaminaciones. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador "7500 Real-Time PCR System". Se utilizó el programa de amplificación recomendado por la casa comercial para los oligos diseñados con Primer Express (2 min. 50°C, 10 min. 95°C, 40 ciclos de 15 seg. a 95 °C, 1 min. a 60°C). El cDNA del gen de interés se cuantificó, durante la fase exponencial de la reacción de PCR, en función del número de ciclos necesarios para superar un umbral determinado de fluorescencia (Ct). A partir de este valor, se calculó la expresión relativa del gen de interés respecto al gen constitutivo TIP41-like según el método " $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct)" propuesto en el manual "Guide to performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR" (Applied Biosystems, 2008). Al final de cada PCR también se realizó una cinética de Tm (curva de disociación) aplicando un gradiente de temperaturas creciente para analizar la presencia de productos inespecíficos o dímeros de los cebadores.

### Construcciones

#### ✓ Vectores

Los vectores que se han empleado durante esta tesis doctoral se recogen en la tabla M-4. Todos los plásmidos obtenidos durante esta tesis se muestran en el anexo III y el procedimiento para su construcción de detalla en los apartados siguientes.

#### ✓ Clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR

Los fragmentos amplificados se clonaron en los plásmidos intermedios adecuados según las características del vector final que se fuera a emplear en cada caso. Estos plásmidos permitieron la secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados. Durante este trabajo se ha empleado como plásmidos intermedios el vector pGEM-T Easy (Promega) y el vector pCR8/TOPO/GW (Invitrogen), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

#### ✓ Generación de plásmidos para la expresión de diferentes alelos de AP2 o el MIM172 bajo el control del promotor de TFL1.

Para amplificar los diferentes fragmentos de DNA (AP2<sup>170</sup>, AP2m3 o MIM172) se diseñaron cebadores que incluían la secuencia de los sitios de restricción necesarios para su clonaje en el vector final. En la reacción de PCR se empleó una polimerasa de alta fidelidad (tasa de error mínima y actividad exonucleasa 3'-5'). Los diferentes amplicones se clonaron en el vector pGEM-T Easy o pCR8/TOPO/GW. Posteriormente se subclonaron en el vector binario p2.2-G-4.6. Este vector, obtenido a partir del vector pBIN19, contiene las regiones promotoras en 5' y 3' del gen TFL1, y la secuencia codificante del gen de la  $\beta$ -Galacturonasa(GUS). La secuencia GUS fue sustituida por los diferentes insertos generados previamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- ✓ Generación de plásmidos para la expresión de un RNAi-FUL bajo el control del promotor de TFL1.

Debido a la alta homología de secuencia existente entre los genes MADS (Parenicova, 2003), para la generación del RNAi-FUL se eligió una región de la secuencia codificante de FUL con baja homología con el resto de genes MADS-box (282-726 pb desde el ATG), para evitar el silenciamiento de estos.

La región seleccionada se amplificó con dos combinaciones de cebadores que incluían en el extremo 5' la secuencia de los sitios de restricción necesarios para su clonaje en el plásmido Hannibal en sentido directo (HpaI/KpnI, "FUL1") y en antisentido (SmaI/XbaI, "FUL2") y posteriormente en el plásmido final p2.2-G-4.6..

Inicialmente, cada uno de los amplicones fue clonado en el vector pGEM-T Easy. Este paso permitió, además de comprobar mediante secuenciación que la secuencia clonada fuera correcta, incorporar un nuevo sitio de restricción para EcoRI (presente en el sitio de clonación múltiple del vector) en el inserto "FUL1", necesario para el clonaje en pHANNIBAL.

pHANNIBAL es un vector de clonación direccional para la inserción de productos de PCR a ambos lados del intrón, generando horquillas de silenciamiento. Una vez que se disponía de los vectores pGEM-FUL1 y pGEM-FUL2 se procedió a la subclonación de los insertos "FUL1" y "FUL2" en el vector pHANNIBAL según el procedimiento siguiente.

Se digirió el vector recombinante pGEM-FUL1 con los enzimas de restricción EcoRI/KpnI, para liberar el inserto y el vector pHANNIBAL con los mismos enzimas para linearizarlo y generar extremos cohesivos compatibles con el inserto. Los extremos cohesivos del pHANNIBAL se desfosforilaron para impedir la religación.

Se ligó el inserto "FUL1" con el vector pHANNIBAL lineal, por unión de los extremos cohesivos producidos por la digestión con los enzimas de restricción. En este paso FUL se insertó en sentido 5'-3'.

Tras este paso, se procedió a la digestión el vector recombinante pGEM-FUL2 con los enzimas de restricción ClaI/XbaI, para liberar el inserto y el vector pHANNIBAL-FUL1 con los mismos enzimas para linearizarlo y generar extremos cohesivos compatibles. Nuevamente el vector fue sometido a la desfosforilación de los extremos 5' cohesivos para impedir la religación. Y se ligó el inserto "FUL2" con el vector pHANNIBAL-FUL1 lineal. En este paso FUL se insertó en sentido 3'-5'.

A continuación, se extrajo la secuencia del RNAi-FUL (FUL 5'-3'-intrón-FUL 3'-5') mediante la digestión del vector recombinante pHANNIBAL-"FUL1"- "FUL2" con los enzimas de restricción HpaI y XbaI. Paralelamente Se digirió el vector binario p2.2-G-4.6, que contiene el promotor de TFL1, con los enzimas de restricción XbaI y SmaI, que linearizaron el vector y eliminaron la secuencia codificante del gen GUS.

Tabla M-4: Vectores utilizados durante este trabajo.

VECTOR	CARACTERÍSTICAS	ORIGEN/REFERENCIA
pGEM-T Easy	Amp <sup>r</sup> , lacZ, sitios de unión para los cebadores T7, SP6, M13D y M13R	Promega
pCR8/GW/TOPO	Spec <sup>r</sup> , sitios de unión para los cebadores M13D, M13R, GW1 y GW2	Invitrogen
pHANNIBAL	Amp <sup>r</sup> , promotor 35S, dos sitios de clonaje separados por un intrón para generar un RNAi	Wesley <i>et al.</i> , 2001
pBIN-GUS (p2.2-G-4.6)	Vector de expresión, promotor de TFL1, Kan <sup>r</sup> (bacteria y planta)	Serrano-Mislata, 2010
pFK100	Vector de expresión, Spec <sup>r</sup> (bacteria) y Kan <sup>r</sup> (planta), promotor de FD, sitios de recombinación Gateway AttR, sitios de unión para los cebadores M13D, M13R	Markus Smith
pFK101	Vector de expresión, promotor de FD, Spec <sup>r</sup> (bacteria) y Basta <sup>r</sup> (planta), sitios de recombinación Gateway AttR, sitios de unión para los cebadores M13D, M13R	Markus Smith
pEarleyGate100	Vector de expresión, promotor 35S del CaMV, Kan <sup>r</sup> (bacteria) y Basta <sup>r</sup> (planta)	Invitrogen
RS300	Amp <sup>r</sup> , vector pBluescript (SK) con el miR319a	<a href="http://wmd.weigelword.org">http://wmd.weigelword.org</a>
pOpON2.1	Vector de expresión inducible por dexametasona. Spec <sup>r</sup> (bacteria) y Kan <sup>r</sup> (planta)	Craft <i>et al.</i> , 2005
pSKI015	Vector de expresión, Amp <sup>r</sup> (bacteria) y Basta <sup>r</sup> (planta), 4x35S, , sitios de unión para los cebadores M13D, M13R	Weigel <i>et al.</i> , 2000
pDEST22	Amp <sup>r</sup> (bacterias) y TRP1 (levadura), GAL4 AD	Invitrogen
pDEST32	Gm <sup>r</sup> (bacterias) y LEU2 (levadura), GAL4 BD	Invitrogen
pYFC43	Vector de expresión transitoria. Kan <sup>r</sup>	pMDC43/A.Ferrando
pYFC43	Vector de expresión transitoria. Kan <sup>r</sup>	pMDC43/A.Ferrando

## MATERIALES Y MÉTODOS

Finalmente, se ligó el inserto FUL1-intron-FUL2 con el vector binario p2.2-G-4.6. Se unieron entre sí los extremos cohesivos producidos por la digestión con el enzima de restricción XbaI y los extremos romos producidos por la digestión con HpaI y SmaI. Inicialmente el diseño de la construcción se basaba en la linearización del vector binario p2.2-G-4.6 con los enzimas de restricción HpaI y XbaI, pero posteriormente se observó que el vector poseía varios sitios de corte para el enzima de restricción HpaI, por tanto no era viable esa estrategia, y se diseñó una alternativa con la unión de los extremos romos que se formaban con HpaI en el inserto y SmaI en el vector de destino.

- ✓ Generación de plásmidos para la expresión de diferentes alelos de AP2 o FUL bajo el control del promotor de FD.

Los vectores pFK100 y pFK101, que contenían la secuencia promotora del gen *FD*, contaban con las secuencias de recombinación AttR del sistema de clonaje Gateway. Por ello inicialmente las secuencias de los alelos de *AP2* con diferente resistencia a la regulación del miR172 fueron clonadas en el vector intermedio pCR8/TOPO/GW y se tuvo acceso al vector pCR8-FUL:VP16 (cedido por Balanzà). Posteriormente se procedió a su subclonación en el vector final pFK100 y pFK101 mediante la reacción de recombinación LR.

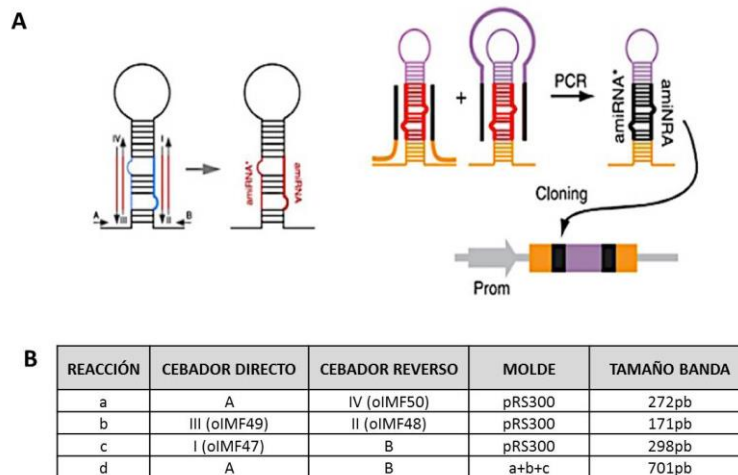
- ✓ Generación de plásmidos para la expresión de un amiR- FUL bajo el control del promotor de FD.

El primer paso de esta construcción fue el diseño del microRNA artificial (Schwab et al. 2006).

Para ello se usó la herramienta bioinformática “Web MicroRNA Designer” (<http://wmd.weigelword.org>). En este caso concreto, donde solo se quería silenciar únicamente la expresión del gen FUL, se introdujo en el programa la misma secuencia específica de FUL empleada en la construcción del RNAi. El programa, tras realizar el análisis pertinente, devolvió diferentes alternativas para la construcción del amiRNA, de las cuales se seleccionó la primera opción.

Esta herramienta bioinformática proporcionó la secuencia de cuatro cebadores específicos (I a IV), necesarios para obtener el microRNA artificial. El molde utilizado para realizar las PCR fue el vector RS300, que se trata de un vector pBluescript (SK) con el miR319a, miRNA endógeno de *Arabidopsis*. Este plásmido no contiene ningún promotor, sólo sirve como molde para mutagénesis directa por PCR. Para sustitución del microRNA presente en el plásmido RS300 por el microRNA específico del gen FUL se realizaron cuatro PCRs, combinando los diferentes cebadores indicados por la aplicación (Anexo I) y siguiendo el protocolo proporcionado por el programa (Fig. M-1).





**Figura M-1: A) Sustitución del miRNA319 del plásmido R300 por el microRNA específico para el gen FUL.** Mediante la superposición de PCRs en varios pasos se consiguió sustituir el dúplex miRNA-miRNA\* endógeno del RS300 por una secuencia específica de FUL, generando un precursor artificial de un miRNA contra FUL. Posteriormente la secuencia quimérica se transfirió al vector elegido. **B) Combinación de cebadores en las 4 PCRs.**

Después, el producto de PCR obtenido a partir de la reacción “d” se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO y posteriormente se secuenció con los cebadores A y B que forman parte del fragmento amplificado. Finalmente, este microRNA se clonó en los vectores pFK100 y pFK101, que contienen el promotor de *FD*.

### Transformación genética de *Arabidopsis* mediante infiltración al vacío.

Para la generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis* se utilizó el ecotipo silvestre Col. La transformación se realizó según el protocolo de infiltración por vacío descrito en Bechtold *et al.* (Bechtold *et al.*, 1993) con algunas modificaciones introducidas en Clough y Bent (Clough and Bent, 1998).

### Análisis transcriptómico

- ✓ Inducción con dexametasona

Tres semanas tras el alzado de la inflorescencia de las plantas pOpON:AP2m3, aproximadamente una semana antes de que se desencadene el GPA, se realizó la inducción de la expresión de AP2m3 mediante la aplicación de un tratamiento con dexametasona 5µM (DEXA) o un tratamiento control (MOCK). Para ello, se sumergieron todos los ápices en una solución DEXA (5µM, 0,015% Silvet L77) o MOCK (0,015% Silvet L77). Seis horas después del tratamiento DEXA/MOCK se recogieron los ápices de las inflorescencias a los que se les había eliminado el mayor número posible de yemas florales, en nitrógeno líquido. En total se recogieron tres replicas biológicas del tratamiento MOCK y otras tres réplicas del tratamiento DEXA. Cada muestra contaba con al menos 20 ápices.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ✓ Secuenciación del transcriptoma

La construcción de las librerías de cDNA a partir de las muestras obtenidas tras la inducción con dexametasona o con mock (tres replicas biológicas de cada grupo) se realizó con el sistema TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La distribución de tamaños de las librerías se evaluó usando el sistema 2100 Bioanalyzer and the High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA). La cuantificación de las librerías se obtuvo usando 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Las librerías de cDNA se secuenciaron en el servicio de secuenciación de la Universidad Federal de Rio de Janeiro, en colaboración con el Dr. Marcio Alves Ferreira. Para la secuenciación se empleó la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

### ✓ Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron preprocesadas y analizadas por el Servicio de Bioinformática del IBMCP. Para el preprocesado de las secuencias (eliminación de adaptadores y extremos de baja calidad) se usó el software 'cutadapt' (<http://cutadapt.readthedocs.io>). Las secuencias así preprocesadas fueron alineadas al transcriptoma de referencia TAIR10 de *Arabidopsis thaliana*, disponible en la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org>; Lamesch *et al.*, 2012) usando Bowtie2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22388286> Langmead and Salzberg, 2012).

La estimación de la abundancia de transcritos se realizó mediante el paquete RSEM (Li and Dewey, 2011) y la expresión diferencial de transcritos (valores logFC, logCPM, p-value y FDR) fue estimada usando el paquete edgeR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19910308>; Robinson *et al.*, 2010).

Para identificar los genes diferencialmente expresados se calculó la tasa de cambio o *fold change* (FC), dividiendo los valores de FPKM de la muestra tratada con dexametasona entre los de la muestra tratada con mock. Para poder interpretar con mayor facilidad la expresión diferencial de los diferentes genes, los valores de FC fueron transformados a una escala log<sub>2</sub>, donde un FC de ±1 equivale al doble de expresión de una muestra frente a la otra. También se aplicaron los test estadísticos correspondientes al p-value y al "False Discovery Rate" (FDR) para tener un nivel de significatividad del cambio de expresión.

Para la selección de genes diferencialmente expresados aplicamos como parámetros de selección un FC > 0,75 y < -0,75, p-value <0,05 y FDR <0,05.

### ✓ Análisis de enriquecimiento de categorías de ontología génica

Se realizó mediante la aplicación AgriGO (Du *et al.*, 2010), empleando el Análisis de Enriquecimiento Singular (SEA) y comparando frente a la base de datos de *Arabidopsis* (TAIR10).

Estudios de interacción proteína-proteína:

- ✓ Ensayo de doble híbrido en levadura (Yeast two hybrid, Y2H)

En el ensayo de Y2H se estudia la posible interacción entre distintos factores de transcripción. Este ensayo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Stefan de Folter. Se siguió el protocolo descrito en *Yeast Protein-Protein Interaction Assays and Screens* (de Folter and Immink, 2011), donde se emplea un sistema de doble híbrido en levadura basado en GAL-4 (Invitrogen). Para este sistema se emplean los vectores pDEST22, que contiene dominio de activación de GAL4 (activation domain, AD) y pDEST32 contiene dominio de unión de GAL4 (binding domain, BD).

A continuación se presenta de forma breve el protocolo seguido:

Tras la generación del vector BD:AP2 este se transformó en la cepa de levadura PJ69-4 $\alpha$  y se llevó a cabo el test de autoactivación para comprobar si la proteína unida al BD poseía dominios de activación propios, que podría dar señal aunque no hubiera interacción con la proteína unida al AD. Como en este caso sí que hubo autoactivación, se hizo una prueba adicional añadiendo al medio concentraciones crecientes de 3AT (inhibe la síntesis de histidina) hasta eliminar la autoactivación.

Una vez que se conocía la concentración adecuada de 3AT para eliminar la autoactivación de AP2, se procedió a mating entre la levadura haploide PJ69-4 $\alpha$  que contenía BD:AP2 con la levadura haploide PJ69-4A que contenía el vector AD con los diferentes factores de transcripción presentes en la genoteca. Tras este paso se obtuvieron levaduras diploides que contenían ambos vectores AD:X y BD:AP2.

El siguiente paso fue el rastreo de interacciones, mediante el cultivo de las distintas levaduras diploides generadas en medio selectivo (YSD –His, -Leu, -Trp, +250mM 3AT).

- ✓ Ensayo de complementación Fluorescente Bimolecular (BiFC)

Con el ensayo de BiFC se pretendía comprobar si dos proteínas de interés interactuaban. Para ello se utilizaron los plásmidos de Gateway YFN43 y YFC43. Estos vectores contienen un promotor 35S por duplicado, la región N-terminal o C-terminal de la proteína YFP, un nexo de unión flexible entre la secuencia del gen de la YFP y la secuencia del gen de interés (que permite la movilidad de la proteína de fusión), el casete de Gateway (donde se clona el gen de interés) y un terminador. Para más información sobre estos vectores se puede consultar la página web <http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>.

Se clonó la región codificante de los genes de interés (AP2 y BP, genes cuya interacción queríamos testar, así como AP3 y PI, genes cuya interacción testada en múltiples trabajos nos serviría como control positivo del ensayo) en los vectores YFN43 e YFC43. Una vez obtenidas todas las construcciones se transformaron en la cepa de *Agrobacterium* C58.

3 días antes de la infiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana* se inocularon cultivos de 3mL de medio LB suplementado con los antibióticos apropiados a partir de un glicerinado de

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Agrobacterium* y se crecieron o/n a 28°C. Para el ensayo se incluyó además de los *Agrobacterium* transformados con los genes a testar, los controles positivo y negativo.

Como control positivo del ensayo se empleó la interacción AP3:YFP<sup>N</sup>-PI:YFP<sup>C</sup> y como control negativo la interacción FUL:YFP<sup>N</sup>-PI: YFP<sup>C</sup>. Las construcciones AP3:YFP<sup>N</sup> y PI: YFP<sup>C</sup> fueron generadas durante esta tesis y FUL:YFP<sup>N</sup> fue cedida por el doctor Vicente Balanzà.

Un día antes de la infiltración se inocularon cultivos de 50mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes a partir del cultivo fresco de 3mL anterior y se crecieron o/n a 28°C.

El día de la infiltración se transfirieron los cultivos de *Agrobacterium* a botes falcon de 50mL y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación y eliminación del sobrenadante se resuspendió el pelet en 10mL de solución de infiltración y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600nm y se realizó la dilución conveniente con solución de infiltración para ajustar todos los cultivos a una OD~1.

A continuación, los cultivos se incubaron horizontalmente y en oscuridad durante 3 horas, con agitación suave (50 rpm) y a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se prepararon las mezclas de cultivos para la infiltración añadiendo 5mL del cultivo "N" y 5 mL del cultivo "C" correspondiente.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* habían crecido unas 3 semanas en día largo, presentando aproximadamente 5 hojas. Posteriormente, y con la ayuda de jeringuillas de 2mL se realizó la infiltración de cada una de las mezclas en tres hojas de plantas diferentes. Las infiltraciones se realizaron en el envés de hojas jóvenes (normalmente la 3ª y 4ª hoja).

A los tres días de la infiltración se observaron las hojas en un microscopio confocal. Se tomaron secciones de las hojas agroinfiltradas y se montaron exponiendo el envés de la hoja, en un portaobjetos con MOBIO y cubierto por el cubreobjetos.

*Solución de infiltración:* 10mM MgCl<sub>2</sub>\*, 10mM MES pH 5.6 (autoclavado), 200µM acetosiringona\*.

\*Esterilizados por filtración.

## Técnicas microscópicas

### Microscopía óptica.

Antes de montar las muestras sobre portaobjetos, los ápices se diseccionaron con ayuda de una lupa binocular y agujas finas para dejar al descubierto el meristemo. Las muestras se colocaron sobre el portaobjetos y sobre ellas se añadió una gota de glicerol 50%. Para evitar que las muestras se aplastaran con el cubreobjetos se colocó en los extremos del portaobjetos unas pegatinas pequeñas de forma que quedara espacio entre el portaobjetos y el cubreobjetos. Las muestras fueron observadas con iluminación de campo claro, utilizando la técnica Normasky que permite detectar cierto volumen en las muestras.

Durante este trabajo se ha utilizado el sistema de microscopía óptica Nikon Eclipse E-600 acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) y un ordenador con el software de análisis de imagen AnalySIS 3.2 (Soft Imaging System) y NIS-Elements F3.0.

### Microscopía confocal.

Se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss Group, Jena, Alemania), consistente en un microscopio invertido Axio Observer.Z1 y una unidad espectral confocal con un detector GaAsp con 34 canales y 8 líneas de laser (405nm, 458nm, 488nm, 514nm, 561nm, 594nm y 633nm). La GFP se excitó con un láser de 488nm, y su emisión se recogió entre 500nm y 520nm (máximo de emisión: 509nm) y la YFP se excitó con un láser de 488 nm, y su emisión se recogió entre 520 nm y 540 nm (máximo de emisión a 529 nm). La clorofila se excitó con el mismo laser, y su emisión se recogió entre 660 nm y 690 nm. La identidad de la señal se confirmó en todos los casos mediante un barrido de longitudes de onda ( $\lambda$ -scan), para visualizar la intensidad de la emisión a las diferentes longitudes de onda.

### **Análisis fenotípico**

#### Fertilización cruzada.

Para realizar cruzamientos entre los diferentes genotipos de *Arabidopsis* o *Pisum sativum*, se emascularon las flores receptoras, con ayuda de unas pinzas cuando fue necesario, retirando todos los órganos excepto el pistilo, sobre el que se depositó el polen de las plantas donantes. Se esperó a que la silicua o la vaina se desarrollara y se secara por completo antes de recoger las semillas.

#### Recuento de semillas de Arabidopsis

El número de semillas que se forma va variando a lo largo de la inflorescencia. Por ello, para homogeneizar el recuento de semillas en todas las líneas transgénicas estudiadas, elegimos los frutos del 15 al 19 producidos en la inflorescencia principal. En los casos en los que alguno de esos frutos se hubiera caído o ya se hubiera abierto, cogimos el fruto más cercano cerrado.

#### Medida del área de la proyección de la circunferencia máxima de las semillas

Se realizó mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ. Para ello se tomaron fotografías de las semillas y posteriormente con este programa se ajustó la escala, se dibujó la circunferencia de las semillas, y se calculó el área.

#### Observación y fotografía a bajo aumento.

Para obtener imágenes a bajo aumento de los distintos rasgos fenotípicos se utilizó una cámara digital Leica V-LUX1. Para la obtención de imágenes a mayor aumento, se empleó una lupa binocular Nikon modelo SMZ800, provista de una unidad de iluminación externa de luz blanca fría (Volpi Intralux 4000-1) y conectada a una cámara digital CoolPix 5000 (Nikon) y el sistema de Nikon Digital Sight (DS-Fi1) en el que las fotos se capturan directamente en una pantalla digital acoplada a la cámara.

### Estudios de expresión

#### Detección GUS

Para realizar detecciones GUS poco precisas, en generaciones F1 y F2, por ejemplo para descartar las plantas que no fueran portadoras del gen delator, se utilizó un protocolo GUS rápido: Se incubaron ápices de inflorescencias posiblemente portadoras de construcciones con el gen marcador de la  $\beta$ -glucuronidasa durante la noche a 37°C y en oscuridad con una disolución 13.42mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, 11.58mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM X-Gluc, 2mM Ferrocianuro potásico, 2mM de ferricianuro potásico y 0.02% de Tritón X-100. Posteriormente las muestras se observaron a la lupa. En los casos donde la señal no se detectaba con claridad, las muestras se lavaron en etanol 70% durante 30 minutos antes de volver a observarlas a la lupa.

Para realizar detecciones GUS precisas se siguió el protocolo descrito por Kirsten Bomblies en el Manual de Arabidopsis (Pelletier *et al.*, 1997) pág. 243- 245 con algunas modificaciones. Los ápices e inflorescencias de plantas portadoras de construcciones con el gen testigo de la  $\beta$ -glucuronidasa se incubaron en acetona 90% durante 10 minutos en hielo. A continuación, se enjuagaron con agua y por último se incubaron en solución de revelado con sustrato (tampón fosfato sódico 25 mM pH 7; ferricianuro potásico 10 mM; ferrocianuro potásico 10 mM; Tritón-X100 0,25 mM y X-Gluc 2 mM) durante una noche a 37°C y en oscuridad. Las concentraciones elevadas de ferrocianuro y ferricianuro (ej. 10mM) restringen el nivel de señal GUS, mientras que concentraciones más bajas permiten detectar señal GUS más débil (Sessions *et al.*, 1999). Posteriormente se realizaron series de etanol 30% y 50% 30 minutos cada una. A continuación, se incubaron 30 minutos en FAE (composición) y se pasaron a 70% etanol y fueron almacenadas a 4°C hasta el momento de la observación. A continuación las muestras se aclararon con hidrato de cloral (próximo apartado) y se observaron y fotografiaron mediante un microscopio óptico.

#### Aclarado con Hidrato de cloral

Se utilizó el protocolo de Sioux Christensen (Pelletier *et al.*, 1997) con alguna modificación. Mediante este protocolo, se aclaran los tejidos vegetales, que se vuelven transparentes, permitiendo analizar la señal GUS mediante el uso de un microscopio. Es importante realizar todo el proceso en una campana de extracción de gases ya que el hidrato de cloral es tóxico. Una vez los ápices fueron fijados, incubados con el tampón de detección y deshidratados hasta etanol al 70% (apartado anterior), se quitó el etanol al 70% y se reemplazó con una disolución de hidrato de cloral: Hidrato de cloral/ glicerol/ agua (8g/1ml/2ml). Se mantuvo en esta disolución un día.

### Análisis estadístico

El ajuste de las segregaciones observadas de las líneas transgénicas a la segregación esperada si se hubiera producido una o más inserciones se realizó mediante la prueba estadística Chi<sup>2</sup>, con un nivel de significatividad del 0,05. Los datos obtenidos durante el análisis fenotípico se analizaron mediante la prueba estadística T-Student de dos colas y con un nivel de significatividad del 0,05. Previamente se comprobó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett (<http://home.ubalt.edu/ntsbarsh/Business-stat/otherapplets/BartletTest.htm>).

Cuando se realizó una comparación simultánea entre más de dos grupos se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc. Warrenton, VA) y cuando aparecieron diferencias significativas entre los grupos se aplicó una prueba de múltiples rangos con el procedimiento de menor diferencia significativa de Fisher (LSD) con un nivel de confianza del 95 %.





# **ANEXOS**



# ANEXO I

## Cebadores utilizados para la generación de construcciones

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido	Posición	Gen	Incluye sitio de restricción	Construcción	Propósito
AP2 SmaI	CCCGGGATGTGGGATC TAAACGACGCAC	F	ATG	AP2	SmaI	pTFL1::AP2 <sup>170</sup> y pTFL1:AP2m3	Amplificar CDS de AP2 o sus variantes
AP2 XbaI	TCTAGATCAAGAAGGT CTCATGAGAGG	R	STOP	AP2	XbaI	pTFL1::AP2 <sup>170</sup> y pTFL1:AP2m3	
oIMF 2	ACCAGAGGAAGCAGCT GCATTTGTCAACACTTG	R	sitio de unión del miR172	AP2	-	pTFL1::AP2m3	Generar variante alélica AP2m3
oIMF 3	CAAATGCAGCTGCTTC CTCTGGTTTCTCTCCTC ATCATACAATC	F	sitio de unión del miR172	AP2	-	pTFL1::AP2m3	
oIMF71	GGATCCGGCCGCAAAA CACCACAAAAC	F	-	MIM172	BamHI	pTFL1::MIM172	Amplificar secuencia de MIM172
oIMF72	ACTAGTGAAGAGGAAT TCACTATAAGA	R	-	MIM172	SpeI	pTFL1::MIM172	
FUL ClaI	ATCGATCTCGTTCGTA GTGGTAGGACG	R	726pb del ATG	FUL	ClaI	pTFL1::RNAi-FUL	Amplificación de 445pb de la secuencia de FUL
FUL HpaI	GTTAACACATGCTAAG CTCAAGGCAAG	F	282pb del ATG	FUL	HpaI	pTFL1::RNAi-FUL	
FUL KpnI	GGTACCCTCGTTCGTA GTGGTAGGACG	R	726pb del ATG	FUL	KpnI	pTFL1::RNAi-FUL	
FUL XbaI	TCTAGAACATGCTAAG CTCAAG	F	282pb del ATG	FUL	XbaI	pTFL1::RNAi-FUL	
oIMF18	TTTCCTTATCAAGCTGG GGTAC	R	intrón	-	-	pTFL1::RNAi-FUL	Secuenciación RNAi-FUL
A	CTG CAA GGC GAT TAA GTT GGG TAA C	F	-	-	-	amiRNA-FUL	Generar amiRNA-FUL partiendo Del plásmido RS300 que contiene el miR319a
B	GCGGATAACAATTTCA CACAGGAAACAG	R	-	-	-	amiRNA-FUL	
oIMF47: I miR S	GATGATAGCTTACGTA CATGCGTTCTCTCTTTT GTATTCC	F	-	-	-	amiRNA-FUL	
oIMF48: II miR-a	GAACGCATGTACGTAA GCTATCATCAAAGAGA ATCAATGA	R	-	-	-	amiRNA-FUL	
oIMF49: III miR*S	GAACACATGTACGTAT GCTATCTTCACAGGTC GTGATATG	F	-	-	-	amiRNA-FUL	
oIMF50: IV miR*a	GAAGATAGCATACGTA CATGTGTTCTACATATA TATTCT	R	-	-	-	amiRNA-FUL	
PI ATG	ATG GGT AGA GGA AAG ATC G	F	ATG	PI	-	PCR8:PI	Amplificar CDS PI
PI STOP	TCA ATC GAT GAC CAA AGA C	R	STOP	PI	-	PCR8:PI	
oIMF21	ATGGAAGAATACCAGC AT	F	ATG	BP	-	PCR8:BP	Amplificar CDS BP
oIMF22	TTATGGACCGAGACGA TA	R	STOP	BP	-	PCR8:BP	
YFN43	ATC CTG GGG CAC AAG CTG G	F	-	YFp-Nter	-	-	Secuenciación de plásmidos YFN43
YFC43	CGC CGC CGG GAT CAC TCT CG	F	-	YFp-Cter	-	-	Secuenciación de plásmidos YFC43

**Cebadores empleados para genotipar**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido	Gen/alelo
ful-2 F	CAAATGTTACACATTATAACATGTGAA	F	FUL/ <i>ful-2</i>
ful-2 R	GCCTTGAGCTTAGCATGTTCTAGGGCC	R	
oIMF 115	AACGGTAGTCCAAATCTTCGC	F	ETT/ <i>ett-13</i>
oIMF116	TCTGCTTTGAGAGCAGAGGAG	R	
LBb1-3	ATTTGCCGATTTCCGGAAC	R	T-DNA
#999 FOR2	TAAACCTTACATATTAACCGTACC	F	FULa
oIMF107: FULA Bst1107I Rev	TATTGGCAAGAATTTGTTTAGTATA	R	
4082 F <i>fulb</i> tilling	GATATGCATTGGTGTCAATC	F	FULb
4082 wt R Cfr 13I	TCAGTTTGCATGTTCTAGGTC	R	

**Cebadores empleados para Q-RT-PCR**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido	Gen	Referencia
oIMF 4	CAGCAGCAGCAAAATGCAATGAG	F	SNZ	Este trabajo
oIMF 5	CACCGATCGATTCAAACCCATGT	R		
oIMF 6	TATGATAAAGCGGCAATAAAGTGT	F	TOE3	Este trabajo
oIMF 7	AGGAATGCGGTAAGGGGAAG	R		
oIMF 8	TTTACTGGAACGGAGCATGC	F	TOE1	Este trabajo
oIMF 9	GTGTGGATAAAAGTAACCACGTGTT	R		
AP2 (2) qPCR	GGCTTCCAACCTCCTCTCATG	F	AP2	Este trabajo
AP2 (2) qPCR	CGATGATTAATGAAATGACCAAGAAC	R		
oIMF62	ACCGTACCTCGCATTACCCTT	F	GUS	(Fernandez-Nohales <i>et al.</i> , 2014)
oIMF63	CATCTGCCAGTCGAGCAT	R		
oIMF92	GTGAAAAGTGTGGAGAGAAGCAA	F	TIP41- like	(Czechowski <i>et al.</i> , 2005)
oIMF93	TCAACTGGATACCTTTTCGCA	R		

**Cebadores empleados para RT-PCR semicuantitativa**

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sentido	Gen
oIMF108	ATGAGGTCTTCAAGTGGTCT	F	AT1G54850
oIMF109	TCAGTCTTCGTAGTACACCT	R	
oIMF110	ATGAATATAACTAAGATGAAACTC	F	AT1G54790
oIMF111	CTTCCTCATAAAGCCTCTTGA	R	
oIMF112	ATGGATCAACAAGGACAATC	F	AT1G54830
oIMF113	CTAATTGTGAGGATCCTGCTG	R	
oIMF124	ATGAGTGATACAATGCCT	F	AT1G54840
oIMF125	TCCACGCTCTCATCAATC	R	
Vep33	CACTCCTGCCATGTATGTCGCTAT	F	AT3G12110 ( <i>Actina</i> )
Vep21	GCCAAAGCAGTGATCTCTTTGCTC	R	

## ANEXO II

Genotipado	Cebadores	Temperatura de hibridación	dCAPS enzima	Tamaño de banda esperada	
				mutante	silvestre
<i>ful-2</i>	ful-2 f ful-2 r	56°C	Apal	291 pb	263pb
<i>ett-13</i>	oIMF115 (LP) oIMF 116 (RP) LBb1-3	56°C	-	RP/LBb1-3 700 pb	LP/RP 1100 pb
<i>fula</i>	oIMF153 oIMF107	55°C	Bst1107I	340 pb	315pb
<i>fulb</i>	4082 F fulb tilling 4082 wt R Cfr13I	53°C	Cfr13I	340 pb	315 pb



# ANEXO III

## Construcciones:

### NOMBRE pIMF01: pGEM:AP2-170

**ORIGEN** Amplificación cDNA del mutante ap2-170 con oligos AP2-SmaI/AP2-XbaI

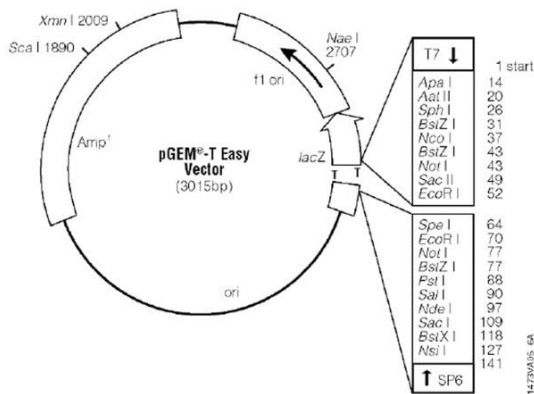
**PROPOSITO** Paso previo para clonar en pBGUS6(pB2.2-G-4.6, vector con promotor TFL1, Serrano-Mislata).

**VECTOR** pGEM T-Easy

**INSERTO** SmaI-AP2-XbaI (aprox.1300pb)

**CEPA** E coli JM110

**RESISTENCIA** Amp



### NOMBRE pIMF02: pGEM:FUL1

**ORIGEN** Amplificación cDNA FUL con oligos Ful-HpaI Ful-KpnI (secuencia no conservada de los MADS box)

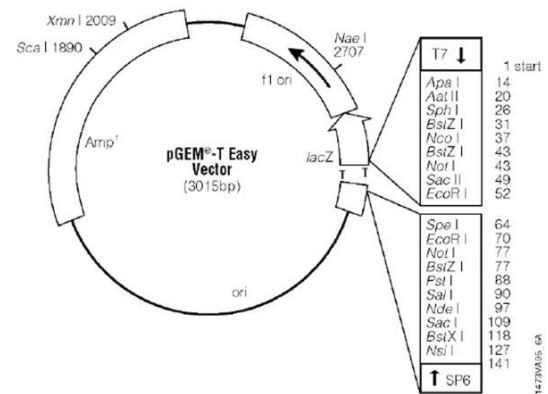
**PROPOSITO** Paso previo para donar en pHANNIBAL

**VECTOR** pGEMT-Easy

**INSERTO** HpaI-FUL-KpnI (aprox. 450 pb)

**CEPA** E. coli JM110

**RESISTENCIA** Amp



### NOMBRE pIMF03: pGEM:FUL2

**ORIGEN** Amplificación cDNA FUL con oligos FUL-XbaI y FUL-ClaI (secuencia no conservada de los MADS box)

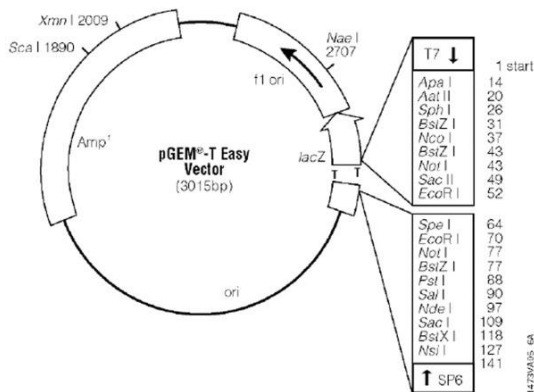
**PROPOSITO** Paso previo para clonar en pHANNIBAL

**VECTOR** pGEM T-Easy

**INSERTO** XbaI-FUL-ClaI (aprox. 450pb)

**CEPA** E. coli JM110

**RESISTENCIA** Amp



### NOMBRE pIMF04: pHANNIBAL:FUL1

**ORIGEN** Digestión de pIMF 2 (pGEM.FUL1) con EcoRI y KpnI

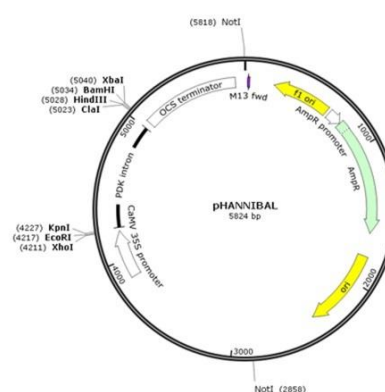
**PROPOSITO** Construcción hairpin RNAi. Paso previo a la clonación en pBGUS6 (vector con promotor TFL1)

**VECTOR** pHANNIBAL

**INSERTO** EcoRI-HpaI-FUL-KpnI (aprox. 450 pb)

**CEPA** E. coli EZ10

**RESISTENCIA** Amp



ANEXO III

**NOMBRE** pIMF05: pHANNIBAL:FUL1-FUL2

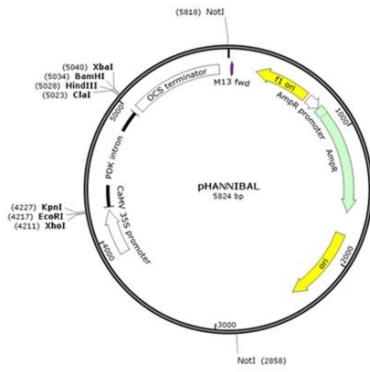
**ORIGEN** Digestión de pIMF 3 (pGEM:FUL2) con XbaI y ClaI

**PROPOSITO** Construcción hairpin RNAi. Paso previo a la donación en ppBGUS6 (vector con promotor TFL1)

**VECTOR** pIMF 4 (pHAN-FUL1)

**INSERTO** XbaI-FUL-ClaI (aprox 450pb)

**CEPA** E coli EZ10 **RESISTENCIA** Amp



**NOMBRE** pIMF06: pBIN:AP2-170 (pTFL1::AP2-170)

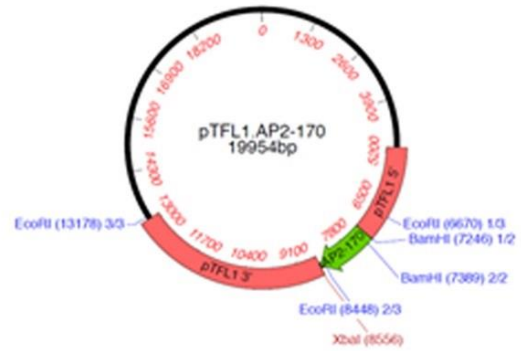
**ORIGEN** Digestión de pIMF1(pGEM:AP2-170) con SmaI y XbaI

**PROPOSITO** Transformación de Arabidopsis. Expresión del alelo AP2-170 solo en el SAM gracias al empleo del promotor de TFL1.

**VECTOR** p2.2-G-4.6 (promotor TFL1)

**INSERTO** AP2 (aprox.1300pb)

**CEPA** E coli EZ10 y Agro C58 **RESISTENCIA** Kan



**NOMBRE** pIMF07: pBIN:RNAi-FUL

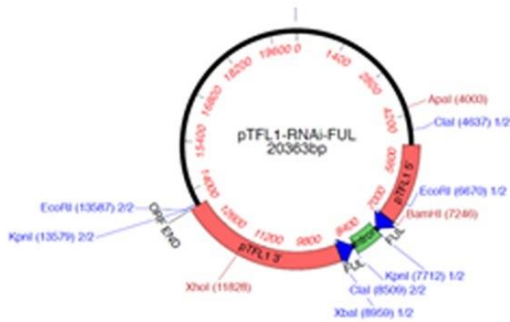
**ORIGEN** Digestión pIMF5 (Hanibal-FUL1-FUL2) con HpaI y XbaI

**PROPOSITO** Transformación de Arabidopsis. Expresión del RNAi anti FUL solo en el SAM gracias al empleo del promotor de TFL1.

**VECTOR** p2.2-G-4.6 (promotor TFL1)

**INSERTO** FUL5'-3'-intron-FUL3'-5' (aprox.1600pb)

**CEPA** E coli EZ10 y Agro C58 **RESISTENCIA** Kan



**NOMBRE** pIMF09: PCR8:PI

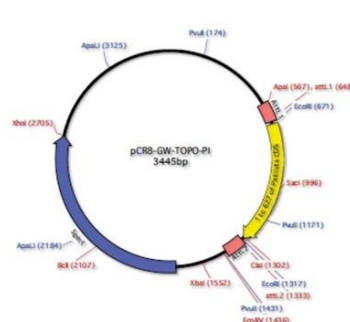
**ORIGEN** Amplificación cDNA PI desde ATG a STOP

**PROPOSITO** Paso previo para donar en vectores BIFC

**VECTOR** pCR8/GW/TOPO

**INSERTO** CDS PI (627pb)

**CEPA** E. coli EZ10 **RESISTENCIA** Spect





**NOMBRE** pIMF10: YFN43:PI

**ORIGEN** LR entre pCR8:PI y YFN43

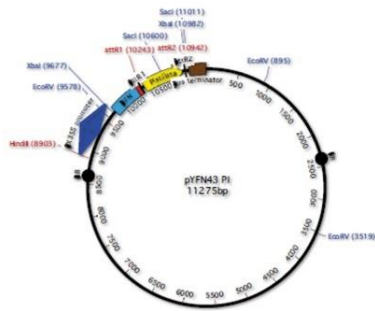
**PROPOSITO** BiFC

**VECTOR** YFN43

**INSERTO** CDS PI (627pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58

**RESISTENCIA** Kan o Amik



**NOMBRE** pIMF11: YFC43:PI

**ORIGEN** LR entre pCR8:PI y YFC43

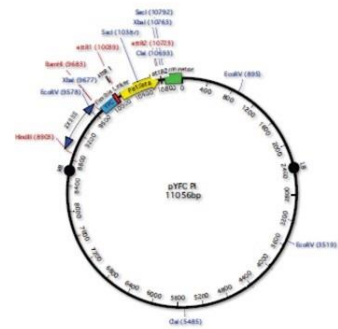
**PROPOSITO** BiFC

**VECTOR** YFC43

**INSERTO** CDS PI (627pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58

**RESISTENCIA** Kan o Amik



**NOMBRE** pIMF12: YFN43:AP3

**ORIGEN** LR entre pDONR201:AP3 (Regia) y YFN43

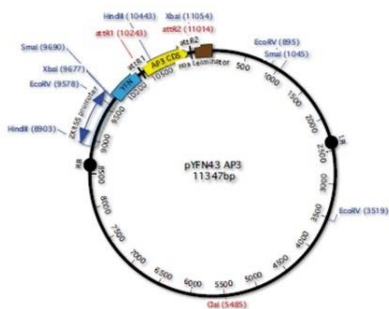
**PROPOSITO** BiFC

**VECTOR** YFN43

**INSERTO** CDS AP3

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58

**RESISTENCIA** Kan o Amik



**NOMBRE** pIMF13: YFC43:AP3

**ORIGEN** LR entre pDONR201:AP3 (Regia) y YFC43

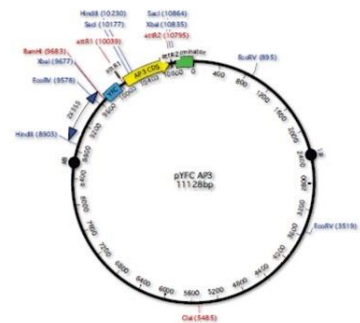
**PROPOSITO** BiFC

**VECTOR** YFC43

**INSERTO** CDS AP3

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58

**RESISTENCIA** Kan o Amik



## ANEXO III

### NOMBRE pIMF24: YFN43:AP2

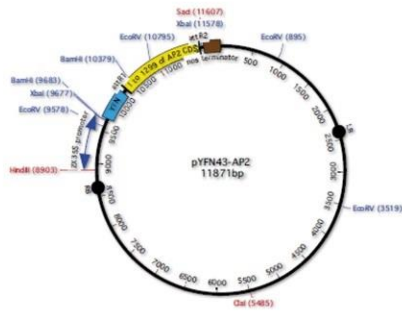
**ORIGEN** LR entre pCR8:AP2 (cedido por Balanzà) y YFN43

**PROPOSITO** BIFC

**VECTOR** YFN43

**INSERTO** AP2 CDS (1299pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58 **RESISTENCIA** Kan o Amik



### NOMBRE pIMF25: YFC43:AP2

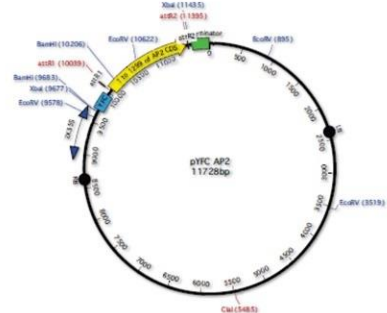
**ORIGEN** LR entre pCR8:AP2 (cedido por Balanzà) y YFC43

**PROPOSITO** BIFC

**VECTOR** YFC43

**INSERTO** AP2 CDS (1299pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58 **RESISTENCIA** Kan o Amik



### NOMBRE pIMF26: pCR8:BP

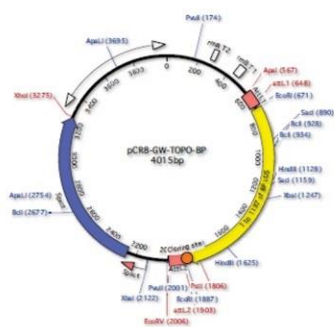
**ORIGEN** amplificación de cDNA BP desde ATG a STOP

**PROPOSITO** paso previo para clonar en vectores BIFC

**VECTOR** pCR8/GW/TOPO

**INSERTO** CDS BP (1197pb)

**CEPA** E.coli EZ10 **RESISTENCIA** Spectinomicina



### NOMBRE pIMF27: YFN43:BP

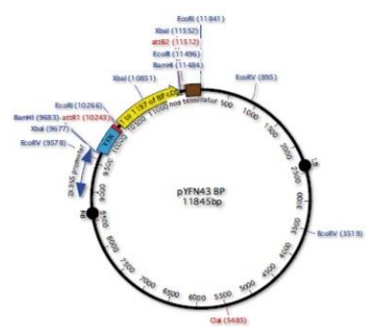
**ORIGEN** LR entre pCR8:BP y YFN43

**PROPOSITO** BIFC

**VECTOR** YFN43

**INSERTO** CDS BP (1197pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58 **RESISTENCIA** Kan o Amik



**NOMBRE** pIMF28: YFC43:BP

**ORIGEN** LR entre pCR8:BP y YFC43

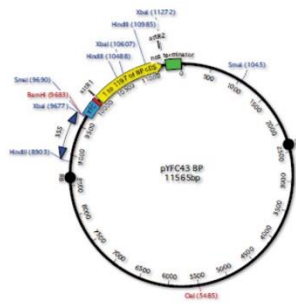
**PROPOSITO** BIFC

**VECTOR** YFC43

**INSERTO** CDS BP (1197pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agro C58

**RESISTENCIA** Kan o Amik



**NOMBRE** pIMF33: BD-AP2

**ORIGEN** LR entre pCR8:AP2 (cedido por Balanzà) y pDEST32

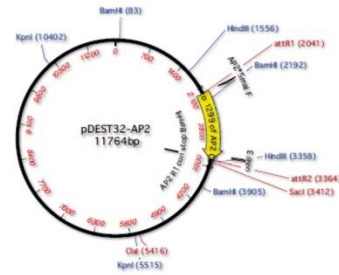
**PROPOSITO** Y2H contra la genoteca de factores de transcripción de Stefan de Folter

**VECTOR** pDEST32

**INSERTO** AP2 CDS (1299pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y levadura PJ69

**RESISTENCIA** Gentamicina -4alfa



**NOMBRE** pIMF34: AD-AP2

**ORIGEN** LR entre pCR8:AP2 (cedido por Balanzà) y pDEST22

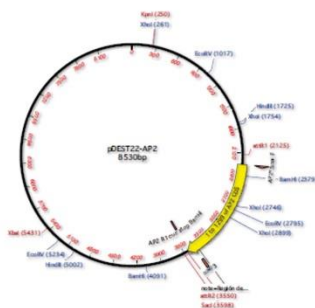
**PROPOSITO** Y2H contra la genoteca de factores de transcripción de Stefan de Folter

**VECTOR** pDEST22

**INSERTO** AP2 CDS (1299pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y levadura PJ69-4A

**RESISTENCIA** Ampicilina



**NOMBRE** pIMF35: FD:AP2-170

**ORIGEN** LR entre pCR8:AP2-170 (cedido por Balanzà) y pFK100 (promotor FD)

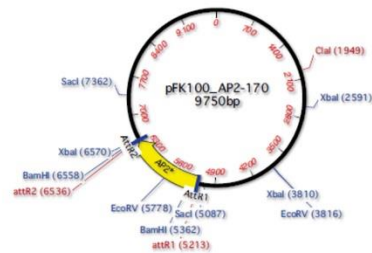
**PROPOSITO** Transformación de Arabidopsis. Expresión del alelo AP2-170 en todo SAM gracias al promotor FD

**VECTOR** pFK100

**INSERTO** AP2-170 (alelo parcialmente resistente al miR172)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58 PMP90 pSUP

**RESISTENCIA** Spect en bacteria, kan en planta



ANEXO III

**NOMBRE** pIMF37: pCR8:AP2m3

**ORIGEN** PCRs consecutivas usando como molde cDNA para generar el alelo AP2m3. PCR1 con oligos AP2SmaI/oIMF2; PCR2 con oligos AP2XbaI/oIMF3; PCR3 con oligos AP2SmaI/AP2XbaI.

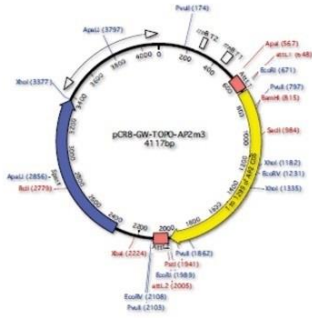
**PROPOSITO** Paso previo para clonar en vectores pTFL1 y pFD

**VECTOR** pCR8/GW/TOPO

**INSERTO** AP2m3 (1299 pb)

**CEPA** E. coli EZ10

**RESISTENCIA** Spect



**NOMBRE** pIMF38: TFL1:AP2m3

**ORIGEN** pIMF37 digerido con SmaI y XbaI para extraer el inserto AP2m3

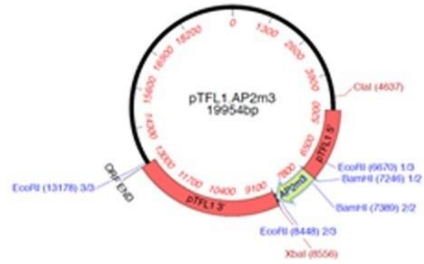
**PROPOSITO** Transformación de Arabidopsis. Expresión del alelo AP2m3 en el SAM gracias al promotor de TFL1

**VECTOR** p2.2-G-4.6 (promotor TFL1)

**INSERTO** AP2m3 (1299 pb)

**CEPA** E.coli EZ10 y Agrobacterium C58

**RESISTENCIA** Kan



**NOMBRE** pIMF39: FD:AP2m3

**ORIGEN** LR entre pIMF37 y pFK101

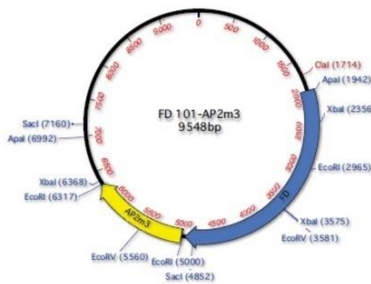
**PROPOSITO** Transformación de Arabidopsis. Expresión del alelo AP2m3 en todo el SAM gracias al promotor de FD.

**VECTOR** pFK101

**INSERTO** AP2m3 (1299 pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58 PMP90 pSUP

**RESISTENCIA** Spect en bacteria, basta en planta



**NOMBRE** pIMF40: pOpON-AP2-170

**ORIGEN** LR entre pCR8-AP2-170 (cedido por Balanzà) y pOpON 2.1

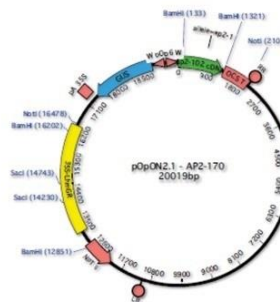
**PROPOSITO** Transformar Arabidopsis. Cuando las plantas se tratan con dexametasona se empezará a expresar el alelo AP2-170.

**VECTOR** pOpON 2.1

**INSERTO** AP2-170 (1299 pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58

**RESISTENCIA** Spect. (también Kan) en bacteria, kan en planta



**NOMBRE** pIMF41: pOpON-AP2-m3

**ORIGEN** LR entre pIMF37 y pOpON 2.1

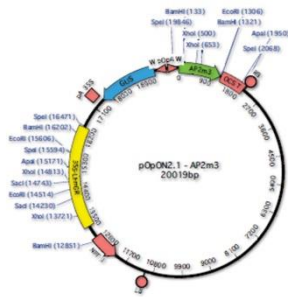
**PROPOSITO** Transformar Arabidopsis. Cuando las plantas se traten con dexametasona se empezará a expresar el alelo AP2m3.

**VECTOR** pOpON 2.1

**INSERTO** AP2m3 (1299 pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58

**RESISTENCIA** Spect. (también Kan) en bacteria, kan en planta



**NOMBRE** pIMF45: pCR8:amiR-FUL

**ORIGEN** PCRs consecutivas, utilizando como DNA molde miR319a.

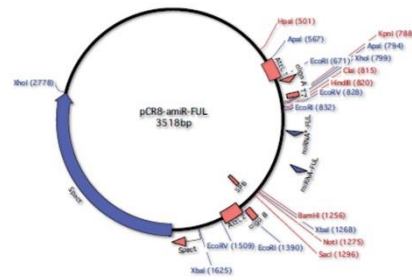
**PROPOSITO** Generar un amiRNA para reducir los niveles de expresión de FUL

**VECTOR** pCR8/GW/TOPO

**INSERTO** amiR FUL (701 pb)

**CEPA** E. coli EZ10

**RESISTENCIA** Spect



**NOMBRE** pIMF47: FD::amiR-FUL

**ORIGEN** LR entre pIMF45 y pFK101

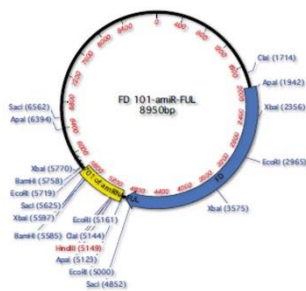
**PROPOSITO** silenciar FUL en el SAM

**VECTOR** pFK101

**INSERTO** amiR-FUL (701 pb)

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58 PMP90 pSUP

**RESISTENCIA** Spect en bacteria, basta en planta



**NOMBRE** pIMF48: FD::FUL-VP16

**ORIGEN** LR entre pCR8:FUL-VP16 (cedido por Balanzà) y pFK101

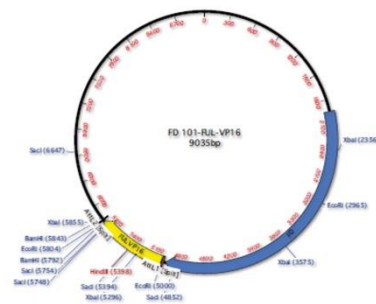
**PROPOSITO** expresar FUL:VP16 solo en el SAM

**VECTOR** pFK101

**INSERTO** FUL-VP16

**CEPA** E. coli EZ10 y Agrobacterium C58 PMP90 pSUP

**RESISTENCIA** Spect en bacteria, basta en planta





**ABREVIATURAS**

**3-AT:** 3-Amino-1,2,4-triazol

**A:** Adenina

**Arabidopsis:** *Arabidopsis thaliana*

**Aux:** Auxinas

**BiFC:** Complementación bimolecular de la fluorescencia

**C:** Citosina

**ChIP:** Inmunoprecipitación de la cromatina (*Chromatine Immuno Precipitation*)

**ChIP-seq:** ChIP acoplado a un proceso de secuenciación masiva

**CKs:** Citoquininas

**Col:** Ecotipo Columbia (Col-0)

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EMS:** Etilmetanosulfonato

**FC:** Tasa de cambio (Fold Change)

**FDR:** False Discovery Rate

**FM:** Meristemo floral (Floral Meristem)

**FPKM:** Fragmentos por millón de kilobases (Fragments Per Kilobase Million)

**G:** Guanina

**GAs:** Giberelinas

**GO:** Ontología Génica

**GPA:** Parada global de la proliferación (Global Proliferative Arrest)

**His:** Histidina

**LAM:** Microdissección asistida por láser

**Ler:** Ecotipo Landsberg erecta.

**Leu:** Leucina

**n.d.:** Datos no disponibles

**pb:** Pares de bases.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chair Reaction*)

**Q-RT-PCR:** PCR cuantitativa a tiempo real.

**RNA:** Ácido ribonucleico

**RNAi:** ARN de interferencia

**RNA<sub>m</sub>:** ARN mensajero.

**SAM:** Meristemo apical del tallo (*Shoot Apical Meristem*)

**SEA:** Análisis de Enriquecimiento Singular

**T:** Timina

**Trp:** Triptófano

**wt:** Plantas silvestres

**Y2H:** Ensayo de doble híbrido en levadura (Yeast Two Hybrid)





# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K. and Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.
- Aguilera-Alvarado, G. P. and Sanchez-Nieto, S. (2017). Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins. *Plant & cell physiology*.
- Albani, M. C. and Coupland, G. (2010). Chapter Eleven - Comparative Analysis of Flowering in Annual and Perennial Plants. In *Current Topics in Developmental Biology* (ed. C. P. T. Marja), pp. 323-348: Academic Press.
- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J. J., Ochando, I., Vera, A., Ferrandiz, C. and Martinez-Laborda, A. (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES1 gene. *Development* **134**, 2663-2671.
- Alonso Cantabrana, H. (2005). Caracterización de nuevas funciones génicas implicadas en el desarrollo del gineceo y la fructificación en Arabidopsis thaliana. *Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche*.
- Alvarez, J., Guli, C. L., Yu, X. H. and Smyth, D. R. (1992). terminal flower: a gene affecting inflorescence development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **2**, 103-116.
- Amasino, R. (2009). Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome biology* **10**, 228.
- Amy Litt (2007). An Evaluation of A-Function: Evidence from the APETALA1 and APETALA2 Gene Lineages. *International Journal of Plant Sciences* **168**, 73-91.
- Andriotis, V. M. E., Pike, M. J., Kular, B., Rawsthorne, S. and Smith, A. M. (2010). Starch turnover in developing oilseed embryos. *New Phytologist* **187**, 791-804.
- Aukerman, M. J. and Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant cell* **15**, 2730-2741.
- Axtell, M. J. and Bartel, D. P. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant cell* **17**, 1658-1673.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M. and Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.
- Balanzà, V. (2011). Nuevas funciones y dianas moleculares del factor de transcripción FRUITFULL en Arabidopsis thaliana. *Tesis doctoral. Universidad Politecnica de Valencia*.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Bemmer, M., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kauffmann, K., Angenent, G. C. and Ferrándiz, C. (2017). Genetic control of meristem arrest and life span in Arabidopsis by a novel FRUITFULL-APETALA2 pathway. *En revisión en Nature Communication*.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I. and Ferrándiz, C. (2014). Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *Journal of experimental botany* **65**, 1193-1203.
- Ball, S. G. and Morell, M. K. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual review of plant biology* **54**, 207-233.
- Ballester, P. and Ferrandiz, C. (2017). Shattering fruits: variations on a dehiscent theme. *Current opinion in plant biology* **35**, 68-75.
- Bar-Peled, M. and O'Neill, M. A. (2011). Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annual review of plant biology* **62**, 127-155.
- Barbier, P., Morishima, H. and Ishihama, A. (1991). Phylogenetic relationships of annual and perennial wild rice: probing by direct DNA sequencing. *Theoretical and Applied Genetics* **81**, 693-702.
- Barkoulas, M., Hay, A., Kougioumoutzi, E. and Tsiantis, M. (2008). A developmental framework for dissected leaf formation in the Arabidopsis relative Cardamine hirsuta. *Nature genetics* **40**, 1136-1141.
- Barrett, S. C. H., Harder, L. D. and Worley, A. C. (1996). The Comparative Biology of Pollination and Mating in Flowering Plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **351**, 1271-1280.

- Barton, M. K.** (2010). Twenty years on: the inner workings of the shoot apical meristem, a developmental dynamo. *Developmental biology* **341**, 95-113.
- Bartrina, I., Jensen, H., Novak, O., Strnad, M., Werner, T. and Schmullig, T.** (2017). Gain-of-Function Mutants of the Cytokinin Receptors AHK2 and AHK3 Regulate Plant Organ Size, Flowering Time and Plant Longevity. *Plant physiology* **173**, 1783-1797.
- Bartrina, I., Otto, E., Strnad, M., Werner, T. and Schmülling, T.** (2011). Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **23**, 69-80.
- Baud, S., Boutin, J.-P., Miquel, M., Lepiniec, L. and Rochat, C.** (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 151-160.
- Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci.* **316**, 1194-1199.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A. R., Tikunov, Y. M., Bovy, A. G., Wolters-Arts, M., Rossetto, P. d. B., Angenent, G. C. and de Maagd, R. A.** (2012). The Tomato FRUITFULL Homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 Regulate Ethylene-Independent Aspects of Fruit Ripening. *The Plant cell* **24**, 4437-4451.
- Bemer, M., van Mourik, H., Muiño, J. M., Ferrándiz, C., Kaufmann, K. and Angenent, G. C.** (2017). FRUITFULL controls SAUR10 expression and regulates *Arabidopsis* growth and architecture. *Journal of experimental botany*.
- Bemis, S. M., Lee, J. S., Shpak, E. D. and Torii, K. U.** (2013). Regulation of floral patterning and organ identity by *Arabidopsis* ERECTA-family receptor kinase genes. *Journal of experimental botany* **64**, 5323-5333.
- Bena, G., Lejeune, B., Prospero, J.-M. and Olivieri, I.** (1998). Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **265**, 1141-1151.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. and Madueno, F.** (2007). Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Annals of botany* **100**, 659-676.
- Bennett, A. B., Sweger, B. L. and Spanswick, R. M.** (1984). Sink to Source Translocation in Soybean. *Plant physiology* **74**, 434-436.
- Berbel, A., Ferrandiz, C., Hecht, V., Dalmais, M., Lund, O. S., Sussmilch, F. C., Taylor, S. A., Bendahmane, A., Ellis, T. H., Beltran, J. P., et al.** (2012). VEGETATIVE1 is essential for development of the compound inflorescence in pea. *Nature communications* **3**, 797.
- Berendzen, K., Searle, I., Ravenscroft, D., Koncz, C., Batschauer, A., Coupland, G., Somssich, I. E. and Ulker, B.** (2005). A rapid and versatile combined DNA/RNA extraction protocol and its application to the analysis of a novel DNA marker set polymorphic between *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Landsberg erecta. *Plant Methods* **1**, 4.
- Bergonzi, S. and Albani, M. C.** (2011). Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *Journal of experimental botany* **62**, 4415-4422.
- Bergonzi, S., Albani, M. C., Loren van Themaat, E. V., Nordström, K. J. V., Wang, R., Schneeberger, K., Moerland, P. D. and Coupland, G.** (2013). Mechanisms of Age-Dependent Response to Winter Temperature in Perennial Flowering of *Arabis alpina*. *Science* **340**, 1094-1097.
- Besnard, F., Refahi, Y., Morin, V., Marteaux, B., Brunoud, G., Chambrier, P., Rozier, F., Mirabet, V., Legrand, J., Laine, S., et al.** (2014). Cytokinin signalling inhibitory fields provide robustness to phyllotaxis. *Nature* **505**, 417-421.
- Bhatia, N., Bozorg, B., Larsson, A., Ohno, C., Jönsson, H. and Heisler, M. G.** Auxin Acts through MONOPTEROS to Regulate Plant Cell Polarity and Pattern Phyllotaxis. *Current Biology* **26**, 3202-3208.
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V. and Banerjee, A. K.** (2014). MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant

- architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant physiology* **164**, 1011-1027.
- Blázquez, M. A., Soowal, L. N., Lee, I. and Weigel, D.** (1997). LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development* **124**, 3835-3844.
- Bleecker, A. B. and Patterson, S. E.** (1997). Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **9**, 1169-1179.
- Bowman, J. L. and Eshed, Y.** (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in plant science* **5**, 110-115.
- Bowman, J. L., Smyth, D. R. and Meyerowitz, E. M.** (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**, 1-20.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. and Coen, E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**, 80-83.
- Brand, U., Fletcher, J. C., Hobe, M., Meyerowitz, E. M. and Simon, R.** (2000). Dependence of Stem Cell Fate in *Arabidopsis* on a Feedback Loop Regulated by CLV3 Activity. *Science* **289**, 617-619.
- Busch, M. A., Bomblies, K. and Weigel, D.** (1999). Activation of a Floral Homeotic Gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**, 585-587.
- Bustamante, M., Matus, J. T. and Riechmann, J. L.** (2016). Genome-wide analyses for dissecting gene regulatory networks in the shoot apical meristem. *Journal of experimental botany* **67**, 1639-1648.
- Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A. and Martienssen, R. A.** (2000). Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Byrne, M. E., Simorowski, J. and Martienssen, R. A.** (2002). ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1957-1965.
- Cao, S., Kumimoto, R. W., Gnesutta, N., Calogero, A. M., Mantovani, R. and Holt, B. F., 3rd** (2014). A distal CCAAT/NUCLEAR FACTOR Y complex promotes chromatin looping at the FLOWERING LOCUS T promoter and regulates the timing of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **26**, 1009-1017.
- Carles, C. C., Choffnes-Inada, D., Reville, K., Lertpiriyapong, K. and Fletcher, J. C.** (2005). ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **132**, 897-911.
- Cavell, A. C., Lydiate, D. J., Parkin, I. A., Dean, C. and Trick, M.** (1998). Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* **41**, 62-69.
- Clark, S. E., Williams, R. W. and Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89**, 575-585.
- Clough, S. J. and Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Coen, E. S. and Nugent, J. M.** (1994). Evolution of flowers and inflorescences. *Development* **1994**, 107-116.
- Conti, L. and Bradley, D.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant cell* **19**, 767-778.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Tsiantis, M. and Moore, I.** (2005). New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **41**, 899-918.
- Cress, W. D. and Triezenberg, S. J.** (1991). Critical structural elements of the VP16 transcriptional activation domain. *Science (New York, N.Y)* **251**, 87-90.
- Cruz-Mazo, G., Buide, M. L., Samuel, R. and Narbona, E.** (2009). Molecular phylogeny of *Scorzoneroides* (Asteraceae): Evolution of heterocarpy and annual habit in unpredictable environments. *Molecular phylogenetics and evolution* **53**, 835-847.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. and Scheible, W.-R.** (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant physiology* **139**, 5-17.
- Chen, M., Du, X. U. E., Zhu, Y., Wang, Z., Hua, S., Li, Z., Guo, W., Zhang, G., Peng, J. and Jiang, L.** (2012). Seed Fatty Acid Reducer acts downstream of gibberellin signalling pathway to lower seed fatty acid storage in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* **35**, 2155-2169.
- Chen, M. K., Wilson, R. L., Palme, K., Ditegou, F. A. and Shpak, E. D.** (2013). ERECTA family genes regulate auxin transport in the shoot apical meristem and forming leaf primordia. *Plant physiology* **162**, 1978-1991.
- Chen, X.** (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**, 2022-2025.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A. and Mao, L.** (2010). SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like Transcription Factors: Star Players for Plant Growth and Development. *Journal of integrative plant biology* **52**, 946-951.
- Chickarmane, V. S., Gordon, S. P., Tarr, P. T., Heisler, M. G. and Meyerowitz, E. M.** (2012). Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical–basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 4002-4007.
- Chuck, G., Meeley, R. B. and Hake, S.** (1998). The control of maize spikelet meristem fate by the APETALA2-like gene indeterminate spikelet1. *Genes & development* **12**, 1145-1154.
- Chung, M. Y., Vrebalov, J., Alba, R., Lee, J., McQuinn, R., Chung, J. D., Klein, P. and Giovannoni, J.** (2010). A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SIAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **64**, 936-947.
- Dalmis, M., Schmidt, J., Le Signor, C., Moussy, F., Burstin, J., Savoie, V., Aubert, G., Brunaud, V., de Oliveira, Y., Guichard, C., et al.** (2008). UTILdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome biology* **9**, R43.
- Datson, P. M., Murray, B. G. and Steiner, K. E.** (2008). Climate and the evolution of annual/perennial life-histories in *Nemesia* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **270**, 39-57.
- Davies, P. J. and Gan, S.** (2012). Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology* **59**, 467-478.
- de Folter, S. and Immink, R. G. H.** (2011). Yeast Protein–Protein Interaction Assays and Screens. In *Plant Transcription Factors: Methods and Protocols* (ed. L. Yuan & S. E. Perry), pp. 145-165. Totowa, NJ: Humana Press.
- Debernardi, J. M., Lin, H., Chuck, G., Faris, J. D. and Dubcovsky, J.** (2017). microRNA172 plays a crucial role in wheat spike morphogenesis and grain threshability. **144**, 1966-1975.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. and Yanofsky, M. F.** (2004). The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology* **14**, 1935-1940.
- Douglas, S. J., Chuck, G., Dengler, R. E., Pelecanda, L. and Riggs, C. D.** (2002). KNAT1 and ERECTA regulate inflorescence architecture in Arabidopsis. *The Plant cell* **14**, 547-558.
- Drews, G. N., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M.** (1991). Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell* **65**, 991-1002.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z. and Su, Z.** (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic acids research* **38**, W64-70.
- Engvild, K. C.** (1989). The death hormone hypothesis. *Physiologia Plantarum* **77**, 282-285.
- Eviatar-Ribak, T., Shalit-Kaneh, A., Chappell-Maor, L., Amsellem, Z., Eshed, Y. and Lifschitz, E.** (2013). A Cytokinin-Activating Enzyme Promotes Tuber Formation in Tomato. *Current Biology* **23**, 1057-1064.
- Fahlgren, N., Montgomery, T. A., Howell, M. D., Allen, E., Dvorak, S. K., Alexander, A. L. and Carrington, J. C.** (2006). Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA

- affects developmental timing and patterning in Arabidopsis. *Current biology : CB* **16**, 939-944.
- Fernandez-Nohales, P., Domenech, M. J., Martinez de Alba, A. E., Micol, J. L., Ponce, M. R. and Madueno, F.** (2014). AGO1 controls arabidopsis inflorescence architecture possibly by regulating TFL1 expression. *Annals of botany* **114**, 1471-1481.
- Ferrandiz, C. and Fourquin, C.** (2014). Role of the FUL-SHP network in the evolution of fruit morphology and function. *Journal of experimental botany* **65**, 4505-4513.
- Ferrandiz, C., Gu, Q., Martienssen, R. and Yanofsky, M. F.** (2000a). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**, 725-734.
- Ferrandiz, C., Liljegren, S. J. and Yanofsky, M. F.** (2000b). Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development. *Science* **289**, 436-438.
- Fiebig, A., Mayfield, J. A., Miley, N. L., Chau, S., Fischer, R. L. and Preuss, D.** (2000). Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long-chain lipid content on the surface of pollen and stems. *The Plant cell* **12**, 2001-2008.
- Figueroa, C. M. and Lunn, J. E.** (2016). A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant physiology* **172**, 7-27.
- Fletcher, J. C.** (2002). Shoot and floral meristem maintenance in arabidopsis. *Annual review of plant biology* **53**, 45-66.
- Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R. and Meyerowitz, E. M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911-1914.
- Focks, N. and 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.
- Fornara, F. and Coupland, G.** (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell* **138**, 625-627.
- Foucher, F., Morin, J., Courtiade, J., Cadioux, S., Ellis, N., Banfield, M. J. and Rameau, C.** (2003). DETERMINATE and LATE FLOWERING Are Two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS Homologs That Control Two Distinct Phases of Flowering Initiation and Development in Pea. *The Plant cell* **15**, 2742-2754.
- Fourquin, C., Primo, A., Martinez-Fernandez, I., Huet-Trujillo, E. and Ferrandiz, C.** (2014). The CRC orthologue from Pisum sativum shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development. *Annals of botany* **114**, 1535-1544.
- Franco-Zorrilla, J. M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M. I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J. A. and Paz-Ares, J.** (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature genetics* **39**, 1033-1037.
- Friedman, J. and Rubin, M. J.** (2015). All in good time: understanding annual and perennial strategies in plants. *American journal of botany* **102**, 497-499.
- Furner I, J. and Pumfrey, J. E.** (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana. *Development* **115**, 755-764.
- Galvao, V. C., Collani, S., Horrer, D. and Schmid, M.** (2015). Gibberellic acid signaling is required for ambient temperature-mediated induction of flowering in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **84**, 949-962.
- Gandikota, M., Birkenbihl, R. P., Hohmann, S., Cardon, G. H., Saedler, H. and Huijser, P.** (2007). The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *Plant J* **49**, 683-693.
- Godfray, H. C. J., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Nisbett, N., Pretty, J., Robinson, S., Toulmin, C. and Whiteley, R.** (2010). The future of the global food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 2769-2777.
- Goh, H. H., Sloan, J., Dorca-Fornell, C. and Fleming, A.** (2012). Inducible repression of multiple expansin genes leads to growth suppression during leaf development. *Plant physiology* **159**, 1759-1770.

- Gómez, L. D., Baud, S., Gilday, A., Li, Y. and Graham, I. A.** (2006). Delayed embryo development in the ARABIDOPSIS TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *The Plant Journal* **46**, 69-84.
- Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C. and Meyerowitz, E. M.** (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 16529-16534.
- Grbić, V. and Bleecker, A. B.** (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal* **8**, 595-602.
- Greenwood, J. R., Finnegan, E. J., Watanabe, N., Trevaskis, B. and Swain, S. M.** (2017). New alleles of the wheat domestication gene Q reveal multiple roles in growth and reproductive development. **144**, 1959-1965.
- Gregersen, P. L., Culetic, A., Boschian, L. and Krupinska, K.** (2013). Plant senescence and crop productivity. *Plant molecular biology* **82**, 603-622.
- Grennan, A. K.** (2006). Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant physiology* **142**, 1343-1345.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M. F. and Martienssen, R.** (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development. *Development* **125**, 1509-1517.
- Guo, Y., Han, L., Hymes, M., Denver, R. and Clark, S. E.** (2010). CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating Arabidopsis stem cell specification. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **63**, 889-900.
- Hackett, W. P.** (1985). Juvenility, Maturation, and Rejuvenation in Woody Plants. In *Horticultural Reviews*, pp. 109-155: John Wiley & Sons, Inc.
- Haecker, A., Gross-ardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. and Laux, T.** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 657-668.
- Haecker, A. and Laux, T.** (2001). Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Current opinion in plant biology* **4**, 441-446.
- Hake, S., Char, B. R., Chuck, G., Foster, T., Long, J. and Jackson, D.** (1995). Homeobox genes in the functioning of plant meristems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **350**, 45-51.
- Hecht, V., Knowles, C. L., Vander Schoor, J. K., Liew, L. C., Jones, S. E., Lambert, M. J. M. and Weller, J. L.** (2007). Pea LATE BLOOMER1 Is a GIGANTEA Ortholog with Roles in Photoperiodic Flowering, Deetiolation, and Transcriptional Regulation of Circadian Clock Gene Homologs. *Plant physiology* **144**, 648-661.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A. and Meyerowitz, E. M.** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current biology : CB* **15**, 1899-1911.
- Hellens, R. P., Allan, A. C., Friel, E. N., Bolitho, K., Grafton, K., Templeton, M. D., Karunairetnam, S., Gleave, A. P. and Laing, W. A.** (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant methods* **1**, 13.
- Hempel, F. D., Weigel, D., Mandel, M. A., Ditta, G., Zambryski, P. C., Feldman, L. J. and Yanofsky, M. F.** (1997). Floral determination and expression of floral regulatory genes in Arabidopsis. *Development* **124**, 3845-3853.
- Hensel L., Nelson M. A., Richmond T. A. and B., B. A.** (1994). The Fate of Inflorescence Meristems Is Controlled by Developing Fruits in Arabidopsis. *Plant physiology* **106**, 863-876.
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A. and Bleecker, A. B.** (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in Arabidopsis. *Plant Physiology* **106**, 863-876.



- Hepworth, S. R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A. and Coupland, G. (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by *CONSTANS* and *FLC* via separate promoter motifs. *The EMBO journal* **21**, 4327-4337.
- Hewitt, E. J. (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition.
- Hildebrand, F. H. G. (1881). *Die Lebensdauer und Vegetationsweise der Pflanzen, ihre Ursachen und ihre Entwicklung*.
- Hobe, M., Brand, U., Waites, R. and Simon, R. (2001). Control of cell fate in plant meristems. *Novartis Foundation symposium* **237**, 235-243; discussion 243-237.
- Hortensteiner, S. (2006). Chlorophyll degradation during senescence. *Annual review of plant biology* **57**, 55-77.
- Huang, L.-M., Lai, C.-P., Chen, L.-F. O., Chan, M.-T. and Shaw, J.-F. (2015). Arabidopsis *SFAR4* is a novel GDSL-type esterase involved in fatty acid degradation and glucose tolerance. *Botanical Studies* **56**, 33.
- Hunter, C., Willmann, M. R., Wu, G., Yoshikawa, M., de la Luz Gutierrez-Nava, M. and Poethig, S. R. (2006). Trans-acting siRNA-mediated repression of *ETTIN* and *ARF4* regulates heteroblasty in Arabidopsis. *Development* **133**, 2973-2981.
- Iniguez, L. P., Nova-Franco, B. and Hernandez, G. (2015). Novel players in the AP2-miR172 regulatory network for common bean nodulation. *Plant signaling & behavior* **10**, e1062957.
- Irish, V. F. and Sussex, I. M. (1992). A fate map of the Arabidopsis embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**, 745-753.
- Jarillo, J. A., Pineiro, M., Cubas, P. and Martinez-Zapater, J. M. (2009). Chromatin remodeling in plant development. *The International journal of developmental biology* **53**, 1581-1596.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P. and Tsiantis, M. (2005). *KNOX* action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current biology : CB* **15**, 1560-1565.
- Jaudal, M., Zhang, L., Che, C. and Putterill, J. (2015). Three Medicago *MtFUL* genes have distinct and overlapping expression patterns during vegetative and reproductive development and *35S:MtFULb* accelerates flowering and causes a terminal flower phenotype in Arabidopsis. *Frontiers in genetics* **6**, 50.
- Jeong, S., Trotochaud, A. E. and Clark, S. E. (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *The Plant cell* **11**, 1925-1934.
- Jeromela, A. M., Mikic, A. M., Vujic, S., Cupina, B., Krstic, D., Dimitrijevic, A., Vasiljevic, S., Mihailovic, V., Cvejic, S. and Miladinovic, D. (2017). Potential of Legume-Brassica Intercrops for Forage Production and Green Manure: Encouragements from a Temperate Southeast European Environment. *Frontiers in plant science* **8**, 312.
- Jofuku, K. D., den Boer, B. G., Van Montagu, M. and Okamoto, J. K. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2*. *The Plant cell* **6**, 1211-1225.
- Jofuku, K. D., Omidyar, P. K., Gee, Z. and Okamoto, J. K. (2005). Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3117-3122.
- José Ripoll, J., Bailey, L. J., Mai, Q.-A., Wu, S. L., Hon, C. T., Chapman, E. J., Ditta, G. S., Estelle, M. and Yanofsky, M. F. (2015). microRNA regulation of fruit growth. **1**, 15036.
- Jung, J.-H., Lee, H.-J., Ryu, Jae Y. and Park, C.-M. (2016). *SPL3/4/5* Integrate Developmental Aging and Photoperiodic Signals into the FT-FD Module in Arabidopsis Flowering. *Molecular plant* **9**, 1647-1659.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. and Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Developmental cell* **4**, 205-217.

- Keck, E., McSteen, P., Carpenter, R. and Coen, E.** (2003). Separation of genetic functions controlling organ identity in flowers. *The EMBO journal* **22**, 1058-1066.
- Keeley, J. E. and Bond, W. J.** (1999). Mast Flowering and Semelparity in Bamboos: The Bamboo Fire Cycle Hypothesis. *The American naturalist* **154**, 383-391.
- Kelly, M. O. and Davies, P. J.** (1988). Photoperiodic and genetic control of carbon partitioning in peas and its relationship to apical senescence. *Plant physiology* **86**, 978-982.
- Kelly, M. O., Davies, P. J. and Woolhouse, H. W.** (1988). The control of whole plant senescence. *Critical Reviews in Plant Sciences* **7**, 139-173.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B.** (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *The Plant cell* **18**, 560-573.
- Kim, H. J., Chiang, Y. H., Kieber, J. J. and Schaller, G. E.** (2013). SCF(KMD) controls cytokinin signaling by regulating the degradation of type-B response regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 10028-10033.
- Kirchberger, S., Tjaden, J. and Neuhaus, H. E.** (2008). Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **56**, 51-63.
- Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E. J., Hinze, A., Pisch, M., Javelle, M., Timmermans, M. C., Tucker, M. R. and Laux, T.** (2013). A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Developmental cell* **24**, 125-132.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962.
- Kodym, A. and Afza, R.** (2003). Physical and chemical mutagenesis. *Methods in molecular biology* **236**, 189-204.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986). The promoter of T L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**, 383-396.
- Koornneef, M., Van Eden, J., Hanhart, C., Stam, P., Braaksma, F. and Feenstra, W.** (1983). Linkage map of Arabidopsis thaliana. *Journal of Heredity* **74**, 265-272.
- Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S. C. and Lloyd, J. R.** (2010). Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current opinion in plant biology* **13**, 320-328.
- Krapp, S., Greiner, E., Amin, B., Sonnewald, U. and Krenz, B.** (2017). The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus. *Virus Research* **227**, 6-14.
- Krysan, P. J., Young, J. C. and Sussman, M. R.** (1999). T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The Plant cell* **11**, 2283-2290.
- Kumimoto, R. W., Siriwardana, C. L., Gayler, K. K., Risinger, J. R., Siefers, N. and Holt, B. F., 3rd** (2013). NUCLEAR FACTOR Y transcription factors have both opposing and additive roles in ABA-mediated seed germination. *PLoS one* **8**, e59481.
- Kumimoto, R. W., Zhang, Y., Siefers, N. and Holt, B. F., 3rd** (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **63**, 379-391.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H. and Kyojuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Kwon, C. S., Chen, C. and Wagner, D.** (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes & development* **19**, 992-1003.

- Kyozuka, J.** (2007). Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current opinion in plant biology* **10**, 442-446.
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., Garcia-Hernandez, M., et al.** (2012). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic acids research* **40**, D1202-1210.
- Langmead, B. and Salzberg, S. L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* **9**, 357-359.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J. and Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87-96.
- Law, J. A. and Jacobsen, S. E.** (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews. Genetics* **11**, 204-220.
- Leibfried, A., To, J. P., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J. J. and Lohmann, J. U.** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Lenhard, M., Bohnert, A., Jurgens, G. and Laux, T.** (2001). Termination of stem cell maintenance in Arabidopsis floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell* **105**, 805-814.
- Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**, 3195-3206.
- Leopold, A., Niedergang-Kamien, E. and Janick, J.** (1959). Experimental Modification of Plant Senescence. *Plant physiology* **34**, 570.
- Lewis, G. P.** (2005). *Legumes of the World*: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Li, B. and Dewey, C. N.** (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* **12**, 323.
- Li, J., Xiang, C.-Y., Yang, J., Chen, J.-P. and Zhang, H.-M.** (2015a). Interaction of HSP20 with a viral RdRp changes its sub-cellular localization and distribution pattern in plants. *Scientific reports* **5**, 14016.
- Li, L. and Sheen, J.** (2016). Dynamic and diverse sugar signaling. *Current opinion in plant biology* **33**, 116-125.
- Li, L., Zheng, W., Zhu, Y., Ye, H., Tang, B., Arendsee, Z. W., Jones, D., Li, R., Ortiz, D., Zhao, X., et al.** (2015b). QQS orphan gene regulates carbon and nitrogen partitioning across species via NF-YC interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 14734-14739.
- Li, Q., Wang, X., Sun, H., Zeng, J., Cao, Z., Li, Y. and Qian, W.** (2015c). Regulation of Active DNA Demethylation by a Methyl-CpG-Binding Domain Protein in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics* **11**, e1005210.
- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L. and Yanofsky, M. F.** (2000). SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* **404**, 766-770.
- Liljegren, S. J., Roeder, A. H., Kempin, S. A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D. K. and Yanofsky, M. F.** (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-853.
- Lim, P. O., Woo, H. R. and Nam, H. G.** (2003). Molecular genetics of leaf senescence in Arabidopsis. *Trends in plant science* **8**, 272-278.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K. and Hake, S.** (1994). A knotted1-like homeobox gene in Arabidopsis is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *The Plant cell* **6**, 1859-1876.
- Lindoo, S. J. and Noodén, L. D.** (1977). Studies on the behavior of the senescence signal in Anoka soybeans. *Plant physiology* **59**, 1136-1140.

- Liu, X., Dinh, T. T., Li, D., Shi, B., Li, Y., Cao, X., Guo, L., Pan, Y., Jiao, Y. and Chen, X.** (2014). AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **80**, 629-641.
- Lockhart, J. A. and Gottschall, V.** (1961). Fruit-induced & apical senescence in *Pisum sativum* L. *Plant physiology* **36**, 389-398.
- Lohmann, J. U., Hong, R. L., Hobe, M., Busch, M. A., Parcy, F., Simon, R. and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **105**, 793-803.
- Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I. and Barton, M. K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis*. *Nature* **379**, 66-69.
- Lukens, L., Zou, F., Lydiate, D., Parkin, I. and Osborn, T.** (2003). Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **164**, 359-372.
- Luo, Y., Guo, Z. and Li, L.** (2013). Evolutionary conservation of microRNA regulatory programs in plant flower development. *Developmental biology* **380**, 133-144.
- Mandel, T., Candela, H., Landau, U., Asis, L., Zelinger, E., Carles, C. C. and Williams, L. E.** (2016). Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways. *Development* **143**, 1612-1622.
- Mandel, T., Moreau, F., Kutsher, Y., Fletcher, J. C., Carles, C. C. and Eshed Williams, L.** (2014). The ERECTA receptor kinase regulates *Arabidopsis* shoot apical meristem size, phyllotaxy and floral meristem identity. *Development* **141**, 830-841.
- Maple, J. and Møller, S. G.** (2007). Mutagenesis in *Arabidopsis*. In *Circadian Rhythms: Methods and Protocols* (ed. E. Rosato), pp. 197-206. Totowa, NJ: Humana Press.
- Martin, C. and Smith, A. M.** (1995). Starch biosynthesis. *The Plant cell* **7**, 971.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Kuttner, F. and Schmid, M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* **17**, 1055-1060.
- Mathieu, J., Yant, L. J., Murdter, F., Kuttner, F. and Schmid, M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target SMZ. *PLoS Biol* **7**, e1000148.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G. and Laux, T.** (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**, 805-815.
- McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. and Henikoff, S.** (2000). Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant physiology* **123**, 439-442.
- Melzer, S., Lens, F., Gennen, J., Vanneste, S., Rohde, A. and Beckman, T.** (2008). Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics* **40**, 1489-1492.
- Meyer, R. S., DuVal, A. E. and Jensen, H. R.** (2012). Patterns and processes in crop domestication: an historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. *New Phytologist* **196**, 29-48.
- Miceli, F., Crafts-Brandner, S. J. and Egli, D. B.** (1995). Physical Restriction of Pod Growth Alters Development of Soybean Plants. *Crop Science* **35**, 1080-1085.
- Michaels, S. D., Ditta, G., Gustafson-Brown, C., Pelaz, S., Yanofsky, M. and Amasino, R. M.** (2003). AGL24 acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *The Plant Journal* **33**, 867-874.
- Mlotshwa, S., Yang, Z., Kim, Y. and Chen, X.** (2006). Floral patterning defects induced by *Arabidopsis* APETALA2 and microRNA172 expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant molecular biology* **61**, 781-793.
- Molisch, H.** (1938). *The longevity of plants*: Published By The Translator,: New York.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J.** (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**.
- Moose, S. P. and Sisco, P. H.** (1994). Glossy15 Controls the Epidermal Juvenile-to-Adult Phase Transition in Maize. *The Plant cell* **6**, 1343-1355.

- Muller, R., Bleckmann, A. and Simon, R.** (2008). The receptor kinase CORYNE of Arabidopsis transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *The Plant cell* **20**, 934-946.
- Murneek, A. E.** (1926). Effects of Correlation between Vegetative and Reproductive Functions in the Tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill.). *Plant physiology* **1**, 3-56 57.
- Mylne, J. S., Barrett, L., Tessadori, F., Mesnage, S., Johnson, L., Bernatavichute, Y. V., Jacobsen, S. E., Fransz, P. and Dean, C.** (2006). LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5012-5017.
- Ng, K. H., Yu, H. and Ito, T.** (2009). AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation. *PLoS biology* **7**, e1000251.
- Nilsson, L., Carlsbecker, A., Sundås-Larsson, A. and Vahala, T.** (2007). APETALA2 like genes from *Picea abies* show functional similarities to their Arabidopsis homologues. *Planta* **225**, 589-602.
- Noodén, L.** (1988). Senescence and Aging in Plants. *Academic Press*.
- Noodén, L. D. and Murray, B. J.** (1982). Transmission of the monocarpic senescence signal via the xylem in soybean. *Plant physiology* **69**, 754-756.
- Nova-Franco, B., Iniguez, L. P., Valdes-Lopez, O. and Alvarado-Affantranger, X.** (2015). The micro-RNA72c-APETALA2-1 node as a key regulator of the common bean-Rhizobium etli nitrogen fixation symbiosis. **168**, 273-291.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami, Y. and Matsubayash, Y.** (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.
- Ohto, M. A., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Nakamura, K. and Harada, J. J.** (2005). Control of seed mass by APETALA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3123-3128.
- Ohshima, K., Shinohara, H., Ogawa-Ohnishi, M. and Matsubayashi, Y.** (2009). A glycopeptide regulating stem cell fate in Arabidopsis thaliana. *Nature Chemical Biology* **5**, 578-580.
- Okushima, Y., Overvoorde, P. J., Arima, K., Alonso, J. M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J. R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., et al.** (2005). Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant cell* **17**, 444-463.
- Ortiz-Marchena, M. I., Albi, T., Lucas-Reina, E., Said, F. E., Romero-Campero, F. J., Cano, B., Ruiz, M. T., Romero, J. M. and Valverde, F.** (2014). Photoperiodic control of carbon distribution during the floral transition in Arabidopsis. *The Plant cell* **26**, 565-584.
- Pabón-Mora, N., Ambrose, B. A. and Litt, A.** (2012). Poppy APETALA1/FRUITFULL Orthologs Control Flowering Time, Branching, Perianth Identity, and Fruit Development. *Plant physiology* **158**, 1685-1704.
- Parenicova, L.** (2003). Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World. *The Plant Cell Online* **15**, 1538-1551.
- Parinov, S. and Sundaresan, V.** (2000). Functional genomics in Arabidopsis: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Current opinion in biotechnology* **11**, 157-161.
- Patel, D., Basu, M., Hayes, S., Majlath, I., Hetherington, F. M., Tschaplinski, T. J. and Franklin, K. A.** (2013). Temperature-dependent shade avoidance involves the receptor-like kinase ERECTA. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **73**, 980-992.
- Pekker, I., Alvarez, J. P. and Eshed, Y.** (2005). Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity. *The Plant cell* **17**, 2899-2910.
- Pelletier, M. K., Murrell, J. R. and Shirley, B. W.** (1997). Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in Arabidopsis. Further evidence for differential regulation of "early" and "late" genes. *Plant physiology* **113**, 1437-1445.

- Perales, M., Rodriguez, K., Snipes, S., Yadav, R. K., Diaz-Mendoza, M. and Reddy, G. V.** (2016). Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E6298-E6306.
- Petroni, K., Kumimoto, R. W., Gnesutta, N., Calvenzani, V., Fornari, M., Tonelli, C., Holt, B. F. and Mantovani, R.** (2012). The Promiscuous Life of Plant NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors. *The Plant cell* **24**, 4777-4792.
- Poethig, R. S.** (1990). Phase Change and the Regulation of Shoot Morphogenesis in Plants. *Science* **250**, 923-930.
- Preston, J. C. and Kellogg, E. A.** (2007). Conservation and divergence of APETALA1/FRUITFULL-like gene function in grasses: evidence from gene expression analyses. *The Plant Journal* **52**, 69-81.
- Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. and Davis, R. W.** (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. *Genes & development* **7**, 974-985.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L. D. and Coen, E.** (2007). Evolution and Development of Inflorescence Architectures. *Science* **316**, 1452-1456.
- Qian, W., Miki, D., Lei, M., Zhu, X., Zhang, H., Liu, Y., Li, Y., Lang, Z., Wang, J., Tang, K., et al.** (2014). Regulation of active DNA demethylation by an alpha-crystallin domain protein in Arabidopsis. *Molecular cell* **55**, 361-371.
- Raun, W. R. and Johnson, G. V.** (1999). Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production. *Agronomy Journal* **91**, 357-363.
- Redei, G. P. and Koncz, C.** (1992). Classical mutagenesis.
- Reinhardt, D., Pesce, E. R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J. and Kuhlemeier, C.** (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**, 255-260.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqumard, A. and Murray, J. A.** (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J. and Smyth, G. K.** (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140.
- Rodriguez, K., Perales, M., Snipes, S., Yadav, R. K., Diaz-Mendoza, M. and Reddy, G. V.** (2016). DNA-dependent homodimerization, sub-cellular partitioning, and protein destabilization control WUSCHEL levels and spatial patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E6307-E6315.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J.** (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Ann Rev Plant Biol* **57**.
- Ryu, J. Y., Lee, H. J., Seo, P. J., Jung, J. H., Ahn, J. H. and Park, C. M.** (2014). The Arabidopsis floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Molecular plant* **7**, 377-387.
- Sanchez-Rodriguez, C., Estevez, J. M., Llorente, F., Hernandez-Blanco, C., Jorda, L., Pagan, I., Berrocal, M., Marco, Y., Somerville, S. and Molina, A.** (2009). The ERECTA Receptor-Like Kinase Regulates Cell Wall-Mediated Resistance to Pathogens in Arabidopsis thaliana. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **22**, 953-963.
- Scofield, S., Dewitte, W., Nieuwland, J. and Murray, J. A.** (2013). The Arabidopsis homeobox gene SHOOT MERISTEMLESS has cellular and meristem-organisational roles with differential requirements for cytokinin and CYCD3 activity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **75**, 53-66.
- Scofield, S. and Murray, J. A. H.** (2006). KNOX Gene Function in Plant Stem Cell Niches. *Plant molecular biology* **60**, 929-946.

- Schmid, M., Uhlenhaut, N. H., Godard, F., Demar, M., Bressan, R., Weigel, D. and Lohmann, J. U. (2003). Dissection of floral induction pathways using global expression analysis. *Development* **130**, 6001-6012.
- Schubert, D., Clarenz, O. and Goodrich, J. (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Current opinion in plant biology* **8**, 553-561.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N. and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant cell* **18**, 1121-1133.
- Schwab, R., Palatnik, J. F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D. (2005). Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome. *Developmental cell* **8**, 517-527.
- Schwarz, S., Grande, A. V., Bujdoso, N., Saedler, H. and Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant molecular biology* **67**, 183-195.
- Semiarti, E., Ueno, Y., Tsukaya, H., Iwakawa, H., Machida, C. and Machida, Y. (2001). The ASYMMETRIC LEAVES2 gene of Arabidopsis thaliana regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves. *Development* **128**, 1771-1783.
- Serrano-Mislata, A. (2010). Análisis de la regulación transcripcional del gen TERMINAL FLOWER 1 de Arabidopsis. *Tesis doctoral. Universidad Politecnica de Valencia*.
- Sessions, A., Nemhauser, J. L., McColl, A., Roe, J. L., Feldmann, K. A. and Zambryski, P. C. (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. *Development* **124**, 4481-4491.
- Sessions, A., Weigel, D. and Yanofsky, M. F. (1999). The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *The Plant Journal* **20**, 259-263.
- Shani, E., Yanai, O. and Ori, N. (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current opinion in plant biology* **9**, 484-489.
- Shannon, S. and Meeks-Wagner, D. R. (1991). A mutation in the Arabidopsis TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *The Plant cell* **3**, 877-892.
- Shigyo, M., Hasebe, M. and Ito, M. (2006). Molecular evolution of the AP2 subfamily. *Gene* **366**, 256-265.
- Shpak, E. D. (2013). Diverse roles of ERECTA family genes in plant development. *Journal of integrative plant biology* **55**, 1238-1250.
- Shpak, E. D., Berthiaume, C. T., Hill, E. J. and Torii, K. U. (2004). Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development* **131**, 1491-1501.
- Shpak, E. D., McAbee, J. M., Pillitteri, L. J. and Torii, K. U. (2005). Stomatal Patterning and Differentiation by Synergistic Interactions of Receptor Kinases. *Science* **309**, 290-293.
- Sinclair, T. R. and de Wit, C. T. (1975). Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science* **189**, 565-567.
- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 49-81.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J. and Rolland, F. (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current opinion in plant biology* **13**, 274-279.
- Smith, H. M. and Hake, S. (2003). The interaction of two homeobox genes, BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE, regulates internode patterning in the Arabidopsis inflorescence. *The Plant cell* **15**, 1717-1727.
- Smyth, D. R., Bowman, J. L. and Meyerowitz, E. M. (1990). Early flower development in Arabidopsis. *The Plant cell* **2**, 755-767.
- Sohn, E. J., Rojas-Pierce, M., Pan, S., Carter, C., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Rojo, E., Surpin, M. and Raikhel, N. V. (2007). The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 18801-18806.

- Steeves, T. S., I** (1989). *Patterns in Plant Development*: Cambridge University Press.
- Streb, S. and Zeeman, S. C.** (2012). Starch metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **10**, e0160.
- Sun, B., Xu, Y., Ng, K. H. and Ito, T.** (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the Arabidopsis floral meristem. *Genes & development* **23**, 1791-1804.
- Sun, T., Goodman, H. M. and Ausubel, F. M.** (1992). Cloning the Arabidopsis GA1 Locus by Genomic Subtraction. *The Plant cell* **4**, 119-128.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.** (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & development* **9**, 1797-1810.
- Sung, S., He, Y., Eshoo, T. W., Tamada, Y., Johnson, L., Nakahigashi, K., Goto, K., Jacobsen, S. E. and Amasino, R. M.** (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in Arabidopsis thaliana requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nature genetics* **38**, 706-710.
- Sunkar, R. and Jagadeeswaran, G.** (2008). In silico identification of conserved microRNAs in large number of diverse plant species. *BMC plant biology* **8**, 37-37.
- Tang, Y., Liu, X., Liu, X., Li, Y., Wu, K. and Hou, X.** (2017). Arabidopsis NF-YCs Mediate the Light-Controlled Hypocotyl Elongation via Modulating Histone Acetylation. *Molecular plant* **10**, 260-273.
- Tani, E., Polidoros, A. N. and Tsiftaris, A. S.** (2007). Characterization and expression analysis of FRUITFULL- and SHATTERPROOF-like genes from peach (*Prunus persica*) and their role in split-pit formation. *Tree physiology* **27**, 649-659.
- Tank, D. C. and Olmstead, R. G.** (2008). From annuals to perennials: phylogeny of subtribe Castillejinae (Orobanchaceae). *American journal of botany* **95**, 608-625.
- Tariq, M. and Paszkowski, J.** (2004). DNA and histone methylation in plants. *Trends in genetics : TIG* **20**, 244-251.
- Teper-Bamnolker, P. and Samach, A.** (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves. *The Plant cell* **17**, 2661-2675.
- Thomas, H.** (2013). Senescence, ageing and death of the whole plant. *The New phytologist* **197**, 696-711.
- Thomas, H. and Smart, C. M.** (1993). Crops that stay green1. *Annals of Applied Biology* **123**, 193-219.
- Thomas, H., Thomas, H. M. and Ougham, H.** (2000). Annuality, perenniality and cell death. *Journal of experimental botany* **51**, 1781-1788.
- Timpte, C., Wilson, A. K. and Estelle, M.** (1994). The axr2-1 mutation of Arabidopsis thaliana is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* **138**, 1239-1249.
- Tiwari, M., Sharma, D. and Trivedi, P. K.** (2014). Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant molecular biology* **86**, 1-18.
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J. and Weigel, D.** (2010). A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in Arabidopsis thaliana. *PLoS genetics* **6**, e1001031.
- Torii, K. U.** (2012). Mix-and-match: ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond. *Trends in plant science* **17**, 711-719.
- Torii, K. U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F. and Komeda, Y.** (1996). The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *The Plant cell* **8**, 735-746.
- Triezenberg, S. J., Kingsbury, R. C. and McKnight, S. L.** (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev.* **2**, 718-729.
- Uchida, N., Shimada, M. and Tasaka, M.** (2012). Modulation of the balance between stem cell proliferation and consumption by ERECTA-family genes. *Plant signaling & behavior* **7**, 1506-1508.



- Uchida, N., Shimada, M. and Tasaka, M.** (2013). ERECTA-family receptor kinases regulate stem cell homeostasis via buffering its cytokinin responsiveness in the shoot apical meristem. *Plant & cell physiology* **54**, 343-351.
- Usami, T., Horiguchi, G., Yano, S. and Tsukaya, H.** (2009). The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty. *Development (Cambridge, England)* **136**, 955-964.
- Vaz Patto, M. C., Amarowicz, R., Aryee, J. I., Chung, H. J., Martín-Cabrejas, M. A. and Domoney, C.** (2015). Achievements and Challenges in Improving the Nutritional Quality of Food Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **34**, 105-143.
- Venglat, S. P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., Martienssen, R., Selvaraj, G. and Datla, R.** (2002). The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4730-4735.
- Ventriglia, T., Kuhn, M. L., Ruiz, M. T., Ribeiro-Pedro, M., Valverde, F., Ballicora, M. A., Preiss, J. and Romero, J. M.** (2008). Two *Arabidopsis* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits (APL1 and APL2) are catalytic. *Plant physiology* **148**, 65-76.
- Vernoux, T., Besnard, F. and Traas, J.** (2010). Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a001487.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J. E., Stitt, M. and Schmid, M.** (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **339**, 704-707.
- Wang, J. W.** (2014). Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *Journal of experimental botany* **65**, 4723-4730.
- Wang, J. W., Czech, B. and Weigel, D.** (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**, 738-749.
- Wang, J. W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E. and Weigel, D.** (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* **20**, 1231-1243.
- Wang, P., Cheng, T., Lu, M., Liu, G., Li, M., Shi, J., Lu, Y., Laux, T. and Chen, J.** (2016). Expansion and Functional Divergence of AP2 Group Genes in Spermatophytes Determined by Molecular Evolution and *Arabidopsis* Mutant Analysis. *Frontiers in plant science* **7**, 1383.
- Wang, T. and Woolhouse, H.** (1982). Growth regulators in plant senescence. *British Plant Growth Regulator Group Monograph* **8**: 5-25.
- Watkinson, A.** (1992). Plant senescence. *Trends in ecology & evolution* **7**, 417-420.
- Weber, C., Nover, L. and Fauth, M.** (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal* **56**, 517-530.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M., et al.** (2000). Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **122**, 1003-1013.
- Weigel, D. and Jurgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-754.
- Weigel, D. and Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**, 495-500.
- Weller, J. L., Batge, S. L., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J., Sineshchekov, V. A., Murfet, I. C. and Reid, J. B.** (2004). A Dominant Mutation in the Pea PHYA Gene Confers Enhanced Responses to Light and Impairs the Light-Dependent Degradation of Phytochrome A. *Plant physiology* **135**, 2186-2195.
- Weller, J. L., Hecht, V., Liew, L. C., Sussmilch, F. C., Wenden, B., Knowles, C. L. and Vander Schoor, J. K.** (2009). Update on the genetic control of flowering in garden pea. *Journal of experimental botany* **60**, 2493-2499.
- Weller, J. L., Reid, J. B., Taylor, S. A. and Murfet, I. C.** (1997). The genetic control of flowering in pea. *Trends in plant science* **2**, 412-418.

- Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierc, J., Samach, A. and Coupland, G.** (2006). CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of Arabidopsis. *The Plant cell* **18**, 2971-2984.
- Werner, S., Wollmann, H., Schneeberger, K. and Weigel, D.** (2010). Structure determinants for accurate processing of miR172a in Arabidopsis thaliana. *Current biology : CB* **20**, 42-48.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., et al.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **27**, 581-590.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U. and Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science* **309**, 1056-1059.
- Wilson, J. B.** (1997). An evolutionary perspective on the 'death hormone' hypothesis in plants. *Physiologia Plantarum* **99**, 511-516.
- Willmann, M. R. and Poethig, R. S.** (2007). Conservation and evolution of miRNA regulatory programs in plant development. *Current opinion in plant biology* **10**, 503-511.
- Wingler, A. and Roitsch, T.** (2008). Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses. *Plant biology* **10**, 50-62.
- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J. A. and Weigel, D.** (2010). On reconciling the interactions between APETALA2, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development* **137**, 3633-3642.
- Wood, C. C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W. J., Dennis, E. S. and Helliwell, C. A.** (2006). The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14631-14636.
- Woolhouse, H. W.** (1983). Hormonal control of senescence allied to reproduction in plants. *Strategies of Plant Reproduction (Beltsville Symposia in Agricultural Research)*, 201-236.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D. and Poethig, R. S.** (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell* **138**, 750-759.
- Wu, G. and Poethig, R. S.** (2006). Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target SPL3. *Development* **133**, 3539-3547.
- Wu, X., Dabi, T. and Weigel, D.** (2005). Requirement of homeobox gene STIMPY/WOX9 for Arabidopsis meristem growth and maintenance. *Current biology : CB* **15**, 436-440.
- Wuest, S. E., Philipp, M. A., Guthorl, D., Schmid, B. and Grossniklaus, U.** (2016). Seed Production Affects Maternal Growth and Senescence in Arabidopsis. *Plant physiology* **171**, 392-404.
- Wurschum, T., Gross-Hardt, R. and Laux, T.** (2006). APETALA2 regulates the stem cell niche in the Arabidopsis shoot meristem. *The Plant cell* **18**, 295-307.
- Xiong, Y. and Sheen, J.** (2012). Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 2836-2842.
- Xu, M., Hu, T., Smith, M. R. and Poethig, R. S.** (2015). Epigenetic regulation of vegetative phase change in Arabidopsis. *The Plant cell*, TPC2015-00854-RA.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Girke, T., Jonsson, H. and Reddy, G. V.** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes & development* **25**, 2025-2030.
- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S. and Wagner, D.** (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Dev Cell* **17**, 268-278.
- Yan, X., Zhang, L., Chen, B., Xiong, Z., Chen, C., Wang, L., Yu, J., Lu, C. and Wei, W.** (2012). Functional identification and characterization of the Brassica napus transcription factor gene BnAP2, the ortholog of Arabidopsis thaliana APETALA2. *PloS one* **7**, e33890.

- Yanai, O., Shani, E., Dolezal, K., Tarkowski, P., Sablowski, R., Sandberg, G., Samach, A. and Ori, N. (2005). Arabidopsis KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Current biology : CB* **15**, 1566-1571.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J. and Poethig, R. S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in Arabidopsis thaliana by repressing the expression of MIR156A and MIR156C. *eLife* **2**, e00260.
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X. and Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. *The Plant cell* **22**, 2156-2170.
- Young, T. P. and Augspurger, C. K. (1991). Ecology and evolution of long-lived semelparous plants. *Trends in ecology & evolution* **6**, 285-289.
- Younis, A., Siddique, M. I., Kim, C. K. and Lim, K. B. (2014). RNA Interference (RNAi) Induced Gene Silencing: A Promising Approach of Hi-Tech Plant Breeding. *International journal of biological sciences* **10**, 1150-1158.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., Wu, J., Huang, J., Wang, G. and Wang, J.-W. (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *eLife* **2**, e00269.
- Yu, S. M., Lo, S. F. and Ho, T. H. D. (2015). Source-Sink Communication: Regulated by Hormone, Nutrient, and Stress Cross-Signaling. *Trends in plant science* **20**, 844-857.
- Yu, T. S., Kofler, H., Hausler, R. E., Hille, D., Flugge, U. I., Zeeman, S. C., Smith, A. M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., et al. (2001). The Arabidopsis sex1 mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant cell* **13**, 1907-1918.
- Yu, Y., Ji, L., Le, B. H., Zhai, J., Chen, J., Luscher, E., Gao, L., Liu, C., Cao, X., Mo, B., et al. (2017). ARGONAUTE10 promotes the degradation of miR165/6 through the SDN1 and SDN2 exonucleases in Arabidopsis. **15**, e2001272.
- Zeeman, S. C. and Rees, T. A. (1999). Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of Arabidopsis. *Plant, cell & environment* **22**, 1445-1453.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M. and Smith, A. M. (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochemical Journal* **401**, 13-28.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. (2006). Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Developmental biology* **289**, 3-16.
- Zhao, H., Wu, D., Kong, F., Lin, K., Zhang, H. and Li, G. (2016). The Arabidopsis thaliana Nuclear Factor Y Transcription Factors. *Frontiers in plant science* **7**, 2045.
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T. and Chen, X. (2007). miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**, 840-849.
- Zhao, Y., Medrano, L., Ohashi, K., Fletcher, J. C., Yu, H., Sakai, H. and Meyerowitz, E. M. (2004). HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in Arabidopsis. *The Plant cell* **16**, 2586-2600.
- Zhao, Y., Xie, S., Li, X., Wang, C., Chen, Z., Lai, J. and Gong, Z. (2014). REPRESSOR OF SILENCING5 Encodes a Member of the Small Heat Shock Protein Family and Is Required for DNA Demethylation in Arabidopsis. *The Plant cell* **26**, 2660-2675.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J. and Lohmann, J. U. (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-1092.
- Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Wang, X., Yu, S., Lian, H., Tang, H., Feng, Z.-Y., Zozomova-Lihová, J. and Wang, J.-W. (2013). Molecular basis of age-dependent vernalization in Cardamine flexuosa. *Science* **340**, 1097-1100.
- Zhou, Y., Honda, M., Zhu, H., Zhang, Z., Guo, X., Li, T., Li, Z., Peng, X., Nakajima, K., Duan, L., et al. (2015). Spatiotemporal Sequestration of miR165/166 by Arabidopsis Argonaute10 Promotes Shoot Apical Meristem Maintenance. *Cell reports* **10**, 1819-1827.

## BIBLIOGRAFÍA

- Zhu, Q.-H. and Helliwell, C. A.** (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *Journal of experimental botany* **62**, 487-495.
- Zhu, Y.-X. and Davies, P. J.** (1997). The control of apical bud growth and senescence by auxin and gibberellin in genetic lines of peas. *Plant physiology* **113**, 631-637.
- Zumajo-Cardona, C. and Pabón-Mora, N.** (2016). Evolution of the APETALA2 Gene Lineage in Seed Plants. *Molecular biology and evolution* **33**, 1818-1832.
- Zuniga-Mayo, V. M., Marsch-Martinez, N. and de Folter, S.** (2012). JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **71**, 314-326.

