



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Eduardo Burillo Richart

**Caracterización de diferentes alelos de los genes *SNZ*, *TOE3* y *AP2* resistentes a la regulación por miR172 en la parada global de la proliferación y la dehiscencia de los frutos en *Arabidopsis thaliana***

Trabajo tutorizado por: Dr. Vicente Balanzá Pérez y Dra. Cristina Ferrándiz Maestre

Departamento Genética molecular del desarrollo de frutos y carpelos

Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas

2018-2019

# ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>2</b>
2.1. Arabidopsis thaliana como sistema modelo.....	2
2.1.1. Funcionamiento y control genético de la actividad del meristemo apical del tallo en Arabidopsis thaliana.....	3
2.1.1.1. Parada Global de la Proliferación.....	4
2.1.2. Desarrollo de flores y frutos.....	7
2.1.2.1. Control genético del desarrollo de flores y frutos.....	9
2.1.3. La familia APETALA2.....	12
<b>3. Antecedentes y Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Materiales y Métodos .....</b>	<b>16</b>
4.1. Cultivo de Escherichia coli.....	16
4.1.1. Cultivo líquido de Escherichia coli.....	16
4.1.1.1. Suplementación de antibióticos a medio LB.....	16
4.1.1.2. Cultivo sólido de Escherichia coli.....	16
4.2. Cultivo de Agrobacterium tumefaciens.....	16
4.2.1. Cultivo líquido y cultivo sólido de Agrobacterium tumefaciens.....	16
4.3. Cultivo y manipulación de los microorganismos.....	16
4.3.1. Condiciones de cultivo para los microorganismos.....	16
4.3.2. Transformación de los microorganismos.....	17
4.4. Cultivo de Arabidopsis thaliana.....	17
4.4.1. Siembra en maceta.....	17
4.4.2. Recolección de semillas.....	17
4.4.3. Transformación mediante agroinfiltración.....	18
4.4.4. Fijación de tejido vegetal.....	18
4.5. Manipulación de ácidos nucleicos.....	19
4.5.1. Síntesis de oligonucleótidos.....	19
4.5.2. Moldes utilizados para amplificación por PCR.....	19
4.5.2.1. Extracción de ADNg.....	19
4.5.2.2. Obtención de ADNc.....	19
4.5.2.3. Obtención de ADNc.....	21
4.5.3. Amplificación por PCR.....	21
4.5.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	23
4.5.5. Aislamiento y Purificación de ADN.....	23
4.5.5.1. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	23
4.5.5.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de reacciones de PCR.....	23

4.5.5.3. Aislamiento de ADN plasmídico de E. Coli y A. Tumefaciens .....	23
4.5.5.4. Comprobación y verificación de las secuencias genómicas.....	23
4.5.6. Digestión de ADN plasmídico .....	24
4.5.7. Clonación de las secuencias génicas .....	24
4.5.7.1. Clonación en pCR8/TOPO/GW .....	24
4.5.7.2. Clonación mediante el sistema de clonaje múltiple GoldenBraid.....	24
4.5.7.3. Clonación mediante el Sistema Gateway .....	26
4.5.8. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN.....	27
4.6. Técnicas de microscopía e histología.....	27
4.6.1. Inclusión en parafina.....	27
4.6.2. Cortes histológicos de los bloques de parafina .....	28
4.6.3. Tinción de lignina con Floroglucinol.....	28
4.7. Selección de plantas transgénicas .....	28
4.8. Toma de fotografías .....	28
<b>5. Resultados y Discusión .....</b>	<b>29</b>
5.1. Generación de diferentes alelos de TOE3 y SNZ resistentes a la regulación por miR172 .....	29
5.2. Caracterización de líneas de sobreexpresión de diferentes alelos de TOE3, SNZ y AP2.....	31
5.3. Generación de herramientas para la caracterización del papel de TOE3 y SNZ en el GPA. ....	37
5.4. Generación de herramientas para la caracterización del papel de TOE3, SNZ y AP2 en el desarrollo del margen de valva. ....	41
<b>6. Conclusiones y proyección futura .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación gráfica del meristemo de <i>Arabidopsis thaliana</i> . En la figura se muestran la CZ, la PZ y la RZ, así como los agrupamientos celulares L1, L2 y L3 de la PZ. En color azul, se muestra la expresión de CLV3, y en color rojo y verde se muestran la expresión de WUS, y CVL1 respectivamente en el OC. En verde y amarillo, se muestra como ejemplo la expresión de dos genes necesarios para el desarrollo del primordio de la hoja, KANADI y HD-ZIP III. (Boscá et al., 2001 con modificaciones).....	4
Figura 2.- Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA. (Balanzà et al., 2018).....	6
Figura 3.- Representación gráfica de diferentes partes del fruto de <i>Arabidopsis thaliana</i> . (A) Fruto completamente elongado. (B, C) Sección trasversal de fruto en estado de desarrollo 17. (C) Tinción con azul de safranina para observar la acumulación de lignina (color rojizo). v, valva; r, replum; vm, margen de valva; ex, exocarpo; m, mesocarpo; Enb, epidermis interna; Ena, capa subepidérmica; se, semilla; lml, zona marginal lignificada; sl, zona de separación. (Robles and Pelaz, 2005).....	9
Figura 4.- Representación gráfica de diferentes rutas de control genético en el desarrollo del fruto. LL, zona marginal lignificada; SL, capa de separación. Se muestra el gen APETALA2 (AP2), del que se hablará posteriormente en este trabajo (Ripoll et al., 2011).....	11
Figura 5.- Representación de la secuencia de reconocimiento del miR172 en diferentes alelos AP2 y AP2-like. Se ha utilizado un color específico para cada base a fin de resaltar las variaciones entre los diferentes genes. Así mismo, se ha utilizado el color rojo para resaltar una guanina que se encuentra muy conservada en la secuencia de reconocimiento del miR172 en todos los genes. A modo de ejemplo, se ha utilizado la secuencia genómica de AP2, estando representado en color carne los extremos 3' UTR y 5'UTR, en recuadros azules los exones, y en color rojo el sitio de reconocimiento del miR172. ....	13
Figura 6.- Versiones mutantes generadas de los genes TOE3 y SNZ. Se ha representado también AP2 <sup>wt</sup> y AP2 <sup>170</sup> como referencia. Las barras azules representan la CDS de los diferentes genes y la barra roja el sitio de reconocimiento del miR172. ....	32
Figura 7.- Representación gráfica del PCR8 y el pEarleyGate100. La CDS hace referencia a cada una de las versiones mutantes generadas, representadas en la Figura 6. Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios attL y attB previos y posteriores a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias. ....	33
Figura 8.- Retraso en la floración provocado por la sobreexpresión de SNZ <sub>tuncada</sub> SNZ <sub>m3</sub> y AP2 <sup>170</sup> Se ha utilizado una fotografía correspondiente a plantas 35S: SNZ <sub>tuncada</sub> como ejemplo. Con una flecha amarilla se muestra una planta con	

fenotipo de retraso de floración leve. Con una roja, aquella con fenotipo medio. Y con una flecha azul, una planta con fenotipo fuerte.....	33
Figura 9.- Modificación del patrón normal del desarrollo de la flor. (A) Control silvestre (B) Sobreexpresión de la versión mutante SNZ <sub>truncada</sub> (C) Sobreexpresión de la versión mutante SNZ <sub>m3</sub> (D) Sobreexpresión de la versión mutante AP2 <sub>m3</sub> <sup>170</sup> . Hemos clasificado los fenotipos en tres intensidades diferentes, representadas en la figura con números de color amarillo. Se indica la intensidad de los fenotipos: leve, medio, fuerte. ....	34
Figura 10.- Distribución fenotípica para el tiempo de floración y el desarrollo floral. Se ha representado el porcentaje de plantas con cada fenotipo con respecto al total.....	35
Figura 11.- Aumento de la actividad meristemática en las líneas de sobreexpresión de los diferentes alelos mutantes de SNZ y AP2 .....	37
Figura 12.- Representación gráfica vector final de expresión. La CDS hace referencia a cada una de las versiones mutantes generadas, representadas en la Figura 6. Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios attB posteriores a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias. ....	38
Figura 13.- Plantas transgénicas con expresión específica en el SAM del alelo silvestre se SNZ y la versión TOE3 <sub>m3</sub> . Planta silvestre como control. ....	39
Figura 14.- Número de flores producidas en la inflorescencia principal. Se han representado los resultados con las plantas individuales de las plantas con el transgén, y una media de 24 plantas para el control silvestre.....	40
Figura 15.- Representación gráfica de los diferentes miR172. Se han utilizado colores para resaltar los cambios de secuencia que se dan entre ellos.....	41
Figura 16.- Representación de los vectores intermediarios generados: pUPD (A), pDGB3 $\alpha$ 2 (B) y pDGB3 $\Omega$ 1 (C). Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios attR previos a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias. Los vectores finales de expresión no se representarán, pues son idénticos a los vectores intermediarios (C), pero sustituyendo el sitio Gateway por las diferentes secuencias codificantes correspondientes.....	43
Figura 17.- Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a una planta silvestre de ecotipo Columbia y plantas transgénicas con diferentes alelos de AP2 bajo el control del promotor del gen SHP2. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. En la columna de la izquierda, se muestran imágenes a un aumento 10x. En la columna de la derecha, se muestran las mismas imágenes a 20x. En la esquina inferior derecha se muestra la barra de escala en micras.....	44

Figura 18.- Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a una planta silvestre de ecotipo Columbia y plantas transgénicas con diferentes alelos de SNZ bajo el control del promotor del gen SHP2 y de IND. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. En la columna de la izquierda, se muestran imágenes a un aumento 10x. En la columna de la derecha, se muestran las mismas imágenes a 20x. En la esquina inferior derecha se muestra la barra de escala en nanómetros .....	45
Figura 19.- Estructura del gen AP2. Se muestran los lugares mutados en cada uno de los mutantes empleados en este trabajo. De color carne, se muestran el 5' y 3' UTR. Los recuadros azules representan los exones y las líneas azules los intrones. ap2-2 y ap2-6 presentan, respectivamente, transiciones A→G en posición 810 y G→A en posición 1616, teniendo afectados sitios donantes de splicing; ap2-7 tiene una transición A→G en la posición 304 que ocasiona una sustitución Gln-10 a Glu; ap2-5 tiene transiciones A→G en posiciones 937 y 2378 que ocasionan, respectivamente sustituciones Gly-159 y Gln-420 a Glu. ADN genómico tomado como referencia. Todos ellos en fono Columbia, excepto ap2-2, en fondo Landsberg. ....	46
Figura 20.- Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a los distintos mutantes ap2 que se muestran en la Figura 19. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. Todas las imágenes están tomadas a un aumento 10X. A la izquierda, se muestra Col-0 y las versiones mutantes que tienen ese ecotipo como fondo. En la columna de la derecha, se muestra Ler y la versión mutante que tiene ese ecotipo como fondo.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Características los microorganismos utilizados en este trabajo .....	17
Tabla 2.- Cebadores utilizados en la técnica Overlap Extension PCR .....	20
Tabla 3.- Cebadores largos diseñados para mutagénesis dirigida directa .....	20
Tabla 4.- Cebadores utilizados para obtener la región promotora de IND y SHP2.....	21
Tabla 5.- Cebadores universales utilizados para secuenciación de construcciones .....	21
Tabla 6.- Características de los vectores utilizados en este trabajo .....	27
Tabla 7.- Resumen de las construcciones generadas en este trabajo y su finalidad.....	30

## 1. Resumen

La familia AP2 está compuesta por genes implicados en múltiples procesos, caracterizándose, normalmente, por ser reguladores negativos, ya que todos los genes de la familia poseen un dominio EAR terminal. Con este Trabajo de Fin de Master, queremos contribuir a la caracterización del papel de tres genes de esta familia como son *APETALA2 (AP2)*, *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* y *TARGET OF EAT3 (TOE3)* en dos procesos de desarrollo que ocurren en las plantas con flor. El primero de ellos es la Parada Global de la Proliferación. Este fenómeno tiene lugar cuando todos los meristemas de la planta cesan su actividad, deteniéndose el crecimiento y desarrollo de la misma. Se ha revelado que *AP2* y otros miembros de la familia AP2 juegan un papel clave en la regulación del GPA, promoviendo la actividad del meristemo apical del tallo (SAM). Es decir, retrasando el GPA. Además, en este contexto del SAM, los genes de la familia AP2 estarían regulados finamente tanto a nivel transcripcional, por la acción de *FRUITFULL (FUL)*, como a nivel post-transcripcional, por la acción del microRNA172 (miR172). La acción conjunta de ambos mecanismos de regulación ocasiona que los niveles de *AP2* sean bajos en el momento del GPA. Para determinar el papel de *SNZ* y *TOE3* en el GPA, por tanto, hemos diseñado una estrategia biotecnológica consistente en la generación de alelos de estos genes resistentes a la degradación por el miR172 y hemos dirigido su expresión al SAM, con intención de manipular así el GPA. Finalmente, también hemos comprobado si una estrategia biotecnológica similar se puede utilizar para manipular el desarrollo del margen de valva, donde, de nuevo, la regulación por el miR172 juega un papel clave. Se ha demostrado que *AP2* regula negativamente la actividad de los genes de identidad del margen de valva, siendo esencial para un correcto desarrollo del fruto. Con intención de disminuir la acumulación de lignina en el margen de valva, y retrasar así la dehiscencia, hemos dirigido la expresión de los diferentes alelos de *TOE3*, *SNZ* y *AP2* resistentes a la degradación por el miR172 a este tejido, utilizando para ello las regiones promotoras de dos genes de identidad de este tejido: *INDEHISCENT (IND)* y *SHATTERPROOF2 (SHP2)*.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, *AP2*, *SNZ*, *TOE3*, miR172, GPA, margen de valva.

The AP2 family is composed of genes involved in multiple processes, characterized, normally, by being negative regulators, since all the genes of the family possess a terminal EAR domain. With this End of Master Project, we want to contribute to the characterization of the role of three genes of this family such as *APETALA2 (AP2)*, *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* and *TARGET OF EAT3 (TOE3)* in two development processes that occur in plants with flower. The first of these is the General Proliferative Arrest (GPA). This phenomenon occurs when all the meristems of the plant cease their activity, stopping the growth and development of this plants. It has been revealed that *AP2* and other members of the AP2 family play a key role in the regulation of GPA, promoting the activity of shoot apical meristem (SAM). That is, delaying the GPA. Furthermore, in this context of the SAM, the genes of the AP2 family would be finely regulated both at the transcriptional level, by the action of *FRUITFULL (FUL)*, and at the post-transcriptional level, by the action of the microRNA172 (miR172). The joint action of both regulatory mechanisms causes AP2 levels to be low at the time of the GPA. To determine the role of *SNZ* and *TOE3* in GPA, therefore, we have designed a biotechnological strategy consisting in the generation of alleles of these genes resistant to degradation by miR172 and we have directed their expression to SAM, with the intention of manipulating GPA. Finally, we have also checked whether a similar biotechnological strategy can be used to manipulate the development of the valve margin, where, again, regulation by the miR172 plays a key role. It has been shown that AP2 negatively regulates the activity of the identity genes of the valve margin, being essential for a correct development of the fruit. With the intention of reducing the accumulation of lignin in the valve margin, and thus delay dehiscence, we have directed the expression of the different alleles of *TOE3*, *SNZ* and *AP2* resistant to degradation by miR172 to this tissue, using the promoter regions of two identity genes of this tissue: *INDEHISCENT (IND)* and *SHATTERPROOF2 (SHP2)*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *AP2*, *SNZ*, *TOE3*, miR172, GPA, valve margin.

## 2. Introducción

Todo ser vivo se desarrolla siguiendo un patrón determinado hasta alcanzar un estado final mediante la expresión de la información que se alberga en su genoma. Esta información puede ser modulada de múltiples formas distintas y en diferentes niveles: modificación del ADN, modificaciones transcripcionales y post-transcripcionales (ARN), modificaciones post-traduccionales (proteínas). Además, una vez expresadas las proteínas, estas no suelen llevar a cabo su función de manera individual, sino que hay establecida una compleja red de interacción entre ellas que también puede ser modulada de múltiples maneras. Es el propio genoma de un ser vivo el que determina cómo ha de modularse a sí mismo en base a este abanico de posibilidades, influenciado siempre por el ambiente. Uno de los grandes objetivos de un biotecnólogo es el esclarecimiento de diferentes rutas genéticas y vías de regulación que determinan aspectos de interés del organismo en cuestión para, así, intentar modificar ciertos aspectos con intención de obtener algún beneficio con respecto a las condiciones naturales. Precisamente con esta intención, en este Trabajo final de Máster nos hemos centrado en el estudio de dos importantes procesos de desarrollo de las plantas con flores, utilizando para ello el organismo modelo *Arabidopsis thaliana*.

En primer lugar, hemos estudiado un fenómeno conocido como Parada Global de la Proliferación, GPA por sus siglas en inglés (Global Proliferative Arrest). Este hace referencia al cese de la actividad de todos los meristemos de la planta y, por consiguiente, la parada del crecimiento y desarrollo de todos los tejidos vegetales una vez que la planta ha producido un determinado número de frutos y semillas (Hensel *et al.*, 1994; Wuest *et al.*, 2016; Balanzà *et al.*, 2018). El conocimiento de elementos genéticos que controlan el GPA y cómo manipularlos, a fin de intentar retrasarlo, podría permitirnos obtener plantas con una producción de frutos incrementada, siendo este uno de los principales objetivos de la biotecnología vegetal de hoy en día.

En segundo lugar, nos hemos centrado en la caracterización de la ruta genética que determina la formación del margen de valva en el fruto de *Arabidopsis thaliana*. Se trata de una ruta bastante estudiada, aunque aún no perfectamente comprendida, cuya manipulación podría resultar en la obtención de frutos más resistentes a la apertura (Ballester and Ferrándiz, 2017). Así, además de esclarecer la ruta genética, se convertiría en una posible estrategia biotecnológica que permitiría disminuir las pérdidas por apertura del fruto que se producen por consecuencia de los procesos de recolección actuales y que suelen ser agravados por determinadas condiciones climáticas desfavorables.

### 2.1. *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo

*Arabidopsis thaliana* es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia de las Brassicáceas. Fue la primera planta establecida como organismo modelo a nivel mundial, disponiéndose hoy en día de gran variedad de recursos que facilitan el trabajo con esta angiosperma: conocimiento de la secuencia genómica completa, establecimiento de una exhaustiva colección de diferentes variedades naturales de la planta, numerosas herramientas moleculares para su caracterización y estudio, o grandes bases de datos y plataformas que albergan información fundamental sobre la brassicácea, pudiendo destacar aquí *The Arabidopsis Information Resource, TAIR*. El desarrollo básico de *Arabidopsis thaliana* es similar al resto de angiospermas, lo que permite en muchos casos extrapolar las conclusiones inferidas en los estudios realizados en este organismo modelo a otras especies de mayor interés comercial.

Las angiospermas, también conocidas como plantas con flor, son los organismos autótrofos terrestres más abundantes que existen. Su reproducción, basada en la producción de flores y frutos, es considerada la innovación que explica éxito de su evolución (Stebbins *et al.*, 1974; Regal *et al.*, 1977). Por la temática de este Trabajo de Fin de Máster (TFM), nos centraremos en dos aspectos fundamentales de las angiospermas, tomando siempre como referencia a *Arabidopsis thaliana*: funcionamiento y control genético de la actividad del meristemo apical del tallo (Shoot Apical Meristem, SAM) y desarrollo y estructura de los organismos florales.

### 2.1.1. Funcionamiento y control genético de la actividad del meristemo apical del tallo en *Arabidopsis thaliana*

Durante el proceso de embriogénesis, las angiospermas generan dos meristemas apicales diferentes, el meristemo apical del tallo y el meristemo apical de la raíz, SAM y RAM (Root Apical Meristem) por sus siglas en inglés. Ambos están conformados por un conjunto de células pluripotentes que van diferenciándose de forma simultánea al desarrollo de la planta dando lugar a todas las estructuras aéreas (SAM) y las radicales (RAM). En línea con la temática de este Trabajo de Fin de Máster, nos centraremos específicamente en el meristemo apical del tallo. Estudios citológicos e histológicos han puesto de manifiesto que el SAM, en angiospermas, está compuesto principalmente por tres dominios diferentes. En la parte más externa se establece la denominada zona central (central zone, CZ), compuesta por un pequeño grupo de células madre con capacidad pluripotente. En la periferia de estas células, se encuentra una capa de pequeñas células, muy activas en cuanto a división celular, que conforman la zona periférica (peripheral zone, PZ). Finalmente, por debajo de la CZ, en las capas más profundas del meristemo, se encuentra la denominada zona medular (rib zone, RZ), con células grandes que constituyen la médula del meristemo y van a dar lugar a las estructuras del tallo (Medford *et al.*, 1992; Steeves *et al.*, 1989).

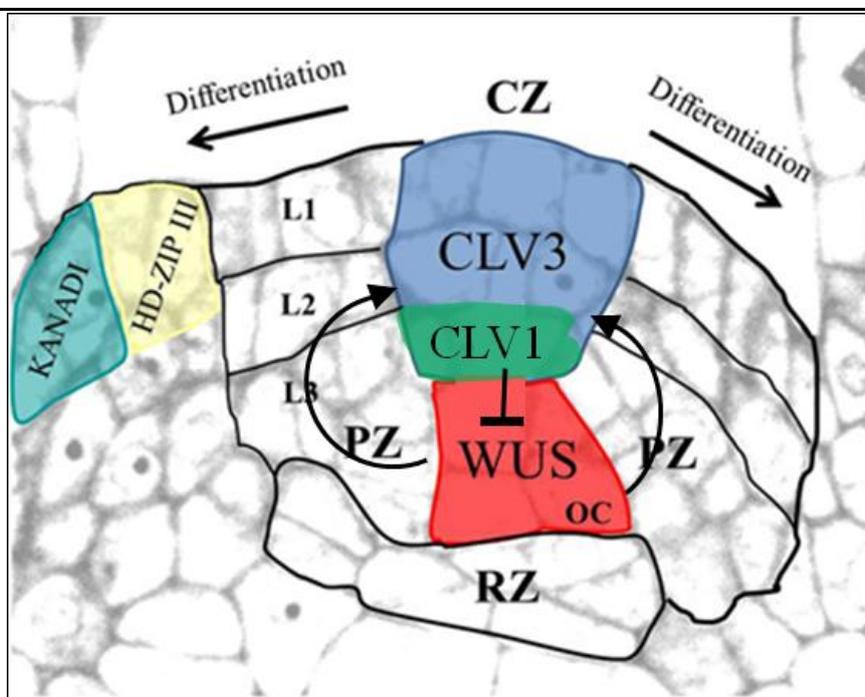
La principal hipótesis acerca de cuál es el mecanismo general de desarrollo del SAM defiende que las células madre de la zona central se dividen y su progenie se va incorporando a la zona periférica al mismo tiempo que adquieren cierta diferenciación y consiguiente pérdida de pluripotencialidad. Posteriormente, las células de la zona periférica se incorporan a los primordios de los órganos laterales o a los entrenudos. Así, a medida que se dividen las células de la RZ, el SAM va creciendo hacia arriba, mientras que las células de la PZ van diferenciándose en diferentes estructuras y son repuestas constantemente por células que provienen de la CZ. Así, la planta siempre mantiene un reservorio de células en el ápice del SAM, al mismo tiempo que se van generando estructuras laterales (Esau *et al.*, 1977; Steeves *et al.*, 1989; Lyndon *et al.*, 1990; Irish *et al.*, 1992).

Adicionalmente, el SAM también se divide en dos capas celulares diferentes, denominadas túnica y corpus. La túnica, está compuesta por dos capas celulares superpuestas denominadas L1 y L2. Ambas capas celulares se dividen únicamente de forma anticlinal, perpendicular al meristemo, lo que les otorga cierta particularidad con respecto al resto de células de la planta. La capa L1 es la más externa, siendo sus células precursoras de la epidermis del tallo, las hojas y las flores. La capa L2, por su parte, se sitúa por debajo de la epidermis y sus células son precursoras de las células mesodérmicas y las células germinales que originarán el polen o los óvulos. En cuanto al corpus, también denominado capa L3, no se trata de una capa celular única, sino de un grupo de células situadas por debajo de la túnica con capacidad de división en todos los planos. Estas células, son precursoras de las estructuras vasculares del tallo y de las células más internas de las hojas y los órganos florales (Satina *et al.*, 1940; Gifford *et al.*, 1954; Tilney-Bassett *et al.*, 1986; Poeting *et al.*, 1987).

Una vez descrita la estructura general del SAM, es importante también introducir el control genético al que está sometido. Para generar un equilibrio entre el mantenimiento de las células madre de la CZ y su incorporación a la PZ, es indispensable la función de *WUSCHEL* (*WUS*), de *CLAVATA 1* (*CLV1*), y de *CLV3*. *WUS* es un gen que se expresa en una zona de la CZ conocida como Centro Organizador (Organizing Center, OC) y codifica un factor de transcripción necesario para el mantenimiento de las células madre. Por tanto, la actividad de *WUS* es necesaria para que el SAM se mantenga activo. A su vez, *WUS* induce la expresión de *CLV3*, que codifica un ligando de *CLV1*, un receptor transmembrana tipo quinasa que se expresa en la OC, justo por encima de *WUS*. Tras la interacción entre *CLV3* y *CLV1*, se dispara una cascada de transducción de señal que se manifiesta en la regulación negativa de *WUS*, lo que implica la disminución de producción de células madre. Así, se forma un bucle de retroalimentación negativa que regula el mantenimiento de la cantidad de células madre del SAM (Clark *et al.*, 1997; Fletcher *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2008; Fletcher *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2011; Rojo *et al.*, 2002; Brand *et al.*, 2000; Mayer *et al.*, 1998; Schoof *et al.*, 2000; Brand

*et al.*, 2002; Yadav *et al.*, 2013). En cuanto a la incorporación de las células madre de la CZ a otras partes del meristemo y su consiguiente diferenciación en células concretas de diferentes tejidos de la planta, se trata de un proceso complejo regulado finamente espacial y temporalmente por la participación consonante de múltiples genes y hormonas, por lo que no entraremos en detalle en este proceso.

Visto de forma general la estructura y control del SAM, cabe hablar de los Meristemos Florales (Floral Meristems, FM). Los meristemos florales se forman a partir del SAM, en posiciones periféricas a éste, y emergiendo como estructuras laterales una vez que se induce la floración. La estructura del SAM y los FMs son prácticamente iguales, diferenciándose principalmente en dos aspectos: el primero es que las estructuras laterales que producen no son las mismas. Mientras que el SAM produce hojas y otros meristemos florales con filotaxis espiral, los FM producen sépalos, pétalos, estambres y carpelos de forma verticilada. Estudios genéticos han demostrado que los FM son meristemos apicales modificados, y que los cuatro verticilos de órganos florales son hojas modificadas. La segunda diferencia, es que el SAM es indeterminado y crece de forma indefinida hasta que se produce la parada global de la proliferación, de la que hablaremos más adelante. Por el contrario, el FM es determinado y su actividad cesa una vez que los cuatro verticilos de órganos nombrados anteriormente se han desarrollado (Bowman *et al.*, 1991; Honma *et al.*, 2001; Pelaz *et al.*, 2000; Weigel *et al.*, 1992).



**Figura 1.-** Representación gráfica del meristemo de *Arabidopsis thaliana*. En la figura se muestran la CZ, la PZ y la RZ, así como los agrupamientos celulares L1, L2 y L3 de la PZ. En color azul, se muestra la expresión de *CLV3*, y en color rojo y verde se muestran la expresión de *WUS*, y *CLV1* respectivamente en el OC. En verde y amarillo, se muestra como ejemplo la expresión de dos genes necesarios para el desarrollo del primordio de la hoja, *KANADI* y *HD-ZIP III*. (Boscá *et al.*, 2001 con modificaciones)

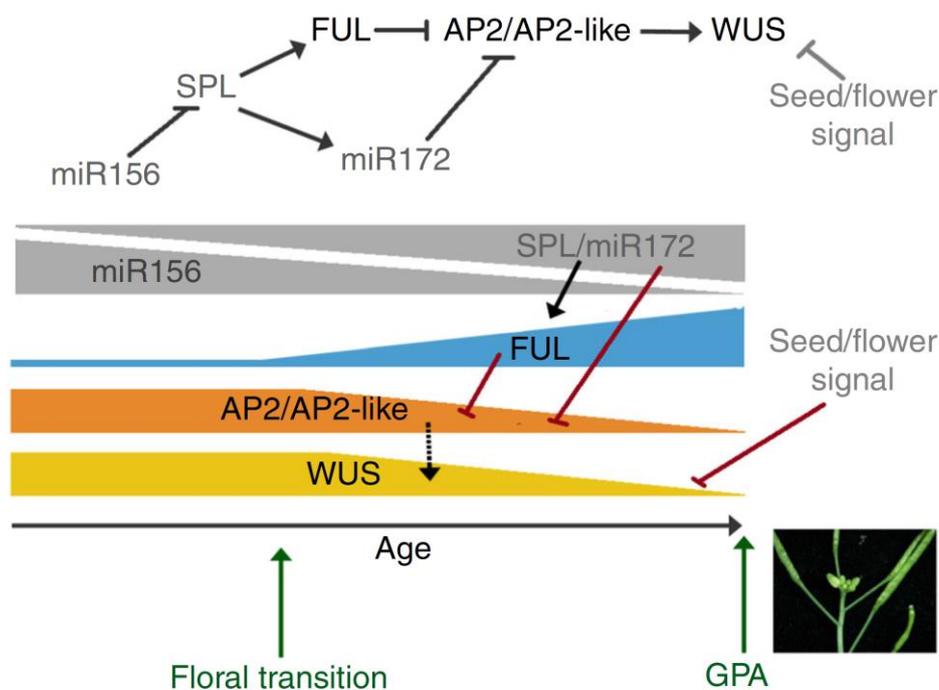
### 2.1.1.1. Parada Global de la Proliferación

Una de las claves del desarrollo de la planta y su correcta adaptación al ambiente, reside en su capacidad de modular de forma continua y plástica su desarrollo post-embriionario, pasando así por diferentes fases durante su crecimiento. Estas fases están caracterizadas principalmente por la identidad de los primordios laterales producidos por el SAM (Phoeting *et al.*, 1990). En *Arabidopsis thaliana*, en primer lugar, encontramos la denominada fase vegetativa. Esta fase está caracterizada, además de por el crecimiento de la raíz, por la producción de primordios de hojas a partir del SAM, sirviendo estos posteriormente de sustento para la producción de meristemos apicales secundarios, y

diferenciando aquí entre fase adulta o juvenil en función de la forma de las hojas y la distribución de los tricomas en la superficie de las mismas (Chien *et al.*, 1996; Telfer *et al.*, 1997; Kerstetter *et al.*, 1998). Tras la fase vegetativa, tiene lugar la fase reproductiva. En una etapa temprana de esta fase, meristemos axilares se desarrollan y forman primordios de hojas caulinares que sirven de sustento para el posterior desarrollo de meristemos florales axilares (meristemos sin dormancia). Si nos referimos a la fase reproductiva tardía, por su parte, es aquella en la que se forman los primordios florales, que acabarán formando las flores (Araki *et al.*, 2001). Durante la transición floral, se produce un fenómeno denominado bolting, consistente en la elongación de los internodos (Pouteau *et al.*, 2009). La transición del estado vegetativo al estado reproductivo constituye el cambio de fase más importante al que está expuesto la planta, estando regulada por una compleja red genética en la que participan alrededor de 306 genes diferentes identificados hasta la fecha, y que integra tanto señales correspondientes al propio estado de la planta como señales ambientales (Bouché *et al.*, 2015).

Una planta de *Arabidopsis* adulta, por tanto, tras haber pasado por las fases descritas anteriormente, produce flores y semillas de forma continua y progresiva. Sin embargo, después de la formación de un número determinado de flores, característico de cada ecotipo, la actividad de todos los meristemos cesa de forma casi simultánea (Hensel *et al.*, 1994). En el ecotipo Col, por ejemplo, esto ocurre unos 20 días después de producir las primeras estructuras florales. Así, la planta detiene totalmente el desarrollo de cualquier estructura y alcanza un estado final con un número determinado de flores, frutos y semillas, siendo esta la antesala de su posterior senescencia. A este fenómeno se le conoce como Parada Global de la Proliferación, o GPA (General Proliferative Arrest), por sus siglas en inglés. Hasta día de hoy, este fenómeno no ha sido caracterizado en profundidad, habiendo información muy escasa sobre el mismo. Uno de los primeros trabajos más sistemáticos acerca de este fenómeno, y que acuñan el término GPA como tal, es el del grupo de Bleecker. A raíz de la caracterización de un mutante estéril, *ms1-1*, se observó que la planta no cesaba la producción de flores unos 20 días después de producirse las primeras estructuras florales, como era característico de ese ecotipo, sino que producía flores durante mucho más tiempo. Además, también pudo observarse que, si se eliminaban las flores que la planta va produciendo de forma continua, el GPA se retrasaba y que, si eliminaban las flores de la planta una vez producido el GPA, los meristemos se reactivaban y volvían a producir flores. Así, se llegó a la primera hipótesis sobre el desencadenamiento del GPA: las semillas en desarrollo son las causantes de la inhibición de la actividad de los meristemos. Esta hipótesis, fue reforzada con experimentos posteriores de este mismo grupo de investigación, en los que pudieron observar que diferentes mutantes con producción de semillas reducida, producían hasta un 50% más de flores. Habiendo obtenido estos resultados, propusieron que el efecto de las semillas en el GPA podía deberse a dos posibles causas diferentes. La primera de ellas, es que las semillas en desarrollo desequilibran el balance fuente-sumidero, acumulándose todos los nutrientes en los frutos y semillas en producción, perdiendo así el SAM su actividad a consecuencia de ello. La segunda causa es que, posiblemente, las semillas son capaces de producir algún tipo de señales inductoras del GPA (Hensel *et al.*, 1994). Esta implicación de las semillas en el arresto global de la proliferación ya había sido descrita previamente en un amplio rango de especies como el pepino (Sigter *et al.*, 1969), el trigo (Fisher *et al.*, 1973), soja (Nooden *et al.*, 1984), la colza (Pechan and Morgan *et al.*, 1985) y el tomate (Bangerth *et al.*, 1989). Sin embargo, en estos estudios no se profundizó tanto en el tema, no habiéndose acuñado aún el término GPA. Posterior al trabajo del grupo de Bleecker, el grupo de investigación de Grossniklaus, aportó nuevas evidencias acerca de este fenómeno, reforzando las hipótesis realizadas hasta el momento. Pudieron observar que el transcriptoma del SAM inactivo tras el GPA era prácticamente igual que el transcriptoma de los brotes axilares en dormancia. Además, observaron que, tras la poda de frutos, también se producía la reactivación de estos meristemos axilares en dormancia. Es decir, observaron que las semillas ocasionaban un traspaso gradual de la dominancia desde los meristemos apicales y axilares a los meristemos florales, ocasionando la dormancia de los dos primeros, que adquieren una identidad similar, y produciéndose así el GPA. Sin embargo, tampoco consiguieron descubrir cuál era el agente causal de este fenómeno (Wuest *et al.*, 2016). En artículos muy recientes, se propone, aunque sin ninguna base, un posible modelo en el que el agente causal del GPA podría ser un cambio en el balance de auxinas, causante del mencionado traspaso de dominancia

a los meristemos florales. Los frutos y semillas en desarrollo producen auxinas de forma continua y progresiva, siendo este efecto más intenso a medida que se desarrollan un mayor número de ellos, cambiando así de manera paulatina el balance de auxinas de la planta y haciéndose el SAM cada vez peor sumidero, hasta alcanzar un umbral en el que se inactivan todos los meristemos de forma casi simultánea (Walker *et al.*, 2018). En el grupo de investigación de Cristina Ferrándiz, sin embargo, se ha establecido un modelo de regulación génica del GPA dependiente de la edad de la planta. Se trata de una hipótesis poco fundamentada hasta el momento reflejada en la Figura 2.



**Figura 2.-** Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA. (Balanzà *et al.*, 2018)

En el laboratorio de la Dra. Ferrándiz se observó que, en diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, en el mutante *ful* (*fruitfull*) se producía un incremento de la expresión de *WUS* en el SAM, además de un retraso en el GPA, obteniendo plantas con mayor producción de frutos. Sobre plantas con fondo mutante *ful*, se aplicó mutagénesis con EMS. En una de las líneas mutantes obtenidas se producía un retraso aún mayor del GPA, produciendo más del doble de frutos que una planta silvestre. Posteriormente, se identificó que en esta línea mutante se había producido una transición G→A en el sitio de reconocimiento del miR172 del gen *AP2*, perdiéndose así la regulación negativa que ejerce el miR172 sobre este gen (regulación a la que están sometidos todos los genes de la subfamilia APETALA2, como veremos posteriormente). Este alelo mutante, pasó a ser denominado *ap2-170*. Así, parecía que un aumento de expresión de *AP2* conseguía retrasar el GPA. En otros estudios previos, se había observado que *AP2* regula positivamente *WUS* (Wurschum *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2017). Así, se le atribuyó un papel importante a *AP2* en el GPA, estableciéndose la hipótesis de que podría controlar la actividad meristemática mediante la regulación del ciclo de realimentación *WUS-CLV3* que hemos explicado anteriormente en este trabajo, reprimiendo la señalización de *CLV* y promoviendo así la expresión de *WUS* (Wurschum *et al.*, 2006). Tras todo ello, se hipotetizó los fenotipos observados en los mutantes *ful* eran ocasionados por un cambio en la regulación de *AP2*. Con la realización de diferentes experimentos, se demostró que, efectivamente, *FUL* regula negativamente a *AP2* de manera, a priori, indirecta (aunque no puede descartarse una regulación directa). Además, también se demostró que esta regulación de *AP2* es independiente a la regulación ejercida por el miR172. En definitiva, se llegó a la conclusión de que la acción coordinada de *FUL* y el miRNA172 controlan la expresión de *AP2* que a su vez regula la actividad del meristemo y, con ello, la parada global de la proliferación (Balanzà *et al.*, 2018). De esta forma, si interpretamos la

Figura 2, a medida que avanza la edad de la planta, aumenta la expresión del miR172 y de *FUL*, provocando la represión de *AP2* y los *AP2-like*. Todo ello se manifiesta finalmente en la inactivación de los meristemos, en el GPA. Por la importancia en este trabajo, posteriormente profundizaremos en los miembros, la regulación y las funciones de la familia APETALA2

Como hemos visto, por tanto, el GPA es un fenómeno que necesita aún ser investigado en profundidad a fin de esclarecer diferentes aspectos del mismo. Sumado a esta falta de información, el fenómeno adquiere cierta complejidad extra a raíz de la observación de que, en especies cercanas a *Arabidopsis thaliana* como la colza, *Brassica napus*, el GPA se produce de manera diferente. Esta planta, continúa produciendo flores y desarrollándose incluso 10 días después de haberse producido el número total de las semillas, generándose estas solo en el 50% de las flores. Así, parece que la actividad de los meristemos no se ve tan afectada por la producción de semillas (Tayo and Morgan, 1975). En frutales como el manzano, el cerezo o el peral, la transición floral ocurre en otoño, quedando determinada la cantidad de flores que se producirán en función de las yemas que se hayan producido. En primavera, estas yemas se activan y se desarrollan las flores, frutos y semillas, al mismo tiempo que ocurre un notable crecimiento vegetativo de los árboles (Bangerth *et al.*, 1989). En estas especies, perennes y policárpicas, parece que la formación de semillas, no afecta negativamente al desarrollo de más flores ni al crecimiento vegetativo de la planta, siendo así el GPA un proceso que difiere, en mayor o menor medida, entre las diferentes especies. En el apartado [2.1.3.](#), se hablará de la familia APETALA2 y su contribución en el control genético propuesto para el GPA. Contribuir a la caracterización de este complicado proceso es la principal motivación y uno de los principales objetivos de este TFM.

## 2.1.2. Desarrollo de flores y frutos

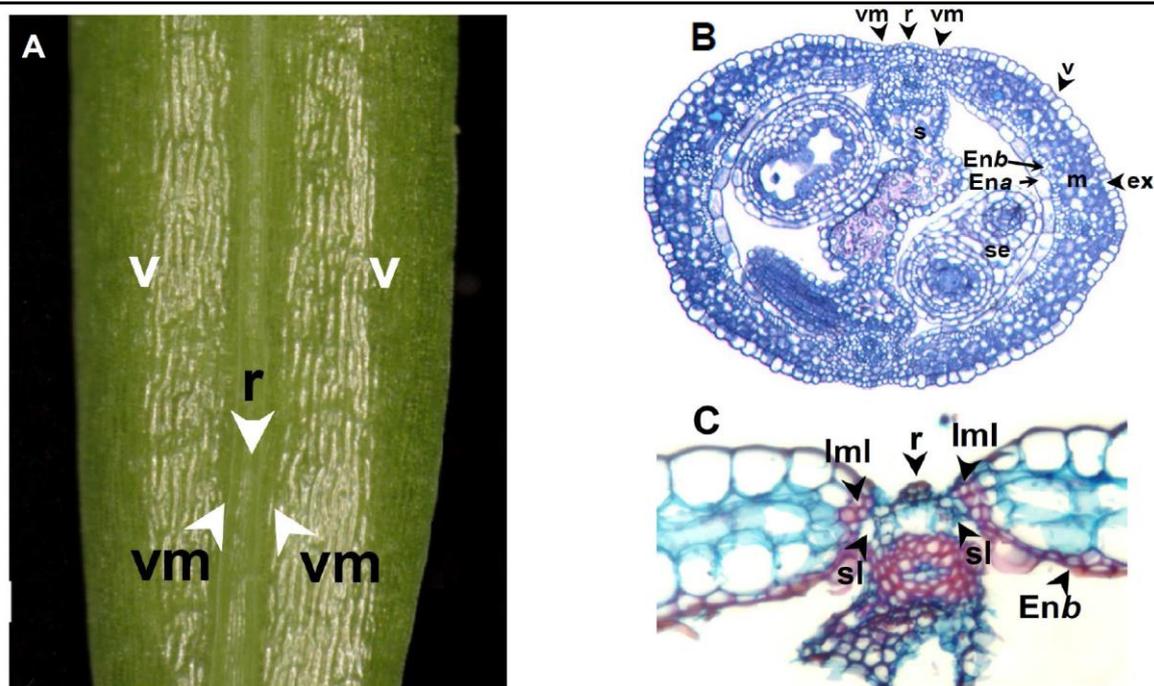
Las angiospermas, para su reproducción, desarrollan, a partir de los ya descritos meristemos florales, estructuras complejas denominadas flores. Estas, entre las diferentes especies, presentan grandes variaciones en cuanto a color, forma o estructura, pero en todas ellas se conserva un plan básico de “construcción”, consistente en disponer las diferentes estructuras florales en cuatro anillos concéntricos o verticilos (Robles and Pelaz, 2005). Tomando *Arabidopsis thaliana* como organismo de referencia, en el verticilo más externo, conocido con el nombre de cáliz, se disponen cuatro sépalos. En el verticilo inmediatamente más interno, se desarrollan cuatro pétalos de forma alterna a los sépalos del cáliz, recibiendo este verticilo el nombre de corola. En el siguiente verticilo se desarrollan los órganos reproductores masculinos, los estambres. Estos, están formados por un filamento con una antera en el extremo distal del mismo, y es el órgano en el que se produce y se almacena el polen. Encontramos seis estambres en este tercer verticilo, cuatro en posición medial y dos en posición lateral. Finalmente, en el verticilo más interno, podemos encontrar el órgano, o conjunto de órganos reproductores femeninos, el gineceo (Smyth *et al.*, 1990). Se trata de un órgano reproductor complejo que, dicho de forma general, está formado por un número variable de estructuras contenedoras de óvulos, los carpelos. En *Arabidopsis thaliana*, concretamente, se desarrollan dos carpelos y estos se fusionan a lo largo de un plano medio a través de una estructura denominada septum (Ferrándiz *et al.*, 1999). El gineceo es una estructura fundamental que permite la recepción y germinación del polen, así como la consiguiente fertilización de los óvulos. Cuando la flor ha alcanzado la madurez, o estado de antesis, podemos distinguir diferentes partes en el gineceo distribuidas a lo largo de un eje apical-basal: el estigma, especializado en la adherencia de los granos de polen; el estilo, una prolongación del ovario que conecta con el estigma; el ovario, que contiene los óvulos; y el ginóforo, que une el ovario a la base de la flor. Por centrarnos en la temática de este TFM, hablaremos más en profundidad del ovario de *Arabidopsis*. Se trata de una estructura formada por dos valvas divididas internamente por el septum, y que conectan de forma externa por el denominado replum. Así, se forman dos lóculos individuales, correspondientes a cada uno de los dos carpelos, dentro de los cuales se posicionan los óvulos dispuestos en cuatro filas (Ferrándiz *et al.*, 1999). Las valvas, a su vez, están formadas por diferentes capas celulares. En la parte más externa, encontramos el exocarpo o epidermis, conformado por una única capa de células con morfología alargada entre las que se intercalan estomas inmaduros. En una zona intermedia, se desarrolla el mesocarpo, formado principalmente por tres capas de tejido fotosintético. Finalmente, en la zona más interna, aparece el endocarpo, en el que podemos distinguir

dos capas celulares diferenciadas: la epidermis interna, en la que se disponen células de gran tamaño con una pared muy fina; y la capa subepidérmica, con una gran densidad de células pequeñas y de morfología alargada. Es común también denominar estas capas como *Ena* y *Enb* respectivamente (Ferrándiz *et al.*, 1999).

Centrándonos en *Arabidopsis thaliana*, cuando ocurre la polinización, se desarrolla en el gineceo el denominado tubo polínico, que permitirá el trasiego del polen hasta los óvulos para lograr la fecundación. Una vez producida la fecundación, la estructura floral sufre una serie de cambios que darán lugar al fruto, un fruto con morfología de “vaina” que recibe el nombre de silicua. En concreto, tras la fecundación, las células del ovario comienzan a dividirse y expandirse de forma progresiva. Así, el estigma pasa a extenderse por encima de las anteras, aumentando cada vez de tamaño la silicua. Al mismo tiempo, comienza la abscisión de los órganos florales que rodean a la silicua y se producen una serie de cambios a nivel genético que propiciarán el correcto desarrollo del fruto y la posterior dispersión de las semillas (Ferrándiz *et al.*, 1999; Ferrándiz, 2002). Por tanto, el fruto maduro consta fundamentalmente de un ovario elongado que mantiene la misma estructura básica descrita anteriormente para el ovario previo al proceso de fecundación: dos lóculos en forma de dos valvas separadas internamente por el septum y conectadas de forma externa por el replum. Para permitir la apertura del mismo y, en consecuencia, la dispersión de las semillas, adquiere gran importancia una estructura del fruto conocida como margen de valva. En líneas generales, se denomina margen de valva a la estructura que une las valvas con el replum. Está formado por capas de células muy estrechas que constituyen una constricción entre las valvas y el replum, debido esto a una expansión más lenta de las células durante el proceso de maduración del fruto (Robles and Pelaz, 2005). En los estados más avanzados de desarrollo del fruto, el margen de valva se transforma en la denominada zona de dehiscencia. A este proceso se le considera, a excepción del desarrollo de las semillas en el interior del fruto, el proceso más importante en lo que a desarrollo del fruto se refiere en *Arabidopsis thaliana* (Ferrándiz *et al.*, 2002). Concretamente, será esta zona de dehiscencia la que permitirá, cuando proceda, la apertura del fruto y la correcta dispersión de las semillas del interior. Para su formación, las células del margen de valva comienzan a sufrir un proceso de lignificación, dando así lugar a una capa de células marginales lignificadas. Entre estas células marginales lignificadas y el replum, queda una fina capa de células isodiamétricas sin lignificar que conforman la denominada capa de separación. La lignificación circundante genera gran tensión sobre esta capa de separación, lo que produce que la lámina media presente entre sus células adquiera gran fragilidad y acabe rompiéndose, provocando la muerte de las células y formándose así una línea de separación entre el replum y las valvas (Spence *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, la epidermis interna y la capa subepidérmica del endocarpo de la valva sufren el mismo proceso de lignificación e hidrólisis que acabamos de comentar, contribuyendo todo ello a la apertura mecánica del fruto. Una vez abierto, el viento, la lluvia o cualquier otro elemento de contacto físico con los frutos promoverán la dispersión de las semillas de su interior (Robles and Pelaz, 2005).

Este proceso de desarrollo de flores y frutos del que hemos hablado de forma generalizada, ha sido descrito en detalle y se ha dividido en 20 estados diferentes en función del grado de maduración de la flor o el fruto. Los doce primeros estados del programa corresponden al desarrollo de la flor, y los ocho restantes al desarrollo del fruto (Roeder *et al.*, 2006). Como es común en plantas, el proceso está controlado muy finamente a nivel genético, estando muy influenciado por el estado de la planta y el ambiente, que juega un papel fundamental en el proceso. Por la temática de este TFM, nos centraremos en algunos aspectos genéticos relacionados con el desarrollo del fruto, y más concretamente, con el desarrollo del replum, el margen de valva y las valvas.

En la Figura 3 se muestran las partes descritas en esta parte del trabajo.



**Figura 3.-** Representación gráfica de diferentes partes del fruto de *Arabidopsis thaliana*. (A) Fruto completamente elongado. (B, C) Sección transversal de fruto en estado de desarrollo 17. (C) Tinción con azul de safranina para observar la acumulación de lignina (color rojizo). v, valva; r, replum; vm, margen de valva; ex, exocarpo; m, mesocarpo; Enb, epidermis interna; Ena, capa subepidérmica; se, semilla; lml, zona marginal lignificada; sl, zona de separación. (Robles and Pelaz, 2005)

### 2.1.2.1. Control genético del desarrollo de flores y frutos

Uno de los primeros mutantes descritos afectados de forma casi específico en el desarrollo de los carpelos tras la fertilización es *ful* (Gu *et al.*, 1998). Así, la mayoría de los efectos fenotípicos descritos para este mutante aparecen en el fruto, aunque también presenta algunos defectos en el desarrollo de las hojas caulinares (Ferrándiz *et al.*, 2000a). El mutante *ful* presenta defectos en la diferenciación de las células de la valva, lo que hace que las plantas desarrollen silicuas muy pequeñas. Concretamente, las células del exocarpo detienen su desarrollo de forma prematura, y los estomas no pueden desarrollarse sobre las valvas en estas plantas. Además, el replum se ve forzado a crecer en forma de zigzag para adaptarse al menor tamaño de las silicuas. En cuanto al endocarpo, se pierde el control del ciclo celular en las células de la capa subepidérmica, presentando un número mucho mayor de células que una planta silvestre, y la lignificación típica de la epidermis interna se extiende hacia todas las células del mesocarpo. Todo ello se manifiesta en una dehiscencia anormal de los frutos, que muchas veces se abren de forma violenta por no poder contener el número normal de semillas en su interior debido a su pequeño tamaño (Ferrándiz *et al.*, 2000b). En base a la observación de los fenotipos del mutante *fruitfull*, se le adjudicó una primera función a este factor de transcripción de la familia MADS-box, y se postuló que *FUL* era un gen que promovía la expansión de las células de la valva.

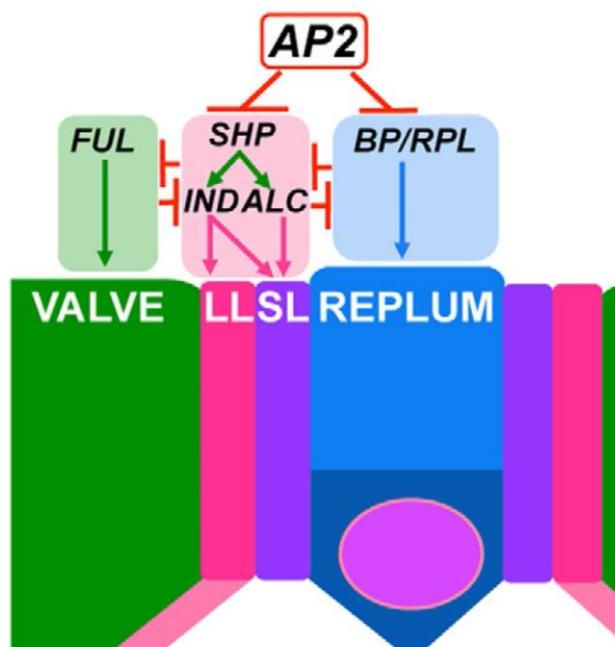
*SHATTERPROOF1* y *SHATTERPROOF2* (*SHP1* y *SHP2*) son dos genes de la familia MADS-box que presentan gran redundancia estructural y que tienen patrones de expresión casi idénticos (Ma *et al.*, 1991; Savidge *et al.*, 1995; Flanagan *et al.*, 1996). Ambos se expresan con alta especificidad en el margen de valva. Los mutantes simples de estos genes no presentan ningún fenotipo, pero los dobles mutantes son indehiscentes, lo que también pone de manifiesto su redundancia funcional (Liljegren *et al.*, 2000). El doble mutante *shp1shp2* no presenta la lignificación típica del margen de valva, por lo que no se forma la zona de dehiscencia y los frutos se hacen indehiscentes (Liljegren *et al.*, 2000). Lo contrario ocurre con la ganancia de función de estos genes, pues en plantas *35S:SHP1* y *35S:SHP2* los frutos recuerdan a los del mutante *ful*: las valvas presentan defectos en la epidermis interna y

externa, presentan los patrones de lignificación alterados, ocupando la lignina gran parte del mesocarpo y los frutos se abren de forma brusca antes de que las semillas maduren (REF). Por otro lado, usando líneas de ganancia de función *35S:FUL*, se observaron plantas con un fenotipo muy parecido al doble mutante *shp1shp2*. En estas líneas, todo el fruto tiene identidad de valva, lo que parece indicar que tanto el margen de valva como el replum cambian su identidad por esta última. Además, no se produce lignificación y los frutos se hacen indehiscentes (REF). Por otro lado, se comprobó que los patrones de expresión de *FUL* (en la valva) y de *SHP1* y *SHP2* (en el margen de valva) eran complementarios y que en las líneas *35S::FUL* los genes *SHP1* y *SHP2* no se expresaban en el ovario, mientras que su expresión se expandía alas valvas del mutante *ful*. Con toda esta información, finalmente se postuló que *FUL* era un regulador negativo que restringe la expresión de *SHP* al margen de valva, impidiendo así el desarrollo de caracteres típicos de la zona de dehiscencia en la valva. Sin embargo, quedaba por aclarar si además *FUL* tenía algún papel específico en el desarrollo de la valva que explicase el pequeño tamaño de los frutos en los mutantes *fruitfull*. Si la función de *FUL* hubiese sido simplemente restringir la expresión de los genes *SHP*, en el triple mutante *ful shp1 shp2*, las valvas deberían de tener el mismo fenotipo que un fruto silvestre. Al obtener este triple mutante, se rescató ligeramente el fenotipo, pero las valvas seguían presentando un fenotipo mutante, siendo los frutos más pequeños y mostrando cambios en el patrón de lignificación. Todo ello, indica que los fenotipos de *FUL* no se deben únicamente al cambio de patrón de expresión de los genes *SHP*, sino que *FUL* debe tener alguna función directa en el desarrollo de las valvas (Ferrándiz *et al*, 2000b).

Posteriormente, se descubrieron dos genes de la familia bHLH que jugaban también un papel importante en el desarrollo del fruto: *ALCATRAZ (ALC)*, haciendo un guiño a la famosa prisión estadounidense, pues las semillas no podían escapar de los frutos parcialmente indehiscentes en los mutantes *alc*; e *INDEHISCENT (IND)*, cuya mutación causaba frutos completamente indehiscentes que no se habrían con la madurez (Rajani and Sundaresan, 2001). Mientras que los mutantes *ind* carecían totalmente de zona de dehiscencia, los mutantes *alc*, a diferencia de los mutantes *shp1shp2* o *ind*, afectaban específicamente a la formación de la ya mencionada capa de separación, provocando que sus células sean de tamaño mucho mayor que en un fruto silvestre y que estén ectópicamente lignificadas. Todo ello, provoca que estas células sufran un proceso de ruptura incompleto que no produce la disociación de las células, manteniendo unidos el replum y las valvas. La interpretación de ello, llevó a pensar que *FUL* también restringía la expresión de *ALC* en el margen de valva, y que tal vez el fallo en el desarrollo de las valvas en los mutantes *ful* se debía a la modificación del patrón de expresión de *ALC* en lugar de ser un papel específico de *FUL* como se había llegado a plantear. Para comprobarlo, se obtuvo el doble mutante *ful alc* y, efectivamente, los frutos producidos por estas plantas eran mucho mayores que los frutos de *ful*, rescatándose así ligeramente el fenotipo tras eliminar la expresión ectópica de *ALC* (Liljegren *et al.*, 2004). En los mutantes *ind*, las células de la zona de separación y las células lignificadas de la zona marginal no son visibles, por lo que parece que este gen afecta a ambos procesos, necesarios para la apertura del fruto. Nuevamente, *FUL* parece reprimir la expresión de *IND* al margen de valva, y los dobles mutantes *ful ind* rescatan el fenotipo de la valva enormemente, siendo los frutos mucho más largos que en el mutante *ful*. Concretamente, de entre todos los mutantes que hemos hablado en esta sección, el mutante *ful ind* es el que produce frutos más parecidos a los silvestres (Liljegren *et al.*, 2004).

El quintuple mutante *ind alc shp1 shp2 ful* desarrolla, aunque con algunos defectos aún presentes, valvas prácticamente iguales en longitud que las del fruto silvestre. Todo ello, lleva a indicar que, efectivamente, *FUL* presenta algún papel directo en el desarrollo de las valvas al margen de restringir la expresión de los demás genes confinándolos en el margen de valva (Liljegren *et al.*, 2004). Estudios genéticos y análisis de expresión sitúan a *SHP1* y *SHP2* aguas arriba de *IND* y *ALC*, y parecen tener un papel adicional al margen de la activación de estos dos últimos genes, pues el mutante cuádruple *ind alc shp1 shp2* produce márgenes de valva mucho menos definidos que los dobles mutantes *ind* y *alc*. En triples mutantes *ful shp1 shp2*, sigue habiendo algo de expresión de *IND*, lo que sugiere que deben existir otros activadores al margen de los genes *SHP* que controlen la expresión de *IND*, pero son aún desconocidos (Liljegren *et al.*, 2000, 2004; Rajani and Sundaresan, 2001; Ferrándiz *et al*, 2000b).

Sin entrar tanto en detalle, hablaremos también del control genético del replum. *REPLUMLESS* (*RPL*) es un gen que se identificó a raíz del análisis de diferentes mutantes afectados en el desarrollo del replum en el fondo genético *ful*, en el que el replum es fácilmente visible por la estructura de zigzag que adquiere, como se ha comentado anteriormente. Estos dobles mutantes *ful rpl*, mostraban un replum con cierta identidad de margen de valva, ocurriendo lo mismo con el mutante simple *rpl* como se comprobó posteriormente. Todo ello, llevó a pensar que *RPL* es importante para el desarrollo del replum. Sin embargo, también se pueden observar otros fenotipos en la planta en los mutantes *rpl*, por lo que, a priori, actúa en diferentes rutas del desarrollo. En los mutantes *rpl shp1 shp2* y *rpl ful shp1 shp2*, el desarrollo del replum se rescataba casi completamente. Así, se llegó a la conclusión de que podría tener un papel muy similar al de *FUL* en las valvas: reprimir la expresión en el replum de *SHP IND* y *ALC* (Roeder *et al.*, 2003). En este caso, al rescatarse casi completamente el desarrollo del replum en mutantes *rpl shp1 shp2* y *rpl ful shp1 shp2*, parece que *RPL*, no tendría una función directa en el desarrollo del replum más allá de la represión de los demás genes. Más recientemente, se ha descubierto un gen que juega también un papel muy importante en la formación del replum, *BREVIPEDICELLUS* (*BP*). El mutante simple *bp* no presenta fenotipo en fruto, pero el doble mutante *bp rpl* carece totalmente de replum (Alonso-Cantabrana *et al.*, 2007). Además, mutantes *shp*, *ful*, *ind*, *alc*, y combinaciones de los mismos, no son capaces de rescatar el fenotipo del mutante *rpl bp*, lo que indica un papel directo de estos genes sobre el desarrollo del replum al margen de reprimir la expresión de genes de identidad de margen de valva. Una hipótesis establecida al respecto establece que *BP*, que codifica una proteína KNOX- clase I, es necesaria para la localización nuclear de *RPL*, que codifica un factor de transcripción tipo BELL-. Así, es posible que proteínas homólogas presentes en el replum sean capaces de interactuar con *BP* o *RPL* cuando una de ellas falta, supliéndola, no habiendo así fenotipos en los mutantes simples *bp* y *rpl* (Bellaoui *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2003; Smith and Hake, 2003; Bhatt *et al.*, 2004; Chuck *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 2006; Endrizzi *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996; Kanrar *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004; Scofield *et al.*, 2007; Rutjens *et al.*, 2009; Hay and Tsiantis, 2010).



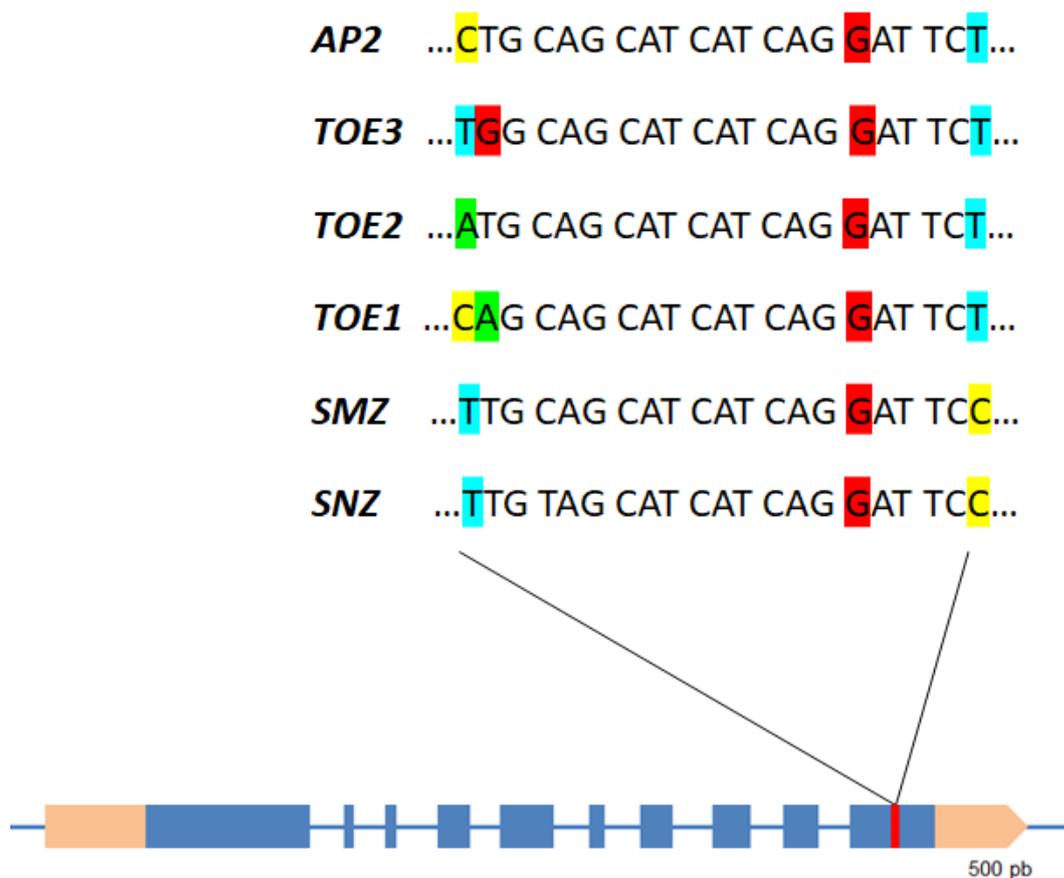
**Figura 4.-** Representación gráfica de diferentes rutas de control genético en el desarrollo del fruto. LL, zona marginal lignificada; SL, capa de separación. Se muestra el gen *APETALA2* (*AP2*), del que se hablará posteriormente en este trabajo (Ripoll *et al.*, 2011)

Finalmente, se ha descubierto también un papel importante del gen *APETALA2* en el desarrollo del fruto. Dado que este gen también tiene una actividad importante en la parada global de la proliferación de la que hemos hablado anteriormente, dedicaremos un apartado para hablar tanto del gen como de la familia *APETALA2* en general, genes en torno a los cuales gira este Trabajo de Fin de Máster.

### 2.1.3. La familia *APETALA2*

La familia *APETALA2* engloba a un grupo de factores de transcripción que de entre 119-200 miembros divididos en cuatro subfamilias en base a diferentes elementos estructurales (dominios concretos: la familia *AP2*, la familia *RAV*, la familia *ERF* y la familia *DREB*. Estas subfamilias, además, tienen papeles diferentes relacionados con diferentes procesos. Así, por ejemplo, la familia *DREB* (dehydration-responsive element-binding protein) consta de miembros que son inducidos en condiciones de estrés hídrico para intentar afrontarlo y la subfamilia *ERF* contiene genes que se inducen en respuesta a etileno. En general, esta familia consta de factores de transcripción de respuesta a estrés, metabolismo, maduración del fruto, senescencia y otras funciones relacionadas con la síntesis y la señalización del etileno (Han et al., 2016; Koyama et al., 2013; Lee et al., 2012; Li et al., 2007; Fits and Memelink 2000; Trujillo et al., 2008; Zhu et al., 2014). Estos, contienen un dominio *AP2/ERF* de unión a ADN, que se une específicamente al motivo GCC de la región promotora de los genes regulados por el etileno (Fujimoto et al., 2000). Con el tiempo, diferentes investigadores han ido elucidando los diferentes papeles de estos factores de transcripción en sus respectivos campos (Guo and Ecker 2004; Liu et al., 2014; Pré et al., 2008; Taketa et al. 2008; Tang et al., 2016; Xiao et al., 2013; Yin et al., 2016). Por su implicación en este TFM, hablaremos de la subfamilia *AP2*. En esta subfamilia, encontramos a los genes *APETALA2* (*AP2*), *TARGET OF EAT1* (*TOE1*), *TOE3*, *SCHLAFMUTZE* (*SMZ*) y *SCHNARCHZAPFEN* (*SNZ*), conocidos todos ellos como genes *AP2-like*. Todos ellos, están regulados por el miR172, un micro ARN que actúa sobre el ARN mensajero de estos genes induciendo su degradación o impidiendo su traducción (Chen et al., 2004; Kasschau et al., 2003; Aukerman and Sakai, 2003). Este micro ARN, detecta una secuencia que se encuentra cercana al extremo 3' de dichos genes, estando muy conservada en los distintos genes *AP2* y *AP2-like* como se muestra en la Figura 5. Además, esta familia se caracteriza también por poseer un dominio EAR terminal. Este motivo, con una secuencia consenso LxLxL o DLNxxP, constituye el motivo de represión transcripcional más abundante identificado en plantas. Además, actúa principalmente a raíz de la interacción proteína-proteína con otros co-represores transcripcionales como *TOPLESS* y *AtSAP18* (Hiratsu et al., 2002, 2004; Tiwari et al., 2004; Liu and Karmarkar, 2008; Szemenyei et al., 2008; Pauwels et al., 2010; Gallavotti et al., 2010; Kagale et al., 2011). La familia *APETALA2* incluye genes implicados en múltiples procesos: en el caso de *AP2*, se ha demostrado que juega un papel muy importante en el desarrollo floral (Bowman et al., 1991; Drews et al., 1991), la formación de las semillas (Jofuku et al., 1994, 2005), la regulación del tiempo de floración (Aukerman and Sakai, 2003) o el mantenimiento de la actividad meristemática (Wurschum et al., 2006).

En cuanto al control del desarrollo floral, junto al gen *APETALA1* (*AP1*) confiere identidad de órganos florales externos: sépalos y pétalos. En este sentido, se ha demostrado una relación antagónica con el gen *AGAMOUS* (*AG*), restringiendo la expresión del mismo a los verticilos internos del meristemo floral y viceversa, siendo posible así 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). Con la identificación de un alelo dominante negativo de *AP2*, se observó una terminación prematura de la actividad del SAM, por lo que se le adjudicó también una función determinante como regulador de la actividad meristemática. A raíz de estudios genéticos posteriores, se hipotetizó que *AP2* podría controlar la actividad meristemática mediante la regulación del ciclo de realimentación *WUS-CLV3* que hemos explicado anteriormente en este trabajo, reprimiendo la señalización de *CLV* y promoviendo así la expresión de *WUS* (Wurschum et al., 2006). En trabajos realizados previamente en este laboratorio por Irene Martínez, se comprobó que *FUL* regula negativamente al gen *AP2* de manera presuntamente directa (aunque no se puede descartar una regulación indirecta). Por lo tanto, la acción coordinada de *FUL* y el miRNA172 controlan la expresión de *AP2*, regulando así la actividad del meristemo y la parada general de la proliferación (Balanzà et al., 2018).



**Figura 5.-** Representación de la secuencia de reconocimiento del miR172 en diferentes alelos *AP2* y *AP2-like*. Se ha utilizado un color específico para cada base a fin de resaltar las variaciones entre los diferentes genes. Así mismo, se ha utilizado el color rojo para resaltar una guanina que se encuentra muy conservada en la secuencia de reconocimiento del miR172 en todos los genes. A modo de ejemplo, se ha utilizado la secuencia genómica de *AP2*, estando representado en color carne los extremos 3' UTR y 5'UTR, en recuadros azules los exones, y en color rojo el sitio de reconocimiento del miR172.

De esta manera, como ya se mencionó en el apartado 2.1.1.1., *AP2*, junto con los *AP2-like*, *FUL* y el miR172, juegan un papel fundamental en el control genético del GPA dependiente de la edad de la planta: a medida que avanza la edad de la planta, aumenta la expresión del miR172 y de *FUL*, disminuyendo la expresión de *AP2* y de los *AP2-like*. Esto se traduce en una regulación negativa de *WUS* coordinada con la regulación negativa que ejercen sobre este gen las semillas en desarrollo. Todo ello se manifiesta finalmente en la inactivación de los meristemas, en el GPA.

Aunque la implicación de este gen en el desarrollo floral haya sido estudiada en profundidad, se sabe menos sobre su papel en el desarrollo del fruto. Mediante fondos genéticos *rpl ful*, se identificó que *AP2* previene el correcto desarrollo del replum y el margen de valva mediante la regulación negativa de los genes de identidad de estos tejidos. Sin entrar en más detalle, se comprobó que plantas *ap2 35S::FUL* recuperaban en cierta medida el patrón de lignificación normal del margen de valva. Además, en estas plantas, también se recupera en cierta medida la formación del replum con respecto a las plantas *35S::FUL*. Análisis de expresión de los genes *RPL* y *BP*, pusieron de manifiesto que estos genes aumentaban significativamente su expresión en mutantes *ap2*, lo que indica una regulación negativa de *AP2* sobre estos genes de identidad de replum que sería independiente de la acción de *FUL* (Ripoll *et al.*, 2011). Estos resultados son concordantes con el hecho de que *AP2* funcione como regulador negativo en un gran número de procesos de desarrollo, debido, como ya hemos mencionado, a su dominio EAR terminal (Hiratsu *et al.*, 2002, 2004; Tiwari *et al.*, 2004; Liu and Karmarkar, 2008; Szemenyei *et al.*, 2008; Pauwels *et al.*, 2010; Gallavotti *et al.*, 2010). En cuanto al margen de valva, a

raíz del uso de líneas reporteras *SHP2::GUS* e *IND::GUS*, se ha determinado que *AP2* regula negativamente a estos genes de identidad de valva, aunque no se sabe muy bien si de manera directa o indirecta. Además, en experimentos realizados por el mismo grupo, se demostró que, también en este caso, *FUL* regula negativamente la actividad de *AP2* en el fruto, aunque en este caso de manera indirecta, a raíz de la activación directa del miRNA172 en las valvas (Ripoll *et al.*, 2015).

Centrándonos ahora en *SNZ* y *TOE3*, ambos juegan un papel importante en el control de la floración. En el caso de *SNZ*, como represor de la floración (Schmid *et al.*, 2003), mientras que *TOE3* aún no se sabe con certeza su papel, pero se piensa que podría actuar aguas debajo de *AP2* y *SMZ* (Yant *et al.*, 2010; Mathieu *et al.*, 2009). Además, en trabajos realizados anteriormente por Irene Martínez y Vicente Balanzà en este laboratorio, se comprobó que *FUL* también se une a las regiones reguladoras de los genes *TOE3* y *SNZ*, y que la expresión de ambos aumenta en mutantes *ful*. Por lo tanto, parece que ambos están sujetos a una regulación similar a la de *AP2*, y podrían jugar también un papel fundamental en el control de los meristemas y, por tanto, en el GPA. Sin embargo, esta posible implicación y su grado se desconocen hoy en día. Tampoco se tiene información de si estos genes juegan un papel importante en el desarrollo del fruto como se ha demostrado que ocurre con *AP2*. El esclarecimiento de estas dos cuestiones, es otro de los grandes objetivos de este TFM.

### 3. Antecedentes y Objetivos

Con este trabajo, hemos querido contribuir al esclarecimiento de dos procesos del desarrollo de las plantas con flores: la Parada Global de la Proliferación (GPA) y el desarrollo del margen de valva. Trabajos previos realizados en el laboratorio de la Dra. Ferrándiz han revelado un papel clave del gen APETALA2 (AP2) en la regulación de la parada global de la proliferación de los meristemas (GPA, del inglés Global Proliferative Arrest). El mecanismo propuesto indica que tanto AP2, como otros miembros pertenecientes a su misma familia génica (*SNZ* y *TOE3*) estarían implicados en el control de la actividad del meristemo apical del tallo (SAM), promoviéndola. En el contexto del SAM, los genes de la familia AP2 están altamente regulados, tanto al nivel transcripcional por la acción del gen *FRUITFULL*, como a nivel post-transcripcional por la acción del microRNA172 (*miR172*). La acción conjunta de ambos mecanismos de regulación asegura que los niveles de los genes AP2 sean bajos en el momento del GPA, deteniéndose así la actividad del SAM (Balanzà et al., 2018; Aukerman and Sakai., 2003; Chen et al., 2004). Por otro lado, también se ha relacionado al gen AP2 en la regulación del margen de valva, donde participaría en la represión de los genes de identidad de este tejido, *SHATTERPROOF*, *IND* y *ALC* y donde, de nuevo, la regulación por el *miR172* juega un papel clave (Ferrándiz et al., 2000; Liljegren et al., 2000, 2004; Ripoll et al., 2015)

Previamente, en el laboratorio de Cristina Ferrándiz, se han diseñado estrategias biotecnológicas encaminadas a la modificación del GPA: se diseñaron versiones mutantes del gen *AP2* resistentes a la regulación por *miR172* y se dirigió su expresión al SAM mediante el uso del promotor del gen *TFL1*, evitándose así los efectos pleiotrópicos de su sobreexpresión. Con esta estrategia, se obtuvieron plantas con un incremento de frutos del 40% en los mejores casos, sin mostrar penalizaciones en ningún otro proceso de la planta (Martínez et al., 2017).

Basándonos en esta estrategia biotecnológica llevada a cabo con *AP2*, surgen los dos objetivos principales de este Trabajo de Fin de Master. El primero, consiste en desarrollar estrategias adicionales que permitan manipular el GPA, utilizando para ello diferentes formas alélicas resistentes a la degradación por *miR172* de los genes *SNZ* y *TOE3*, de la misma familia que *AP2*, y dirigiendo su expresión al SAM. El segundo objetivo, por su parte, consiste en determinar si las diferentes formas alélicas resistentes a la degradación por *miR172* generadas para los genes *AP2*, *TOE3* y *SNZ* pueden ser utilizadas también para manipular la dehiscencia de los frutos, dirigiendo para ello su expresión al margen de valva. En concreto, queremos determinar si pueden retrasar la dehiscencia, un carácter no deseado en la mayoría de los casos a nivel agronómico. Estos objetivos han sido concretados en los siguientes objetivos particulares, que se corresponden con las etapas seguidas en la realización del trabajo:

1. Generar alelos de *SNZ* y *TOE3* resistentes a la degradación por el *miR172*.
2. Obtener plantas que sobreexpresen estas versiones resistentes generadas y pre-caracterizarlas para determinar el efecto de estos alelos en la función de las proteínas.
3. Obtener plantas con expresión dirigida al SAM de los diferentes alelos obtenidos para *SNZ* y *TOE3* y pre-caracterizarlas a fin de obtener alguna conclusión preliminar de su utilidad para modificar el GPA.
4. Obtener plantas con expresión dirigida al margen de valva de los diferentes alelos obtenidos para *AP2*, *SNZ* y *TOE3* y pre-caracterizarlas a fin de obtener alguna conclusión preliminar de su utilidad para modificar la dehiscencia.
5. Caracterizar el efecto en el desarrollo del margen de valva de diferentes alelos mutantes de *AP2*: *ap2-2*, *ap2-5*, *ap2-6* y *ap2-7* para entender mejor el papel de este gen en el proceso.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Cultivo de *Escherichia coli*

#### 4.1.1. Cultivo líquido de *Escherichia coli*

El medio LB (Luria-Bertani) contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. Se ha utilizado este medio para cultivar estirpes de *Escherichia coli*. Para preparar 1 L de medio, se disuelven 10 g de triptona (Panreac), 10 g de NaCl (Duchefa) y 5 g de extracto de levadura (Duchefa) en 800 mL de agua desionizada. Tras ello, se enrasa la disolución hasta 1 L con agua desionizada, para obtener unas concentraciones finales de: 1% (m/v) de triptona, 1% (m/v) de NaCl y 0,5% (m/v) de extracto de levadura. Finalmente, se esteriliza en un autoclave a 120°C y una presión de 1 bar durante 20 min hasta que sea requerido su uso. La temperatura óptima para su conservación es de 4°C.

##### 4.1.1.1. Suplementación de antibióticos a medio LB

En ciertos casos, para facilitar la selección de determinadas estirpes, se añadió espectinomicina, kanamicina o cloranfenicol al medio LB. Se tratan de antibióticos muy eficaces frente a bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, aunque tanto la espectinomicina como la kanamicina también pueden ser efectivos frente a bacterias Gram positivas. En cuanto al mecanismo de acción, el cloranfenicol y la espectinomicina son bacteriostáticos, mientras que la kanamicina es bactericida. Tras autoclavar el medio LB y atemperar en un baño a 55°C, a partir de una disolución madre, se añadió el antibiótico correspondiente dependiendo de la finalidad. La concentración final de trabajo del cloranfenicol y la espectinomicina debe ser de 100 mg/L, y la de kanamicina de 50 mg/L. La disolución madre de ambos antibióticos se obtuvo disolviendo los mismos en agua desionizada y esterilizando por filtración con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore).

##### 4.1.1.2. Cultivo sólido de *Escherichia coli*

Para el cultivo de *E. coli*, se utilizaron placas de Petri con medio LB sólido, con o sin suplemento de antibióticos en función de la conveniencia. Para ello, al medio LB líquido preparado, antes de autoclavarse, se le añaden 3 g agar bacteriológico, alcanzando así una concentración final de 3% (m/v). Tras ello, se autoclava la disolución en las mismas condiciones que el LB líquido y se deja atemperar a 55°C en un baño termostatzado. Una vez atemperado, se vierte la disolución en placas de Petri de 9 cm en una cabina de flujo laminar, logrando las mejores condiciones de esterilidad posibles, y se deja solidificar. Cuando el LB ha solidificado en las placas, para su conservación óptima, deben almacenarse a una temperatura de 4°C.

### 4.2. Cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

#### 4.2.1. Cultivo líquido y cultivo sólido de *Agrobacterium tumefaciens*

Al igual que *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* se cultiva en medio LB. La preparación tanto del cultivo líquido como del cultivo sólido es la misma que la descrita anteriormente. Sin embargo, para el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*, se suplementaron los medios con rifampicina, rifampicina y kanamicina, o rifampicina y espectinomicina en función de las necesidades. La rifampicina es un antibiótico semisintético derivado de rifamicina con un mecanismo de acción bactericida que inhibe la acción de la polimerasa de ARN dependiente de ADN, inhibiendo así el crecimiento de bacterias tanto gram negativas como gram positivas. La concentración final de trabajo de la rifampicina es de 50 mg/L, y la disolución madre utilizada para suplementar los medios se obtiene disolviendo dicho antibiótico en etanol al 90%.

### 4.3. Cultivo y manipulación de los microorganismos

#### 4.3.1. Condiciones de cultivo para los microorganismos

Para lograr el crecimiento óptimo de los microorganismos en cultivo líquido, se hizo uso de cabinas termostatzadas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). Estas cabinas están provistas de agitadores, por lo que, además de lograr una temperatura óptima de crecimiento, se

puede mantener una agitación orbital adecuada, un factor muy importante en el cultivo de microorganismos. Para el caso de *E. coli*, se incubó en cabinas a 37°C durante aproximadamente 16 horas con una agitación orbital de 225 rpm. En cuanto a *A. tumefaciens*, se incubó en cabinas a 28°C durante 24 horas, también con una agitación orbital de 225 rpm. Con intención de lograr unas condiciones de oxigenación adecuadas, los cultivos se prepararon en recipientes estériles de, al menos, 2,5 veces más volumen que el volumen de cultivo.

Para el cultivo sólido, las placas de Petri se incubaron también en estas cabinas termostalizadas, pero sin hacer uso del agitador orbital. En caso de *A. tumefaciens*, necesita 48 horas a 28°C en lugar de 24 horas para poder crecer en cultivo sólido. Para *E. coli*, las condiciones se mantienen con respecto al cultivo líquido.

### 4.3.2. Transformación de los microorganismos

En primer lugar, se descongela en hielo una alícuota de células competentes que proceda. A continuación, se añade 1 µl de DNA y se homogeniza. La mezcla se introduce en una cubeta de 0.1 cm de separación entre electrodos (BioRad), previamente enfriada en hielo y se somete a un pulso de corriente eléctrica de 1600 V. Para ello se utiliza el aparato GenePulse TM (BioRad). Tras el pulso de corriente eléctrica se añade a la cubeta 1 ml de LB sin antibióticos, y las células se transfieren a un eppendorf limpio, donde se incuban durante 1 hora a 37°C para *E.coli* y 3h a 28°C para *A.tumefaciens*. Transcurrido ese tiempo, se plaquean 50 µl en placas de LB sólido con el antibiótico correspondiente para la selección. El volumen restante, se plaquea en otra placa con las mismas características.

Las estirpes bacterianas utilizadas y su uso se reflejan en la [Tabla 1](#):

**Tabla 1.-** Características los microorganismos utilizados en este trabajo

Bacteria	Estirpe	Origen/Referencia
<i>Escherichia Coli</i>	Supercharge EZ10	Clontech
<i>Escherichia Coli.</i>	DB3.1	Promega
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 pMP90	Koncz y Schell (1989)

## 4.4. Cultivo de *Arabidopsis thaliana*

### 4.4.1. Siembra en maceta

Las semillas se sembraron en macetas de plástico de 12 cm de diámetro o en alveolos de plástico de 6.5 x 6.5 x 5 cm con una mezcla de turba: perlita: vermiculita (2:1:1), previamente esterilizada a 80°C durante 20 minutos y humedecida con agua potable antes de la siembra. Las macetas/alveolos se colocaron en bandejas y se cubrieron con film plástico. Tras ello, se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante aproximadamente 3 días a fin de sincronizar así la germinación, un proceso denominado estratificación. Transcurrido ese tiempo, se trasladaron a una cabina de invernadero o 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. Tras la germinación de las semillas y la aparición de las primeras hojas, se agujereó el film plástico en distintos puntos de la bandeja, permitiendo una transición paulatina a menores condiciones de humedad hasta, finalmente, retirar el plástico por completo. Las bandejas se regaron por inmersión con agua destilada y, una vez a la semana, con solución Hoagland n° 1, suplementada con oligoelementos (Hewitt and Eden, 1953).

### 4.4.2. Recolección de semillas

Para mantener los linajes de las plantas de trabajo, se mantuvieron estas en el invernadero hasta que se secaron por completo. Tras ello, con ayuda de un colador se recolectaron las semillas, y, tras

dejarlas secar 2 días a 37°C, se almacenaron en tubos *ependorf* dentro de una cámara del IBMCP con una temperatura de 10°C, unas condiciones de humedad del 25% y completa oscuridad.

#### 4.4.3. Transformación mediante agroinfiltración

Para la transformación, sembramos en macetas grandes de 12 cm de diámetro unas 12 semillas de la estirpe Col-0 y las dejamos crecer en el invernadero como se ha descrito previamente. Una vez las plantas han experimentado el alzado de la inflorescencia o *bolting*, y cuando la última hoja caulinar se ha separado un poco del ápice, éste último se corta para inducir así el crecimiento de las inflorescencias laterales, obteniendo así más material que poder agroinfiltrar. El tiempo que tarda una planta desde que es sembrada hasta que se le corta el ápice es aproximadamente un mes.

Tres días antes de la infiltración, se inocula *Agrobacterium* en un tubo falcón con 4 mL de LB y los correspondientes antibióticos (4 µL de Rifampicina + el antibiótico que proceda), y se deja crecer a 28°C en agitación durante 24 horas. Al día siguiente, se inoculan unos 200 µL de este precultivo en 400 ml de LB con los mismos antibióticos, y se deja crecer durante 24 horas a 28°C con agitación.

El día de la transformación, se deben quitar todas las flores abiertas, semiabiertas y las silicuas de las plantas que se van a infiltrar, para disminuir la posterior recolección de semillas resultantes de una autofecundación previa a la transformación. Antes de la infiltración, los precultivos de *A. tumefaciens* que se dejaron creciendo el día anterior se precipitan a 5000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se resuspende el pellet en 400 mL de solución de infiltración. Ese cultivo de *Agrobacterium* resuspendido se vierte en un vaso de precipitados del tamaño aproximado de la maceta donde se encuentran las plantas a transformar. Finalmente, volcamos la maceta de *Arabidopsis* en el interior del vaso de precipitados de manera que los ápices queden bien introducidos en la solución de infiltración con *Agrobacterium* durante 30 segundos.

Tras este proceso, se colocan las plantas tumbadas en las bandejas donde crecieron y se tapan con film de plástico. Se dejan durante un día debajo de las mesas del invernadero, para evitar una gran incidencia de luz, y se retira el film plástico. Cuando comiencen a secarse las silicuas, se recogen las semillas conjuntamente y se dejan secar en la estufa a 37°C.

La solución de infiltración está formada por sacarosa, ácido 2-[N-morfolino]-etano sulfónico (MES) 2,3 mM y Silwet L-70. Concretamente, para un litro, mezclamos 50 g de sacarosa, 0,1 g de MES y ajustamos el pH a 5.9 con ayuda de NaOH. Tras ello, añadimos 100 µL Silwet L-70 por cada 400 mL de disolución para aumentar la tensión superficial de esta y facilitar su adhesión a las plantas.

#### 4.4.4. Fijación de tejido vegetal

En nuestro caso, hemos fijado silicuas para observar la acumulación de lignina en diferentes plantas mediante técnicas histológicas. Para ello, tras crecer las plantas pertinentes en el invernadero como se ha detallado anteriormente, se recolectaron frutos en estado de maduración 17/18, cuando empiezan a amarillear y acumular lignina (Roeder *et al.*, 2006). En ese estado, se separaron las silicuas con ayuda de unas pinzas metálicas y se seccionaron mediante cortes transversales con ayuda de un bisturí en fragmentos de aproximadamente 4 mm. Tras ello, las introducimos inmediatamente en FAE (10% Formaldehído 37%, 50% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial), preparado antes de cortar el tejido vegetal e introducido en tubos de plástico con tapón metálico. Se trata de un fijador químico que detendrá procesos enzimáticos de autólisis, preservará componentes tisulares, protegerá frente a bacterias, aumentará la dureza del tejido y facilitará la difusión de determinados compuestos útiles en microscopía. Todo ello, es muy importante para aplicar posteriormente técnicas de microscopía. A continuación, utilizando una bomba de vacío, se someten las muestras a vacío para extraer el aire de su interior, siendo ocupado por el FAE. Para ello, se somete la muestra a 3 vacíos de 10 min cada uno, hasta que las silicuas dejan de flotar y caen al fondo de los recipientes. Una vez hecho el vacío, se lleva a cabo el proceso de deshidratación, una serie de lavados con etanol: etanol 50% 30 min; etanol 70% 30 min; etanol 70% hasta que corresponda utilizarlas. El siguiente paso sería su inclusión en parafina, como se detalla en el punto 4.6.1. Todos los reactivos se prepararon en el laboratorio a partir de etanol 100% y etanol 96% (VWR International), Formaldehído 37% (Emsure®), Ácido Acético glacial 100% (Emsure®).

## 4.5. Manipulación de ácidos nucleicos

### 4.5.1. Síntesis de oligonucleótidos

La mayoría de los cebadores empleados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron diseñados por nosotros, basándonos en la secuencia de la región codificante (*cds*; *coding sequence*) del gen y el propósito de la amplificación. También se utilizaron cebadores ya descritos para algunas secuencias de uso muy extendido. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

En primer lugar, diseñamos cebadores para amplificar diferentes versiones mutantes de los genes *TOE3* y *SNZ* mediante la técnica “Overlap Extension Polymerase Chain Reaction” (Overlap Extension PCR) que se detallará en 4.5.3. Para ello, diseñamos un par de cebadores (*forward* y *reverse*) externos comunes para cada gen, y un par de cebadores internos (*forward* y *reverse*) específicos para cada versión mutante que incluían la mutación deseada además de solapar entre ellos. Estos cebadores se detallan en la [Tabla 2](#). Con este propósito, también recurrimos al diseño de cebadores largos que incluían directamente la mutación deseada, sin necesidad de realizar Overlap Extension PCR, como se explica en 4.5.3. Estos cebadores se muestran en la [Tabla 2](#).

Por otro lado, se diseñaron cebadores que permitiesen amplificar los promotores de los genes *SHP2* e *IND*. Para el diseño, tuvimos en cuenta la domesticación que requieren los genes cuando se va a utilizar la tecnología “GoldenBraid” para la obtención de vectores finales de expresión en planta, como se detalla en el apartado 4.5.7.2.

A fin de determinar las condiciones idóneas para las amplificaciones por PCR, la temperatura de fusión ( $T_m$ ; *melting temperature*) de todos los cebadores diseñados se calculó utilizando una herramienta que proporciona la página web de la empresa Thermo Fisher Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/>). Mediante esta herramienta se puede estimar la temperatura de fusión idónea para cebadores en reacciones de PCR en las que se utilizan las polimerasas de ADN *Phusion*, *Taq* o *Platinum SuperFi*. Las  $T_m$  calculadas para los cebadores están detalladas en la [Tabla 2](#), [Tabla 3](#), [Tabla 4](#) y [Tabla 5](#).

### 4.5.2. Moldes utilizados para amplificación por PCR

Para la amplificación de las versiones mutantes de los genes *TOE3* y *SNZ*, se utilizó ADN complementario (ADNc) mientras que para la obtención de los promotores de *SHP2* e *IND* se utilizó ADN genómico (ADNg).

#### 4.5.2.1. Extracción de ADNg

La línea de *Arabidopsis thaliana* empleada para obtener todos los moldes de ADN empleados en las diferentes reacciones fue el ecotipo silvestre Col-0 (Redei, 1962). En primer lugar, haciendo uso de pinzas metálicas, se obtienen unos 10 mg del tejido vegetal requerido y se conserva en tubos *ependorf* embebidos en hielo (las pinzas se lavan con alcohol de 98°C tras coger cada hoja para evitar contaminaciones de ADN). Tras ello, se añaden 200  $\mu$ L de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH7.5 y 0.5% SDS en agua destilada) y se trituran las hojas con ayuda de pistilos de plástico. Una vez trituradas completamente, se añaden otros 200  $\mu$ L de tampón de extracción y se agita con el vortex durante 5 segundos. Tras ello, se centrifuga la mezcla a 13.000 rpm (15.600g) durante 2 min y se transfieren 300  $\mu$ L del sobrenadante de cada tubo a tubos nuevos previamente rotulados, descartando el pellet. En estos nuevos tubos, se añaden 300  $\mu$ L de isopropanol y se mezcla por inversión varias veces. Tras homogeneizar, se incuban los tubos a temperatura ambiente durante 2 min y se centrifuga nuevamente a 13.000 rpm durante 5 min. Se desecha el sobrenadante y se lava el pellet con 300  $\mu$ L de etanol 70%. Por último, se centrifugan dichos tubos a 13.000 rpm durante 5 min y se desecha el etanol, dejando secar el precipitado hasta el día siguiente cubriendo los tubos con papel de aluminio. Una vez seco, se resuspende el pellet con 25-50  $\mu$ L de agua destilada y se conserva a 4°C en la nevera hasta su uso.

#### 4.5.2.2. Obtención de ADNc

El ADNc se obtuvo a raíz de la retrotranscripción de ARNm extraído de diferentes tejidos de la estirpe silvestre Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Para obtener el ARN se utilizó el sistema

*E.Z.N.A. Plant RNA Kit (OMEGA)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Posteriormente, para obtener el ADNc a partir de 2 µg del ARNm extraído, se siguió el protocolo del kit *SuperScript<sup>®</sup> IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen)

**Tabla 2.-** Cebadores utilizados en la técnica Overlap Extension PCR

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
<i>TOE3</i> Ext. F.	ATCGCAAAGAGAAAAGAAGCG	55,1
<i>TOE3</i> Ext. R.	GTTCTGCACTTTGCCATAAGC	56,4
<i>TOE3</i> <sub>m3</sub> <sup>170</sup> Int. F.	ATGGCGGCGTCTTCTGAGTTTTCTCCTCAACCTTCCCCTTACC	77,1
<i>TOE3</i> <sub>m3</sub> <sup>170</sup> Int. R.	AAAACCTCAGAAGACGCCGCCATTCCCACCACTCGATTTCC	76,1
<i>TOE3</i> <sup>170</sup> Int. F.	TGGCAGCATCATCAGAATTCTCTCCTC	65,9
<i>TOE3</i> <sup>170</sup> Int. R.	AGAATTCTGATGATGCTGCCATTC	61,0
<i>TOE3 trunc.</i> R.	TCACACCACTCGATTTCTCCTCC	61,3
<i>SNZ</i> Ext. F.	CAAATAGAGCCAAAAGTGGC	53,8
<i>SNZ</i> Ext. R.	AATAGGGTATCACCGACCACC	57,8
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> <sup>170</sup> Int. F.	GTAGTTGCTTCTTCTGAGTTTCCTTTTCATTACCATGATCAATC	68,6
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> <sup>170</sup> Int. R.	AAACTCAGAAGAAGCAACTACTGTCTTTAACGGTTTAATTTTC	67,6
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> Int. F.	GTAGTTGCTTCTTCTGGGTTTCCTTTTCATTACCATGATCAATC	69,9
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> Int. R.	AAACCCAGAAGAAGCAACTACTGTCTTTAACGGTTTAATTTTC	68,9
<i>SNZ</i> <sup>170</sup> Int. F.	GTTGTAGCATCATCAGAATTCCCTTTTCATTACCATGATCAATC	68,8
<i>SNZ</i> <sup>170</sup> Int. R.	GAATTCTGATGATGCTACAACCTGTCTTTAACGGTTTAATTTTC	66,9
<i>SNZ trunc.</i> R.	AGCCTGGTACAAGGAGCAAA	54,7

Ext. F: Forward Externo. Ext. R.: Reverse Externo. Int. F: Forward interno. Int. R: Reverse Interno

**Tabla 3.-** Cebadores largos diseñados para mutagénesis dirigida directa

Cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> <sup>170</sup> R.	TCATGGATCAAAACAAGATAAGGACAAAGAAGAAGGATTGATCATGGTAATGAAAGG AAACTCAGAAGAAGCAACTACTGTC	76,0
<i>SNZ</i> <sub>m3</sub> R.	TCATGGATCAAAACAAGATAAGGACAAAGAAGAAGGATTGATCATGGTAATGAAAGG AAACCCAGAAGAAGCAACTACTGTC	76,6
<i>SNZ</i> <sup>170</sup> R.	TCATGGATCAAAACAAGATAAGGACAAAGAAGAAGGATTGATCATGGTAATGAAAGG GAATTCTGATGATGCTACAACCTGTC	76,1

**Tabla 4.-** Cebadores utilizados para obtener la región promotora de *IND* y *SHP2*

Cebador	Secuencia (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>SHP2</i> F.	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGGAAATCCAAAGTCTTGGGTTTAG	77,7
<i>SHP2</i> R.	GTTCTGCACTTTGCCATAAGC	59,6
<i>IND</i> F.	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGGAACTAGAAATTGACACCAAAAATC	76,4
<i>IND</i> R.	GCGCCGTCTCGCTCACATTTTTCATCTTTTCTTATTTCTCAATATATATAT	69,9

**Tabla 5.-** Cebadores universales utilizados para secuenciación de construcciones

Uso	Cebador	Secuencia (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)
Secuenciación PCR8/GW/TOPO	GW2	GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA	58,9
Secuenciación PCR8/GW/TOPO	M13 R.	CAGGAAACAGCTATGAC	50,7
Secuenciación pUPD2	pUPD2 R.	CAGGGTGGTGACACCTTGCC	65,1

#### 4.5.2.3. Obtención de ADNc

El ADNc se obtuvo a raíz de la retrotranscripción de ARNm extraído de diferentes tejidos de la estirpe silvestre Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Para obtener el ARN se utilizó el sistema *E.Z.N.A. Plant RNA Kit (OMEGA)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Posteriormente, para obtener el ADNc a partir de 2 µg del ARNm extraído, se siguió el protocolo del kit *SuperScript<sup>®</sup> IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen)

#### 4.5.3. Amplificación por PCR

Se han realizado amplificaciones por PCR tanto para obtener versiones mutantes de *SNZ* y *TOE3* como para amplificar los promotores de los genes *SHP2* e *IND*, susceptibles todos ellos de ser clonados en distintos vectores y mediante diferentes técnicas. Además, también la hemos usado a modo de comprobación de diferentes construcciones como se detallará a continuación.

Para la obtención de los alelos mutantes, hemos recurrido, en primer lugar, a la técnica *Overlap Extension PCR*. Para ello, utilizando el mismo molde, hemos realizado, en primer lugar, dos amplificaciones por PCR independientes: en cada una, empleando un cebador *forward* o *reverse* externo del gen (el inicial o el final) y, respectivamente, otro cebador *reverse* o *forward* interno de la CDS (región codificante) que contiene las mutaciones que queremos introducir en el gen además de una presentar una región solapante entre dichos cebadores internos. De esa forma, tras la reacción, obtenemos dos fragmentos de ADN de la CDS en cuestión con mutaciones en un lugar interno específico y solapantes entre ellos en dicha región. Tras amplificar dichos fragmentos de forma independiente, los hemos purificado, bien de gel o bien del producto de PCR, tal y como se detalla en [4.5.5.](#), y hemos realizado una segunda reacción de PCR utilizando dichos fragmentos solapantes como molde junto con los cebadores externos del gen utilizados en el primer paso: Fruto de esta segunda reacción, se obtiene la CDS del gen completa con las mutaciones en el lugar deseado gracias a que, como ambos fragmentos presentan una región solapante, la polimerasa los extiende de forma conjunta

para generarse finalmente un solo fragmento a partir de los dos generados anteriormente en reacciones PCR independientes. Para cada una de las reacciones, hemos utilizado la polimerasa *Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) en un volumen final de reacción de 50  $\mu\text{L}$ , utilizando para ello los siguientes reactivos: tampón *5X Phusion Green HF Buffer* a concentración final 1x; mezcla de 4 dNTPs, a concentración final 0,8 mM para cada nucleótido; cebadores correspondientes de entre los indicados en la Tabla 2, cada uno a una concentración final 1  $\mu\text{M}$ ; enzima *Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase* a una concentración final de 0,02 U/ $\mu\text{L}$ ; molde de ADNc, obtenido como se especifica en el apartado [4.5.2.2](#).  $\text{MgCl}_2$  a una concentración final 10 mM. En algunos casos, el tampón utilizado fue *5X Phusion Green GC Buffer* a la misma concentración final, a fin de incrementar la eficiencia de amplificación de fragmentos de ADN muy ricos en citosina y guanina.

Estas reacciones se han llevado a cabo en un termociclador *SureCycler 8800* (Agilent Technologies). Los programas usados para ello se inician con una etapa de desnaturalización del ADN a 95°C durante 1 min. Tras ello, hemos recurrido a la denominada *Técnica Touchdown* que permite este termociclador. Esta técnica, consiste en hacer 10 ciclos en los que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los cebadores, indicada en la Tabla 2, comienza 5°C por encima de la correspondiente y se va disminuyendo medio grado cada ciclo hasta alcanzar la  $T_m$  óptima. De esta forma, a altas temperaturas de trabajo, solo se permite la hibridación de los cebadores en zonas con mayor complementariedad, y se va enriqueciendo el producto que deseamos amplificar, evitando que se amplifiquen otras zonas por hibridaciones inespecíficas que las bajas temperaturas permiten. Una vez la temperatura cae hasta la temperatura óptima de fusión de los cebadores, aunque sea más baja, el producto que se quiere amplificar estará enriquecido en la reacción, y no se amplificarán otros productos indeseados por hibridaciones más inespecíficas. Hemos utilizado esta técnica en todas las reacciones de PCR realizadas en este trabajo a fin de mejorar los resultados de dichas reacciones. Tras el *Touchdown*, se llevan a cabo 35-40 ciclos que constan de: otra etapa inicial de desnaturalización a 96°C durante 30 s; una etapa de hibridación de los cebadores al molde, a la temperatura de fusión indicada en la Tabla 2 (usando la temperatura más baja de entre cada pareja de cebadores) durante 30 s; y una etapa de síntesis a 72°C, con una duración variable proporcional a la longitud de la secuencia a amplificar y de eficacia de la enzima de trabajo (15-30 s/kb en caso de la *Phusion Green High-Fidelity DNA Polymerase*). Tras finalizar estos ciclos, la PCR se completa con una etapa final de extensión a 72°C durante 5 min. Esta amplificación se mantiene a 4°C hasta su requerimiento.

Para generar versiones mutantes del gen *SNZ*, también recurrimos al uso de cebadores largos que incluyesen directamente la mutación deseada, aprovechando que la región a mutar se encontraba muy cerca de la región C terminal, y pudiendo amplificar así directamente la versión mutante de interés a raíz de una sola reacción de PCR sin necesidad de recurrir a la técnica *Overlap Extension PCR*. Estos cebadores y su  $T_m$  se muestran en la Tabla 3. Las condiciones de PCR utilizadas son exactamente las mismas que las comentadas para la *Overlap Extension PCR*.

En cuanto a la amplificación de las regiones promotoras de *IND* y *SHP2*, se utilizó como molde ADNg, obtenido tal y como se detalla en el apartado [4.5.2.1](#). En cuanto al resto, tanto la enzima utilizada como las condiciones de la PCR, fueron exactamente las mismas que las comentadas anteriormente, utilizando para ello los cebadores reflejados en la Tabla 4. En este caso, al amplificar fragmentos de mayor tamaño, la etapa de extensión a 72°C fue ligeramente más larga que para la obtención de las versiones mutantes de *SNZ* y *TOE3*.

Finalmente, también se usó la PCR para comprobar que los clones bacterianos obtenidos por distintas técnicas que se verán posteriormente contenían el inserto de interés. En este caso, al tratarse de una comprobación y no haber necesidad de obtener fragmentos perfectos en cuanto a secuencia, utilizamos una enzima con menor fidelidad que la *Phusion*, la enzima *GoTaq® G2 DNA Polymerase* (Promega). El volumen final de reacción fue de 25  $\mu\text{L}$ , ajustando todos los componentes a la misma concentración final que en las reacciones descritas anteriormente a 50  $\mu\text{L}$ , excepto la *GoTaq* que se ajustó a 1 U/ $\mu\text{L}$ . Se utilizó para ello la pareja de cebadores requerida de entre las que se muestran en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5. Como molde, se picó la colonia que se quería testar con ayuda de una punta de micropipeta y se disolvió en la mezcla de reacción. En cuanto al buffer, se utilizó el *5X Green GoTaq® Reaction Buffer*, vendido junto a la enzima por Promega. Para las condiciones de la

PCR, tendimos a utilizar una  $T_m$  ligeramente menor a la mostrada en las tablas anteriores, debido a que la GoTaq requiere temperaturas menores que la Phusion (en torno a 3°C menos). Además, la temperatura de fusión también fue menor a fin de facilitar así la hibridación con la región que se quería amplificar entre toda la mezcla del material genómico y residuos de la bacteria en cuestión presentes en la reacción. El resto de condiciones utilizadas, fueron las mismas que las descritas con anterioridad.

#### **4.5.4. Electroforesis en gel de agarosa**

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa con una concentración del 1-2% (p/v) en tampón TBE (tris-borato EDTA) a 1x (la concentración pudo ser ligeramente superior o inferior en función de las necesidades). Los geles contenían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales Sub-Cell GT y Mini-Sub Cell GT conectados a una fuente de alimentación PowerPack™ Basic de Bio-Rad ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)). Para preparar el gel, disolvimos 1 g de agarosa en 100 mL de TBE, homogeneizando la mezcla mediante su calentamiento en un microondas y agitación manual. Una vez homogeneizado, se añadió el bromuro de etidio para permitir la posterior visualización del ADN al irradiarlo con luz ultravioleta. Finalmente, se vierte la disolución para que polimerice el gel de agarosa en un sistema de preparación de geles (*gel casting*) y se deja solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado, se cargan en el gel los productos de PCR añadiendo previamente tampón de carga 6X Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific) o no, en función de las necesidades (el tampón 5X Green GoTaq® Reaction Buffer, por ejemplo, ya incluía tampón de carga, mientras que los tampones de la Phusion no). Además, en una de las calles del gel añadimos siempre 5 µL de marcador de peso molecular *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder* o *GeneRuler Low Range DNA Ladder* (Thermo Scientific), para poder así estimar el tamaño de las amplificaciones observadas.

#### **4.5.5. Aislamiento y Purificación de ADN**

##### **4.5.5.1. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, según se describe en el apartado anterior. Los fragmentos de interés se recortaron del gel con ayuda de una cuchilla y el DNA se purificó con el sistema *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este sistema permite la purificación de fragmentos de DNA de 70 pb a 10 Kb, aunque fragmentos ligeramente más grandes también pueden ser purificados eficientemente.

##### **4.5.5.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de reacciones de PCR**

Una vez realizada la reacción de PCR, el fragmento amplificado de interés puede purificarse directamente desde la disolución de reacción utilizando el sistema *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se puede utilizar para purificar fragmentos de ADN de entre 25 bp y 20 kb con tasas de recuperación de hasta el 100%.

##### **4.5.5.3. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. Coli* y *A. Tumefaciens***

Se utilizó el sistema *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Scientific) siguiéndose las recomendaciones suministradas por la casa comercial. Se trata de un sistema que lisa las paredes de la bacteria y retiene el ADN por medio de un sistema de columnas, descartando el resto de material de la disolución. Una vez extraído el material plasmídico, se comprobaba la eficiencia de la purificación y la cantidad de material haciendo uso del espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. Este aparato, también fue utilizado en algunas ocasiones para cuantificar el material obtenido tras la purificación de fragmentos de ADN por cualquiera de los métodos descritos en [4.5.5.1](#) y [4.5.5.2](#).

##### **4.5.5.4. Comprobación y verificación de las secuencias genómicas**

En todo caso, para comprobar todas las construcciones que íbamos obteniendo, se recurrió al uso de PCR, técnica detallada en el apartado [4.5.3](#), digestión de ADN, como se detalla en [4.5.6](#) y secuenciación, descrita en [4.5.8](#).

#### 4.5.6. Digestión de ADN plasmídico

Para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 ml, con 5-10 unidades de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA, durante 1-2 horas a la temperatura óptima en cada caso. A continuación, se analizó el resultado de las diferentes reacciones mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa tal y como se detalla en [4.5.4](#). Si nuestra construcción es correcta (obtenida tras utilizar cualquiera de los métodos de clonación y generación de construcciones que describiremos posteriormente), se mostrará un patrón de bandas específico tras correr el gel, diferente del patrón que se obtendría si la construcción fuese incorrecta. Se trata así de un método ideal para la comprobación de construcciones.

#### 4.5.7. Clonación de las secuencias génicas

##### 4.5.7.1. Clonación en pCR8/TOPO/GW

pCR8/TOPO/GW (Invitrogen) es un vector lineal que presenta extremos cohesivos conformados por una repetición de varias timinas. Hemos utilizado este vector para clonar las diferentes versiones mutantes de los genes *TOE3* y *SNZ*, obtenidas tal y como se detalla en el punto [4.5.3](#). Para ello, siguiendo las instrucciones del fabricante, se realiza un paso inicial en el que se añade una cola de adeninas a los productos de PCR purificados de las versiones mutantes. Este paso no es necesario en la mayoría de los casos, pues casi todas las polimerasas provocan la aparición de esta adenina por defecto, pero no es el caso de la utilizada por nosotros, la *Phusion*. Para ello, se lleva a cabo una reacción con los siguientes componentes: 5X Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer a concentración final 1,25X;  $\text{MgCl}_2$  a concentración de trabajo de 2,5 mM; dATPs a concentración final 5 mM; enzima *GoTaq® G2 DNA Polymerase* ajustada a 1 U/ $\mu\text{L}$  y el molde de ADN al que añadirle las adeninas a una concentración variable en función de la eficacia de la PCR y el proceso de purificación posterior. Para la adición de las adeninas por parte de la polimerasa, la mezcla de reacción se colocó en el termociclador a 72°C durante 20 min. Inmediatamente después, para evitar que las adeninas añadidas de forma cohesiva se perdiesen, se mezclan 4  $\mu\text{L}$  del producto de esta reacción, con 1  $\mu\text{L}$  del vector y 1  $\mu\text{L}$  de sal (200 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, el vector presumiblemente pasaría de forma lineal a forma circular con nuestro inserto de interés y podría ser introducido en *E. coli*. El problema de esta técnica, es que no es direccional, y nuestro inserto puede introducirse en dos direcciones diferentes. Para comprobar que la dirección de la inserción era correcta, utilizamos la técnica detallada en el apartado [4.5.3](#), utilizando un cebador propio del inserto de entre los descrito en la Tabla 2 y Tabla 3, y un cebador universal propio del pCR™8/GW/TOPO, que se muestra en la Tabla 5. También se comprobó mediante digestión de ADN como se detalla en [4.5.6](#) y mediante secuenciación, descrita en [4.5.8](#)., todo ello tras aislar el ADN plasmídico como se detalla en [4.5.5.3](#).

En este caso, se utilizó la cepa Supercharge EZ10 de *E. Coli*, se usó el método descrito en [4.3.2](#), para transformarlas, se seleccionó suplementando el antibiótico correspondiente al medio comprobación.

##### 4.5.7.2. Clonación mediante el sistema de clonaje múltiple GoldenBraid

GoldenBraid (GB) es una plataforma estandarizada de ensamblaje de DNA desarrollada para facilitar la ingeniería multigénica en plantas mediante la incorporación simultánea de varios transgenes. GB permite la combinación binaria de múltiples ensamblajes y facilita la reusabilidad de las partes de DNA y dispositivos ensamblados para realizar eficazmente construcciones complejas (Sarrion-Perdigones et al. 2011; Sarrion-Perdigones et al. 2013; Sarrion-Perdigones et al. 2014).

Esta tecnología, cuenta de un primer paso de ensamblaje multipartito en el que se forman diferentes unidades transcripcionales a raíz del ensamblaje de diferentes módulos creados por uno mismo o ya existentes en colecciones disponibles. Por ejemplo, en nuestro caso, uno de estos módulos sería el promotor de *IND* o el de *SHP2*, que luego se ensamblarían mediante esta primera fase multipartita a un módulo de clonación *Gateway* y al terminador NOS (t-NOS). En este ejemplo concreto, el módulo de los promotores fue generado por nosotros, mientras que el módulo del terminador y el del sistema de clonación *Gateway* ya habían sido generados previamente. El primer paso para la generación de un

módulo es la domesticación del fragmento que se desea clonar. La domesticación pretende adaptar una secuencia de interés (promotor, CDS, terminador, etc.) y hacerla compatible al sistema GB. Para ello, se amplifica la pieza con oligonucleótidos que incorporen los sitios de clonaje *Bsmbl* flanqueando la secuencia de interés, y cuatro nucleótidos específicos entre esta diana y la secuencia de interés. Estas extensiones, permitirán que la secuencia de interés se inserte en el interior de pUPD2, un vector requerido para el uso de este sistema y que incorpora sitios de corte *Bsmbl* y *Bsal*. Además, la domesticación evitaría que nuestra secuencia de interés fuese cortada internamente por *Bsmbl* o *Bsal*, cosa que complicaría todo el proceso, mediante la eliminación de estos sitios de corte por mutagénesis dirigida (Overlap Extension PCR). La propia página de la tecnología GoldenBraid permite la domesticación automática de la secuencia que introduzcas y te provee de los protocolos requeridos para obtenerla (<https://gbcloning.upv.es/>). De esta manera, tras la domesticación, se obtienen las secuencias génicas de interés mediante reacciones de PCR como se detalla en el apartado 4.5.3. Tras ello, se lleva a cabo una reacción de restricción-ligación con la enzima *Bsmbl*, para unir el amplicón de la secuencia de interés con el vector pUPD2 con ayuda de un termociclador. Concretamente, se suele usar el siguiente programa: un paso inicial de 20 minutos a 37°C para asegurarnos del correcto corte de la enzima tanto al vector como a la secuencia; un siguiente paso de 25 ciclos de restricción-ligación, en los que se alternan temperaturas de 37°C durante 3 minutos y 16°C durante 4 min; y finalmente, se añade un paso de 50°C durante 10 minutos y un paso de 80°C durante 10 minutos para inactivar las enzimas. *Bsmbl* es una enzima de tipo 2, que reconoce una secuencia, pero no la corta, si no que corta en una parte adyacente a ella. Tras la reacción, desaparece el sitio de reconocimiento *Bsmbl* y se origina el de *Bsal*, quedando un remanente de 4 nucleótidos adyacentes a dicho sitio de reconocimiento para permitirse nuevamente la extracción del amplicón en cuestión con el uso de esta enzima. Tras la reacción, pUPD2 pierde su gen de selección, el gen *LacZ*, que, al sembrar las bacterias con un sustrato y un inductor, X-Gal e IPTG respectivamente, provoca una coloración azul en las colonias que lo poseen y permitirá la correcta selección de las colonias portadoras de la secuencia de interés, que no deberán tener color por pérdida de dicho gen. Además, pUPD2 porta un gen de resistencia a cloranfenicol, por lo que la siembra se hará en placas con dicho antibiótico para permitir únicamente el crecimiento de colonias que incorporan el vector. También se comprobará si las construcciones son correctas mediante digestiones de ADN como se explica en el apartado 4.5.7.2, y, finalmente, por secuenciación.

Tras la generación de los módulos, tiene lugar el ensamblaje multipartito de los mismos. Para ensamblar entre sí 3 piezas de DNA (PR+CDS+TM), previamente incorporadas al precursor, es necesario que se lleve a cabo una reacción de ligación entre los extremos protuberantes dejados tras la digestión con *Bsal* en dichas piezas. Cada vector precursor, pUPD, contiene la pieza original flanqueada por secuencias adicionales que contienen dianas de *Bsal*, como se ha explicado anteriormente. Sabiendo esto, en la reacción de restricción-ligación se pipetea en un mismo tubo: las distintas piezas GB que van a formar parte de la unidad transcripcional, el plásmido de destino, la enzima de restricción *Bsal* y su tampón. Tras la digestión con la enzima *Bsal*, la pieza original se desprende del precursor, quedando flanqueada por extremos protuberantes que constituyen en sí mismos las colas necesarias para el ensamblaje. Es decir, la cola en 3' de cada pieza aparece con la cola en 5' de la pieza subsiguiente, la cola en 5' de la primera pieza aparece con el sitio de corte tipo 1, y la cola en 3' de la última pieza aparece con el sitio de corte tipo 2 de los plásmidos tipo pDGB3- $\alpha$ . Para ello es necesario que el primer precursor contenga un sitio de corte para *Bsal* compatible con el sitio 1, el último precursor contenga un sitio de corte para *Bsal* compatible con el sitio 2 y las piezas adyacentes tengan extremos compatibles, logrando todo ello gracias al proceso de domesticación que ofrece la página de la tecnología GoldenBraid. El programa utilizado en el termociclador para esta reacción de ligación-restricción, es el mismo que hemos comentado anteriormente.

De esta forma, los diferentes módulos quedarían ensamblados formando una unidad transcripcional contenida en un vector pDGB3- $\alpha$ , apareciendo de nuevo los sitios de corte de *Bsmbl* para permitir de nuevo la salida de estas unidades transcripcionales. Este vector, previo a la reacción de ligación-restricción, también contiene el gen *Lac-Z*, por lo que la selección de colonias positivas se hará de la misma forma que lo comentado para p-UPD2. Además, porta un gen de resistencia a kanamicina, por lo que la siembra se hará en placas con dicho antibiótico para permitir únicamente el crecimiento de

colonias que incorporan el vector. Las unidades transcripcionales pueden introducirse en vectores pDGB3- $\alpha$ 1 o pDGB3- $\alpha$ 2, en función de, como veremos a continuación, el orden que queramos que aparezcan en el vector final, pDGB3- $\Omega$ .

Así termina el paso de ensamblaje multipartito para obtener unidades transcripcionales, y comienza el paso de ensamblaje binario de estas unidades transcripcionales en vectores finales pDGB3- $\Omega$ . Dos módulos ensamblados sobre pDGB3- $\alpha$ 1 y pDGB3- $\alpha$ 2 respectivamente pueden a su vez ser ensamblados entre sí, esta vez utilizando el enzima *Bsmbl* y un plásmido de nivel  $\Omega$ . Para ello, se realizó una reacción de restricción-ligación, pipeteando en un mismo tubo: la pareja de construcciones compatibles entre sí que se desee ensamblar, el plásmido de destino, la enzima de restricción *Bsmbl*, y su buffer correspondiente. Así, por ejemplo, en el vector final pDGB3- $\Omega$  quedarían, de izquierda a derecha, la unidad transcripcional contenida pDGB3- $\alpha$ 1 y la contenida en pDGB3- $\alpha$ 2 respectivamente. En esta segunda ronda de ensamblaje, y análogamente al caso anterior, los módulos construidos con plásmidos del nivel  $\Omega$  pueden nuevamente ensamblarse entre sí de forma binaria, utilizando la enzima *BsaI* y un plásmido de nivel  $\alpha$ , cerrando un bucle iterativo e indefinido de ensamblajes jerárquicos. Tanto los vectores pDGB3- $\alpha$  como los pDGB3- $\Omega$  contienen sitios LB y RB flanqueando el sitio de clonación. Así, combinando correctamente pDGB3 $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\Omega$ 1 y  $\Omega$ 2 de forma binaria, podremos decidir cómo quedará finalmente la estructura final entre los bordes LB y RB del ADN-T que *A. tumefaciens* integrará en el genoma de la planta. El programa utilizado en el termociclador para esta reacción de ligación-restricción binaria es el mismo que hemos comentado en los casos anteriores. El método de selección de colonias positivas también es similar, teniendo en cuenta que en caso de los vectores pDGB3- $\Omega$ , portan un gen de resistencia a espectinomicina en lugar de kanamicina, propio de los pDGB3 $\alpha$ .

Excepto para la primera fase de generación de módulos para los promotores de *IND* y *SNZ*, para la cual se usó la cepa Supercharge EZ10 de *E. Coli.*, para todo el resto del proceso se utilizó la cepa DB3.1 de *E. Coli.*, una cepa resistente al gen letal *ccdB* típico del cassette Gateway, permitiéndose así todo el trabajo descrito hasta la obtención de los vectores finales requeridos en este trabajo. Por lo demás, se usó el método descrito en [4.3.2.](#) para transformarlas, se seleccionó suplementando el antibiótico correspondiente al medio y atendiendo a las reacciones colorimétricas que ocasiona el gen *LacZ*. Finalmente, como ya se ha ido explicando, se recurrió a la comprobación de los clones mediante PCR como se explica en [4.5.3.](#), mediante digestión de ADN como se detalla en [4.5.6.](#) y mediante secuenciación, descrita en [4.5.8.](#) todo ello tras aislar el ADN plasmídico como se detalla en [4.5.5.3.](#)

#### 4.5.7.3. Clonación mediante el Sistema Gateway

La tecnología Gateway (Life Technologies) aprovecha el sistema de recombinación específica del fago  $\lambda$  (utilizada por este virus para integrarse en el genoma de *Escherichia coli*) para introducir fragmentos de ADN en vectores específicos.

En nuestro caso, la hemos utilizado para clonar las diferentes versiones mutantes de *SNZ* y *TOE3* en los vectores destino pDGB3- $\Omega$ 1 generados como se detalla en el apartado [4.5.7.2.](#)

Una vez obtenido el clon de entrada, el PCR8, tal y como se detalla en el apartado [4.5.7.1.](#), llevamos a cabo la *reacción LR*. En esta reacción, los sitios *attL1* y *attL2* del clon de entrada recombinan con los sitios *attR1* y *attR2* del vector de destino pertinente. Para ello, añadimos 4  $\mu$ l del clon de entrada a un tubo *ependorf*, 1  $\mu$ l del vector de destino que conviniese, 3  $\mu$ l de TE pH8 y 2  $\mu$ l de la clonasa LR (*Gateway LR Clonase II enzyme mix; Life Technologies*). Tras homogeneizar la mezcla, dejamos que la reacción se llevase a cabo a 25 °C durante 25 min y detuvimos la reacción mediante la adición de 1  $\mu$ L de proteinasa K (Invitrogen) en unas condiciones de 37°C durante 10 min.

De esta manera, obtuvimos vectores finales con los insertos de interés para lograr su expresión en plantas. De la misma forma, utilizamos esta tecnología para clonar las diferentes versiones mutantes de *SNZ* y *TOE3* en el vector pEarleyGate 100. Se trata de un plásmido comercial que contiene el promotor 35S y un sitio de clonación Gateway. De esta manera, recurriendo a la tecnología Gateway, obtuvimos vectores finales pEarleyGate 100 con nuestras versiones mutantes de interés, logrando así su sobreexpresión.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó la cepa Supercharge EZ10 de *E. Coli.*, que moriría en caso de una reacción LR fallida a causa del gen letal *ccdB* del cassette Gateway, permitiendo seleccionar fácilmente los clones adecuados. Además, se usó el método descrito en [4.3.2.](#) para

transformarlas, se seleccionó suplementando el antibiótico correspondiente al medio comprobación y se comprobó mediante PCR como se explica en [4.5.3](#), mediante digestión de ADN como se detalla en [4.5.6](#) y mediante secuenciación, descrita en [4.5.8](#), todo ello tras aislar el ADN plasmídico como se detalla en [4.5.5.3](#).

**Tabla 6.-** Características de los vectores utilizados en este trabajo

Nombre	Resistencia bacterias	Propósito	Origen
pUPD2	Cam <sup>R</sup>	Ensamblaje multipartito GoldenBraid	Addgene
pDGB3α	Kan <sup>R</sup>	Ensamblajes binarios GoldenBraid	GoldenBraid
pDGB3α	Spec <sup>R</sup>	Ensamblajes binarios GoldenBraid	GoldenBraid
pCR8/TOPO/GW	Spec <sup>R</sup>	Clonación de los alelos mutantes y posterior reacción Gateway	ThermoFisher
pEarleyGate 100	Kan <sup>R</sup>	Sobreexpresión de los alelos mutantes	SnapGene

Spec<sup>R</sup>: resistencia a espectinomicina. Kan<sup>R</sup>: resistencia a kanamicina. Cam<sup>R</sup>: resistencia a cloranfenicol

#### 4.5.8. Secuenciación y análisis de las secuencias de ADN

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia) con el sistema *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se realizó en termocicladores *ABI GeneAmp PCR System 9700*. La resolución y análisis de los productos se realizó en un secuenciador capilar *ABI 3100* de (Applied Biosystems). Las muestras de DNA se prepararon según se indica en [www.ibmcp.upv.es](http://www.ibmcp.upv.es), y se utilizaron los cebadores universales que se muestran en la Tabla 5. El análisis de las secuencias obtenidas se realizó con el software de análisis de secuencias Benchling.com.

### 4.6. Técnicas de microscopía e histología

#### 4.6.1. Inclusión en parafina

Tras deshidratar el material vegetal fijado y conservarlo en etanol 70%, las muestras se llevan al procesador automático Leica TP 1020 del IBMCP, que se encargará de la infiltración mediante parafina líquida de muestras las muestras histológicas. El procesador, dicho de forma general, lleva las muestras hasta etanol 100%, luego va aumentando poco a poco la proporción de Histoclear, hasta alcanzar una proporción 2:1 frente al etanol, y finalmente va aumentando poco a poco la proporción de parafina hasta quedar la muestra en parafina absoluta. Tras ello, con ayuda de la estación de inclusión Leica EG1150H, se confeccionan bloques de parafina con la muestra histológica en la orientación adecuada para su posterior corte.

#### **4.6.2. Cortes histológicos de los bloques de parafina**

Los bloques de parafina se cortaron haciendo uso de un micrótopo Leica RM2025. Las secciones se depositaron en un baño de agua a 40°C para extender al máximo las secciones, y se depositaron sobre un porta-objetos, dejando secar este toda la noche en una placa térmica a 40°C.

#### **4.6.3. Tinción de lignina con Floroglucinol**

En primer lugar, se procedió a la desparafinación del tejido. Para ello, los porta-objetos con las secciones se introdujeron en HistoClear (National Diagnostics) durante 5 minutos. Tras ello, a fin de intentar eliminar la máxima parafina posible, se hicieron lavados con etanol: etanol 100% 5 min, etanol 96% 5 min, etanol 70% 5 min, etanol 96% 5 min, etanol 100% hasta uso. Una vez llevado de nuevo a etanol 100%, se escurren los porta-objetos y se añade sobre ellos floroglucinol al 2% preparado previamente en el laboratorio (2 mg de floroglucinol en 1L de etanol 96%) y se deja actuar durante 2 minutos. Tras ello, se añaden unas gotas de ácido clorhídrico 35% para permitir la reacción por la que el floroglucinol teñirá la lignina. Finalmente, se escurre el porta y se añade glicerol al 50% para conservarla hasta su observación en un microscopio Leica DM5000. Todos los reactivos se prepararon en el laboratorio a partir de etanol 100% y etanol 96% (VWR International), Glicerol 100% (VWR International), Floroglucinol 99% (Sigma-Aldrich), Ácido Clorhídrico 37% (Sigma-Aldrich).

#### **4.7. Selección de plantas transgénicas**

Para seleccionar las semillas por fluorescencia, hemos hecho uso de la Lupa de fluorescencia MacroFluo (MZZ16F Leica), seleccionando, en nuestro caso, aquellas semillas con emisión de luz roja. También se ha utilizado el herbicida BASTA, rociando este sobre las plantas recién germinadas durante 48 horas durante dos semanas.

#### **4.8. Toma de fotografías**

Se utilizó una cámara digital Leica y una lupa Nikon SMZ800

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Generación de diferentes alelos de *TOE3* y *SNZ* resistentes a la regulación por *miR172*

La monocarpia es una estrategia de reproducción vegetal en el que la planta, después de un periodo de vida vegetativo, solo experimenta un ciclo reproductivo tras el cual entra en senescencia y muere. Es un ciclo vital característico de muchas angiospermas, incluyendo cultivos de gran interés económico como los cereales y las leguminosas, así como la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. En el ecotipo Columbia de esta especie, una de las estirpes silvestres más utilizadas en el laboratorio, la actividad de todos los meristemas cesa de forma casi simultánea aproximadamente 20 días después del desarrollo de las primeras estructuras florales (Hensel *et al.*, 1994). En este punto, la planta detiene totalmente el desarrollo de cualquier estructura y alcanza un estado final con un número determinado de flores, frutos y semillas. A ello le sigue la apertura de los frutos y la senescencia de la planta, hasta que, finalmente, se produce la muerte de la misma. A este fenómeno se le conoce como Parada Global de la Proliferación, o GPA (General Proliferative Arrest), por sus siglas en inglés. Como ya se explicó en el apartado [2.1.1.2](#), es clara la implicación de las semillas en desarrollo sobre el desencadenamiento de este fenómeno. Sin embargo, también se ha propuesto que debe haber un control genético que regule el GPA en función de la edad de la planta. A pesar de que hay muy poco conocimiento acerca de este control genético, en los últimos años se han hecho grandes avances al respecto en el laboratorio de Cristina Ferrándiz. En concreto, se ha llegado a la conclusión de que *FUL* promueve el GPA a través de la regulación negativa de *AP2* y otros genes de la familia *AP2-like* como *SNZ* o *TOE3*, genes que a su vez controlan, de manera directa o indirecta, el mantenimiento de *WUS* en el meristemo, principal regulador de la actividad de los mismos (Balanzà *et al.*, 2018). Todos estos genes *AP2-like*, además, están regulados negativamente por el *miR172*, un micro ARN que actúa sobre el ARN mensajero de dichos genes induciendo su degradación o impidiendo su traducción (Chen *et al.*, 2004; Kasschau *et al.*, 2003; Aukerman and Sakai, 2003). Previamente, en el laboratorio de Cristina Ferrándiz, se demostró las líneas mutantes *ap2-170* sufren un retraso en el GPA, dando lugar a plantas con mayor producción de frutos. Estas plantas portaban una mutación que producía una sustitución de G por A en el último exón de *AP2*, afectando a una base muy conservada en todos los genes *AP2-like* del sitio de reconocimiento del *miR172*. Esta guanina se muestra en la Figura 6. Estos resultados sugerían que restringiendo la regulación negativa que ejerce el *miR172* sobre *AP2* se producía un aumento de los niveles de este gen, logrando un retraso en el GPA. A este alelo mutante, se le denominó *AP2*<sup>170</sup>. Su sobreexpresión con un promotor CaMV35S producía efectos aberrantes globales en la planta pues, como vimos en la introducción, los genes de la familia APETALA2 están involucrados en multitud de procesos diferentes. Sin embargo, utilizando el promotor del gel *TFL1*, con expresión prácticamente exclusiva en el SAM (Kushwahl *et al.*, 2014), se consiguió dirigir específicamente la expresión de *AP2*<sup>170</sup> a este dominio, obteniendo plantas con mayor producción de frutos y sin afectarse ningún otro proceso en la planta, al menos de forma apreciable (Martínez-Fernández, 2017). Para la realización de este TFM hemos partido de estos resultados para diseñar estrategias alternativas. Así, hemos querido evaluar si aumentando la expresión de *SNZ* y *TOE3* en el SAM, dos genes *AP2-like*, conseguimos resultados equivalentes y, de este modo, determinar si, al igual que *AP2*, participan en la regulación del GPA y en qué grado. La elección de estos genes para el trabajo se debe a dos motivos: el primero es su relación de parentesco con *AP2*. De entre los genes *AP2-like*, *TOE3* es el más cercano evolutivamente, mientras que *SNZ* es, junto con *SMZ*, el más lejano (Wang *et al.*, 2016). El segundo motivo es que estos genes, al igual que *AP2*, están regulados por *FUL* y por el *miR172* como ya se vio en la introducción. Es decir, su regulación es muy parecida. Así, trabajar con estos genes permitirá obtener conclusiones preliminares acerca del papel general de los genes *AP2-like* en el GPA como discutiremos posteriormente.

Tabla 7.- Resumen de las construcciones generadas en este trabajo y su finalidad

Finalidad	AP2				TOE3				SNZ			
	Construcción	Estado			Construcción	Estado			Construcción	Estado		
		Vector	En planta	Caract.		Vector	En planta	Caract.		Vector	En Planta	Caract.
EVALUAR PAPEL EN GPA	TFL1::AP2 <sub>wt</sub>				TFL1::TOE3 <sub>wt</sub>	x			TFL1::SNZ <sub>wt</sub>			
	TFL1::AP2 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>				TFL1::TOE3 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x			TFL1::SNZ <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x		
	TFL1::AP2 <sub>m3</sub>				TFL1::TOE3 <sub>m3</sub>				TFL1::SNZ <sub>m3</sub>			x
	TFL1::AP2 <sup>170</sup>				TFL1::TOE3 <sup>170</sup>	x			TFL1::SNZ <sup>170</sup>	x		
	TFL1::AP2 <sub>truncada</sub>				TFL1::TOE3 <sub>truncada</sub>			x	TFL1::SNZ <sub>truncada</sub>			x
EVALUAR PAPEL EN DESARROLLO DEL MARGEN DE VALVA	SHP2::AP2 <sub>wt</sub>				SHP2::TOE3 <sub>wt</sub>	x			SHP2::SNZ <sub>wt</sub>		x	
	SHP2::AP2 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>				SHP2::TOE3 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x			SHP2::SNZ <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x		
	SHP2::AP2 <sub>m3</sub>	x			SHP2::TOE3 <sub>m3</sub>		x		SHP2::SNZ <sub>m3</sub>			x
	SHP2::AP2 <sup>170</sup>	x			SHP2::TOE3 <sup>170</sup>	x			SHP2::SNZ <sup>170</sup>	x		
	SHP2::AP2 <sub>truncada</sub>				SHP2::TOE3 <sub>truncada</sub>	x			SHP2::SNZ <sub>truncada</sub>			
	IND::AP2 <sub>wt</sub>	x			IND::TOE3 <sub>wt</sub>	x			IND::SNZ <sub>wt</sub>	x		
	IND::AP2 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x			IND::TOE3 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x			IND::SNZ <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x		
	IND::AP2 <sub>m3</sub>	x			IND::TOE3 <sub>m3</sub>	x			IND::SNZ <sub>m3</sub>	x		
	IND::AP2 <sup>170</sup>	x			IND::TOE3 <sup>170</sup>	x			IND::SNZ <sup>170</sup>	x		
	IND::AP2 <sub>truncada</sub>	x			IND::TOE3 <sub>truncada</sub>	x			IND::SNZ <sub>truncada</sub>			
SOBREEXPRESIÓN	35S::AP2 <sub>wt</sub>				35S::TOE3 <sub>wt</sub>	x			35S::SNZ <sub>wt</sub>	x		
	35S::AP2 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>				35S::TOE3 <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x			35S::SNZ <sub>m3</sub> <sup>170</sup>	x		
	35S::AP2 <sub>m3</sub>				35S::TOE3 <sub>m3</sub>			x	35S::SNZ <sub>m3</sub>			
	35S::AP2 <sup>170</sup>				35S::TOE3 <sup>170</sup>	x			35S::SNZ <sup>170</sup>	x		
	35S::AP2 <sub>truncada</sub>			x	35S::TOE3 <sub>truncada</sub>			x	35S::SNZ <sub>truncada</sub>			

Caract.= Plantas caracterizadas; X: Necesita realizarse; Color verde: Realizado previamente en el laboratorio; Color azul: Realizado durante la ejecución de este Trabajo de Fin de Master. Las construcciones se muestran como Promotor::CDS

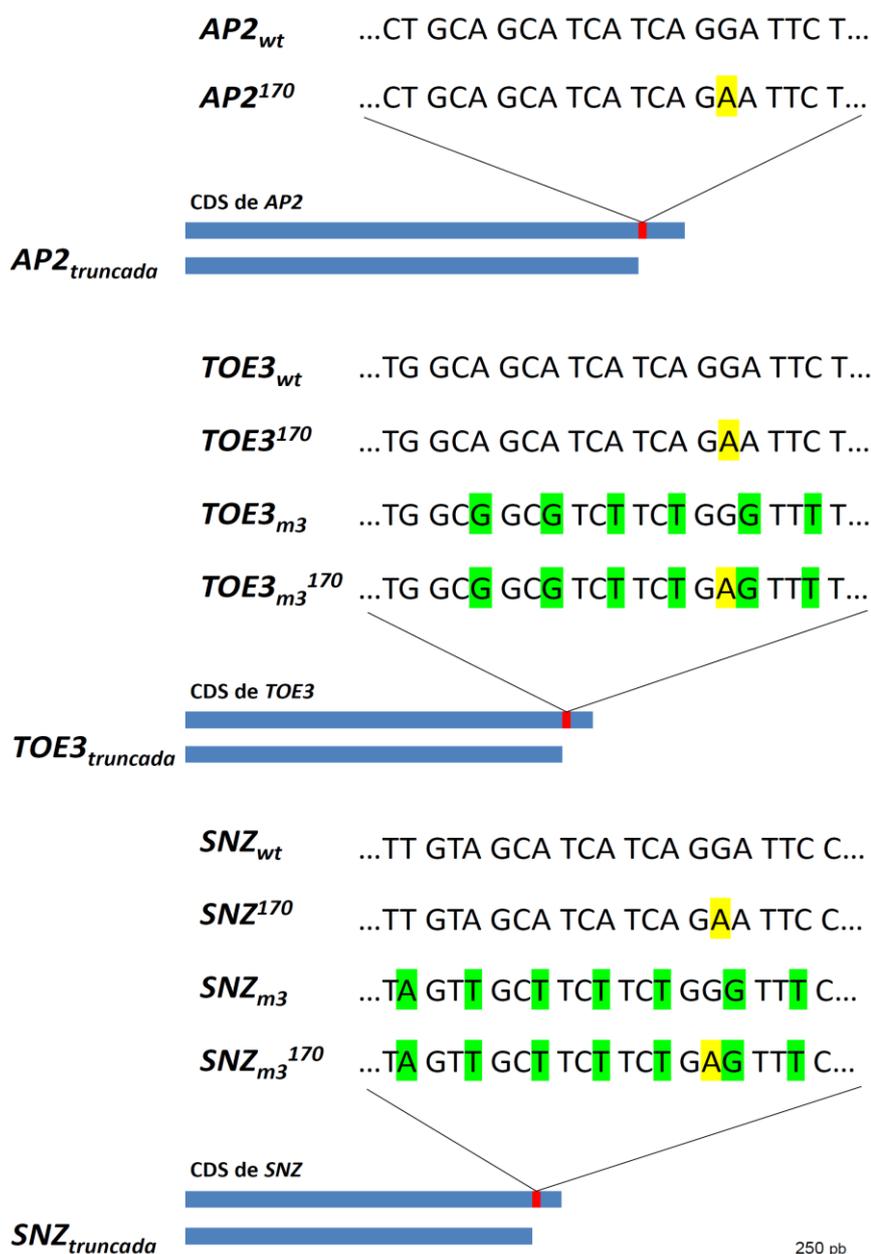
En primer lugar, procedimos a generar diferentes versiones mutantes de *TOE3* y *SNZ* resistentes a la regulación por el miR172. Para ello, generamos tres versiones mutantes diferentes para cada gen con cambios de bases concretas en el sitio de reconocimiento del miR172: *TOE3*<sup>170</sup>, con el mismo cambio de nucleótido que *AP2*<sup>170</sup>, afectando a una base muy conservada del sitio de reconocimiento de miR172 en todos los genes *AP2-like*; *TOE3*<sub>m3</sub>, con un cambio de base conservativo en cada codón del sitio de reconocimiento del miR172, con intención de dificultar así el reconocimiento del miARN sin afectar a la funcionalidad de la proteína; y *TOE3*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, que combina las características de las dos versiones anteriores. En paralelo, se hizo exactamente lo mismo para *SNZ*: *SNZ*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, *SNZ*<sub>m3</sub>, y *SNZ*<sup>170</sup>. Para obtener las versiones mutantes de *TOE3*, recurrimos a la técnica Overlap Extension PCR. En el caso de *SNZ*, la mutagénesis mediante esta técnica falló, por lo que recurrimos al uso de cebadores largos que contenían la mutación para amplificar la secuencia codificante de *SNZ*. Ambas técnicas de mutagénesis mediante PCR están descritas en el apartado [4.5.3](#). Si comparamos la secuencia nucleotídica o de proteína de los diferentes *AP2-like*, se puede comprobar que la parte 3'/C' terminal está muy poco conservada entre los diferentes genes y sus respectivos productos proteicos. Normalmente, los elementos conservados entre genes de diferentes especies, o entre diferentes genes de una especie, juegan un papel esencial en la función de la proteína, no ocurriendo lo mismo con las partes menos conservadas. Además, a raíz de estudios filogenéticos y de comparación de secuencias entre los genes de la familia AP2, se ha puesto de manifiesto la ausencia de residuos conservados en el extremo C' terminal de *SNZ* y *TOE3*, más allá del sitio de reconocimiento del miR172 (Wang *et al.*, 2016). Por ello, planteamos la hipótesis de que tal vez esta parte del gen no es necesaria para una correcta funcionalidad de la proteína que codifican. Para comprobar esta teoría, generamos una versión truncada para *SNZ* y *TOE3*, que introduce un codón de STOP justo antes de la secuencia reconocida por el miR172 y que por tanto da lugar a una proteína que carece del extremo C-t. Si nuestra hipótesis fuese cierta, se facilitaría la aplicación de estrategias biotecnológicas por medio de la tecnología CRISPR-Cas en especies de cultivo, ya que es más sencillo, *a priori*, causar una delección en esta posición que introducir una mutación puntual. La representación gráfica de estas versiones mutantes se muestra en la Figura 6.

Una vez generadas las diferentes versiones mutantes de los genes *SNZ* y *TOE3*, las clonamos en el vector pCR8/TOPO/GW, tal y como se describe en [4.5.7.1](#). También se amplificaron y se clonaron de esta misma forma las versiones silvestres de estos genes, que serían usados como control.

## **5.2. Caracterización de líneas de sobreexpresión de diferentes alelos de *TOE3*, *SNZ* y *AP2*.**

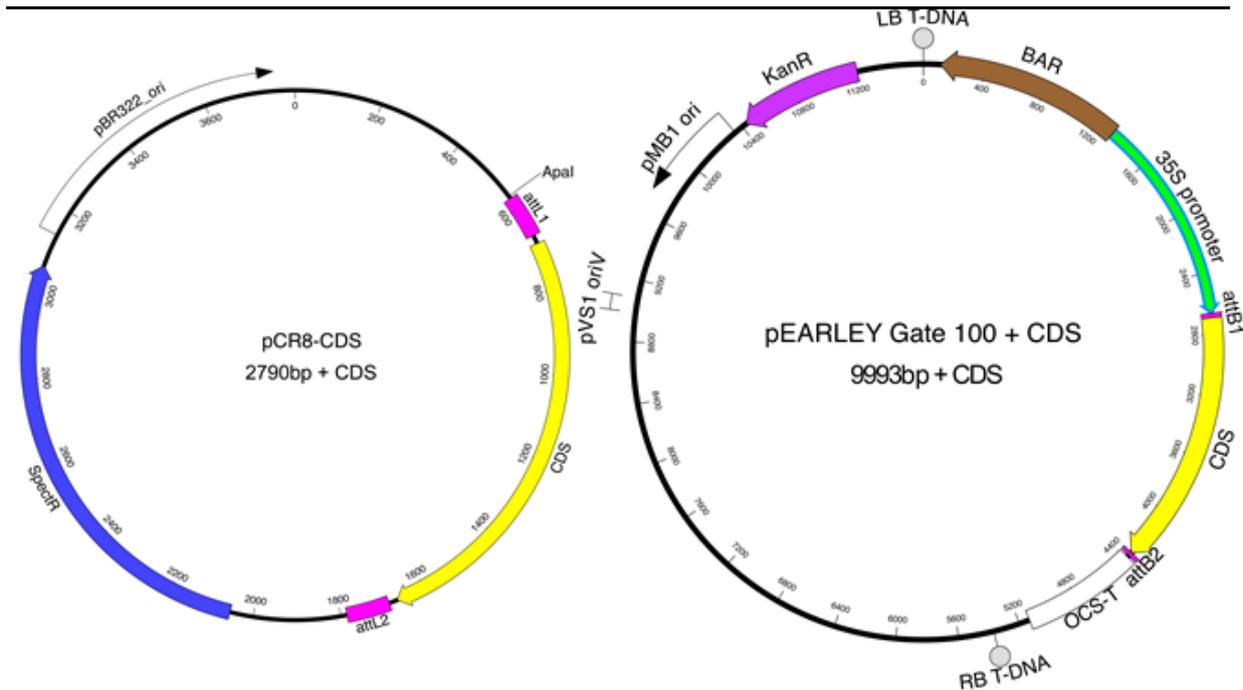
El primer objetivo, era comprobar si las distintas versiones de *SNZ* y *TOE3* generadas daban lugar a la aparición de fenotipos típicos de la sobreexpresión de AP2, lo que indicaría que, efectivamente, presentan funciones conservadas y que, trabajando con estos genes, es probable que se puedan obtener resultados interesantes en cuanto a la regulación del GPA y el desarrollo del margen de valva. Con este objetivo, una vez clonadas las secuencias en PCR8, recurrimos a la tecnología Gateway para transfer las diferentes construcciones a un vector final de expresión, el pEarleyGate100, tal y como se describe en [4.5.7.3](#). Se trata de un vector comercial que, entre otras características, permite la sobreexpresión de las secuencias por medio de un promotor CaMV35S. Así, generamos las construcciones 35S::*SNZ*<sub>truncada</sub> y 35S::*SNZ*<sub>m3</sub> y, las transferimos a *Agrobacterium tumefaciens*. El resto de construcciones, nos dieron más problemas o bien a la hora de clonarlas en PCR8, o bien a la hora de transferirlas al vector final de expresión. Por ello, actualmente estamos en proceso de obtención de las plantas o realizando su caracterización, no mostrándose en los resultados. Tras comprobar que las construcciones obtenidas eran correctas (como se describe en [4.5.5.4](#)) transformamos un total de 24 plantas con cada una de las diferentes construcciones generadas (con las distintas versiones mutantes de *SNZ* y *TOE3*) tal y como se describe en [4.4.3](#). El pEarleyGate100 contiene un gen que confiere resistencia al herbicida BASTA, por lo que empleamos dicho herbicida para seleccionar las plantas transgénicas. Para ello, espolvoreamos semillas T1 en macetas de plástico de 12 cm de diámetro, tratando de formar una única capa de semillas transgénicas sobre la maceta. Una vez germinadas las semillas, rociamos las plantas con BASTA cada 48 horas durante dos semanas, muriendo las plantas silvestres y sobreviviendo las transgénicas. Para facilitar la obtención de conclusiones, también

introducimos en el vector pEarleyGate100 la versión mutante  $AP2_{m3}^{170}$ . Esta secuencia codificante se había clonado previamente en PCR8 /TOPO/GW por otros miembros del grupo, por lo que, únicamente recurrimos a la tecnología Gateway para introducirlo en el vector de sobreexpresión. Así, obtuvimos y seleccionamos plantas transgénicas de la manera descrita anteriormente.



**Figura 6.-** Versiones mutantes generadas de los genes *TOE3* y *SNZ*. Se ha representado también  $AP2_{wt}$  y  $AP2^{170}$  como referencia. Las barras azules representan la CDS de los diferentes genes y la barra roja el sitio de reconocimiento del miR172.

De esta forma, obtuvimos un total de 20 plantas transgénicas para cada alelo de los mencionados anteriormente y nos centramos en caracterizar fenotípicamente el efecto de estos alelos mutantes en dos procesos de desarrollo. El primero de ellos fue el tiempo de floración, ya que todos los genes de esta familia son, en mayor o menor grado, represores de la floración. La segunda característica estudiada es el desarrollo floral, pues, como vimos en la introducción, *AP2* y otros *AP2-like* juegan un papel fundamental en el desarrollo de la flor. Para ello, en diferentes momentos del desarrollo, se tomaron fotografías de las plantas como se describe en 4.8. Estas imágenes se muestran en la Figura 8 y la Figura 9 respectivamente.



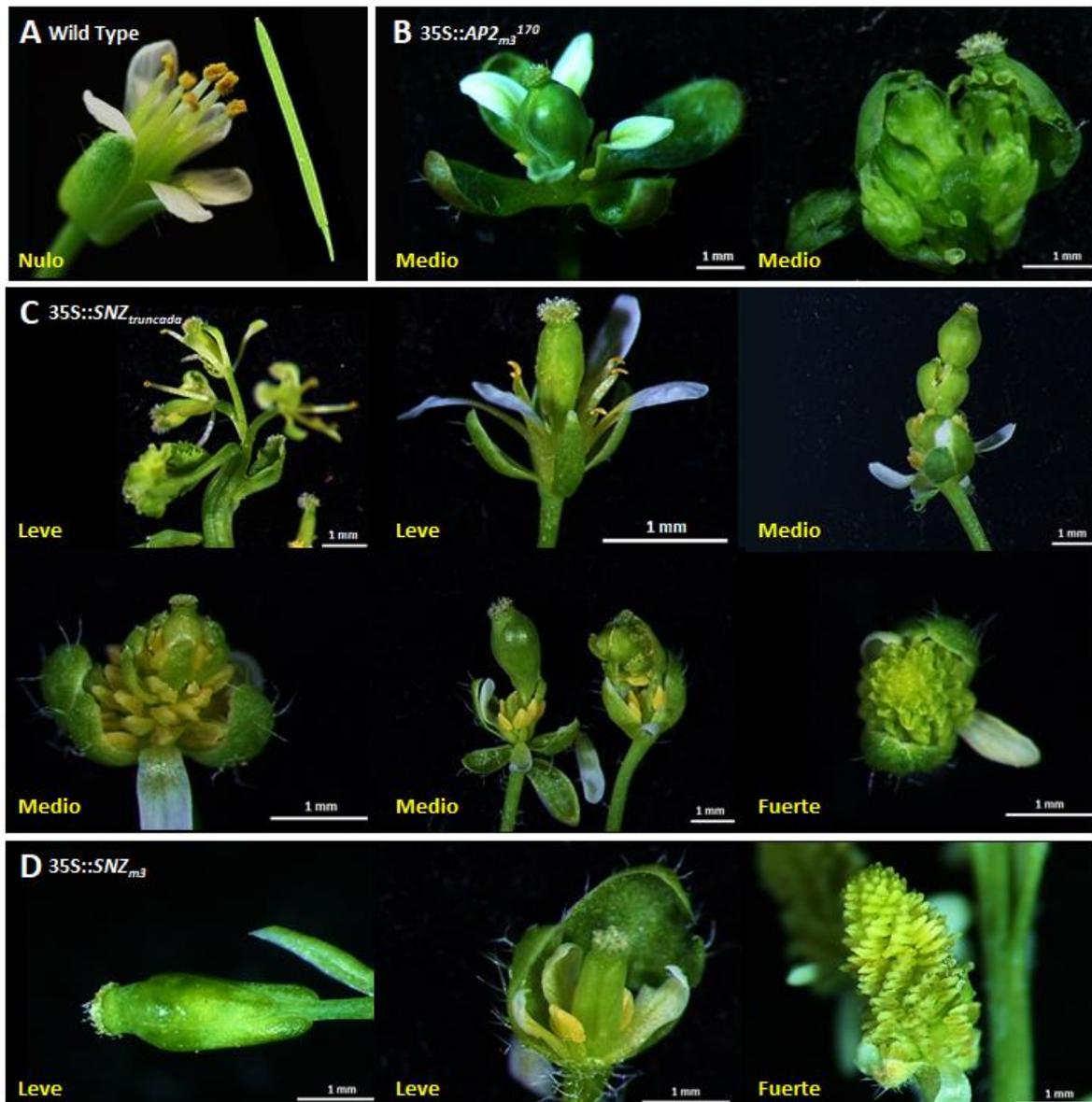
**Figura 7.-** Representación gráfica del PCR8 y el pEarleyGate100. La CDS hace referencia a cada una de las versiones mutantes generadas, representadas en la Figura 6. Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios *attL* y *attB* previos y posteriores a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias.



**Figura 8.-** Retraso en la floración provocado por la sobreexpresión de *SNZtruncada* *SNZ<sub>m3</sub>* y *AP2<sup>170</sup>*. Se ha utilizado una fotografía correspondiente a plantas 35S: *SNZtruncada* como ejemplo. Con una flecha amarilla se muestra una planta con fenotipo de retraso de floración leve. Con una roja, aquella con fenotipo medio. Y con una flecha azul, una planta con fenotipo fuerte.

En base a los fenotipos obtenidos, hemos dividido las plantas en tres categorías diferentes: débil/ausente, cuando no hay retraso en la floración, floreciendo las plantas de la misma forma que una planta silvestre; medio, cuando las plantas presentan cierto retraso en la floración con respecto a las silvestres, realizándose el *bolting* unos 5-7 días después; y fuerte, cuando las plantas presentan un pronunciado retraso en la floración comparado las silvestres, realizándose el *bolting* unos 12-14 días después. De entre las 25 plantas transgénicas obtenidas para cada construcción, el número de fenotipos obtenidos de cada categoría se muestra en la Figura 10.

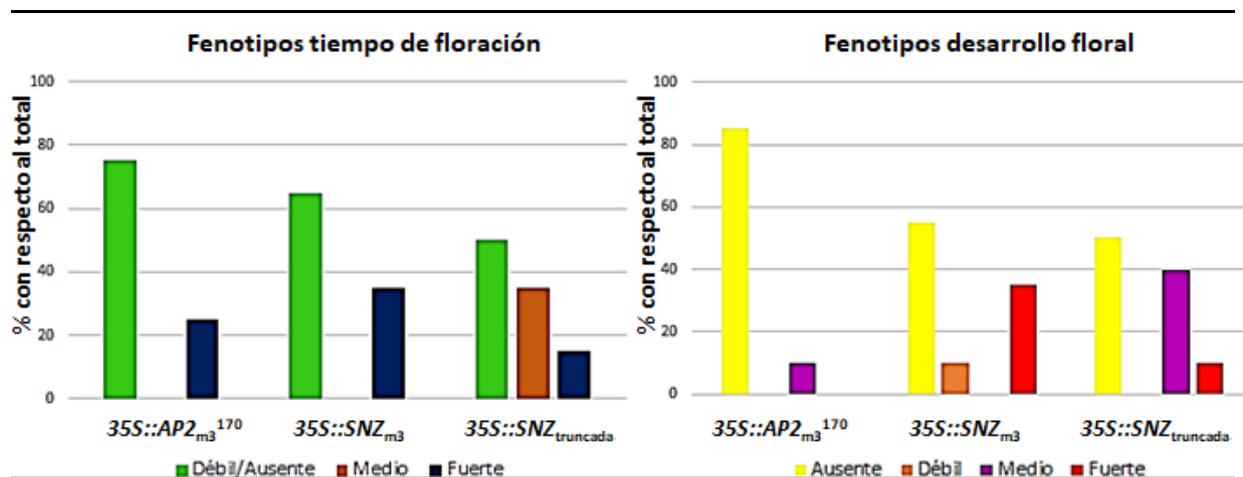
Tras esta caracterización en base al tiempo de floración, cuando todas las plantas habían florecido, procedimos a caracterizarlas en base a distintos aspectos del desarrollo floral.



**Figura 9.-** Modificación del patrón normal del desarrollo de la flor. (A) Control silvestre (B) Sobreexpresión de la versión mutante *SNZ<sub>truncada</sub>* (C) Sobreexpresión de la versión mutante *SNZ<sub>m3</sub>* (D) Sobreexpresión de la versión mutante *AP2<sub>m3</sub><sup>170</sup>*. Hemos clasificado los fenotipos en tres intensidades diferentes, representadas en la figura con números de color amarillo. Se indica la intensidad de los fenotipos: leve, medio, fuerte.

Esta vez, en base a los fenotipos obtenidos, hemos dividido las plantas en cuatro categorías diferentes: aquellas de fenotipo nulo, en las que el desarrollo de la flor es igual que en una planta silvestre (Figura 9A); leve, cuando se encuentran defectos en el desarrollo de los órganos florales (como

los dos primeros fenotipos de la Figura 9D); medio, cuando se produce indeterminación floral pero están presentes todos los órganos florales; y fuerte, cuando se produce un alto grado de indeterminación floral, desapareciendo el carpelo y predominando el desarrollo de estambres. El número de fenotipos obtenidos para cada categoría se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.-** Distribución fenotípica para el tiempo de floración y el desarrollo floral. Se ha representado el porcentaje de plantas con cada fenotipo con respecto al total.

El retraso en la floración, visible en la Figura 8, se trata de un fenotipo esperado de la sobreexpresión de *AP2* o un *AP2-like* pues, como vimos en la introducción, la mayoría de estos genes son represores de la floración (Wu *et al.*, 2009; Mathieu *et al.*, 2009; Aukerman and Sakai, 2003; Jung *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2009). La única caracterización que hicimos fue visual, no realizamos conteo de hojas como se suele hacer en estos casos. La razón de ello es, por un lado, que los fenotipos nos resultaron lo suficiente evidentes como para poder afirmar que había retraso en la floración sin necesidad de hacer los conteos y, por otro lado, las limitaciones temporales que implica la realización de un Trabajo de Fin de Máster, unidas al hecho de que nuestro interés al plantear el trabajo no era el controlar el tiempo de floración.

En cuanto al desarrollo de la flor, en el caso de la sobreexpresión de *SNZ*<sub>truncado</sub> aparecen principalmente plantas con fenotipo medio, y algunas con fenotipo fuerte (sin tener en cuenta aquellas sin fenotipo). En el caso de la sobreexpresión de *SNZ*<sub>m3</sub>, por su lado, aparecen principalmente fenotipos fuertes y algunas con fenotipo débil. Si observamos las gráficas de la Figura 10, parece que estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos en cuanto al retraso en la floración, con excepción de que algunas plantas que no presentaban fenotipo en el retraso de floración en la sobreexpresión de *SNZ*<sub>m3</sub>, presentan fenotipo débil en el desarrollo floral. Es decir, parece que cuanto mayor es el retraso en el tiempo de floración, más fuerte es el fenotipo que se manifiesta en el desarrollo floral. Los fenotipos débiles obtenidos presentan, como ya hemos dicho, defectos en el desarrollo de estructuras florales. Especialmente, si comparamos con la flor producida por una planta silvestre, se aprecia que tanto los sépalos como los pétalos adoptan una morfología más delgada y alargada. Además, se observaba una proliferación mucho mayor de tricomas en los sépalos, y estos tienen una morfología ligeramente diferente a los tricomas de una flor silvestre. Como vimos en la introducción, *AP2* jugaba un papel fundamental en el desarrollo de estos dos verticilos. Así, una desregulación de este gen explicaría un desarrollo anómalo de ambos órganos florales. Normalmente, genes *AP2-like* como *TOE1* o *SNZ* presentan un patrón de expresión diferente a *AP2*, afectando principalmente a la transición floral y no tanto al desarrollo de las flores. Así, estos resultados sugieren que cuando *SNZ* está presente en las estructuras florales debido a su sobreexpresión, desempeña una labor muy parecida a *AP2* (Wollmann *et al.*, 2010; Lohmann *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2018). En cuanto a los fenotipos medio y severo, se produce un alto grado de indeterminación floral en el que predomina el desarrollo de estambres. Este fenotipo se había observado anteriormente a raíz de la sobreexpresión

de versiones de *AP2* resistentes a la degradación del miR172, lo que sugiere las proteínas SNZ y AP2 tienen funciones conservadas (Balanzà *et al.*, 2018; Würschum *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004). Sin embargo, sin entrar en detalle porque está comentado en la introducción, *AP2* junto con *AP1*, tiene una función antagónica a *AG*, promoviendo la formación de pétalos y sépalos, mientras que *AG* promueve el desarrollo de estambres y carpelos. Este hecho parece contrastar con estos fenotipos de desarrollo ectópico de carpelos. Una posible explicación dada a este fenómeno es que, al sobreexpresar *AP2* o los *AP2-like*, se consiga un aumento de la actividad de *WUS*, los meristemas se hagan más activos y, además, este sea el causante de la proliferación atípica de estambres, obteniendo estas flores tan características. Esta hipótesis está en concordancia con trabajos previos donde se habla de la capacidad de *WUS* de provocar anomalías en el desarrollo de los órganos del tercer y cuarto verticilo (Wollmann *et al.*, 2010; Lohmann *et al.*, 2001). Una hipótesis que planteamos es que, la sobreexpresión de estos *AP2-like* no reprima del todo a *AG*, puesto que no se pierde la identidad de los órganos reproductivos de la flor, pero sí ocasione un gran aumento de expresión de *WUS*. Nuestros resultados no solo son similares a los obtenidos a raíz de la sobreexpresión de versiones resistentes al miR172 de *AP2* (Balanzà *et al.*, 2018; Würschum *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004), sino que también coinciden con los resultados obtenidos al sobreexpresar un alelo de *SMZ* resistente a la degradación por el miR172 (Mathieu *et al.*, 2009). Finalmente, estos fenotipos obtenidos con la sobreexpresión de *SNZ*<sub>truncado</sub> y *SNZ*<sub>m3</sub>, son similares a los que hemos obtenido a raíz de la sobreexpresión de *AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, por lo que también podemos deducir en base a resultados propios la conservación en la funcionalidad de estos genes con respecto al desarrollo de la flor. Como se observa en la Figura 10, al sobreexpresar esta versión de *AP2*, no se han obtenido fenotipos fuertes, apareciendo únicamente fenotipos medios con cierta indeterminación floral. El hecho de que no aparezcan estos fenotipos fuertes, al contrario que con los otros dos alelos de *SNZ*, y al contrario que los resultados obtenidos a raíz de la sobreexpresión de otros alelos de *AP2* resistentes a la degradación por miR172 (Balanzà *et al.*, 2018; Würschum *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2004) podría tener que ver con una cuestión meramente estadística, al no haberse generado suficientes plantas transgénicas. La explicación más lógica a estas variaciones fenotípicas observadas entre las diferentes construcciones, es una variación en el número de inserciones de ADN-T en las plantas transgénicas, un hecho muy frecuente cuando se utiliza *Agrobacterium tumefaciens* para transformar. Alternativamente, podría ser que *SNZ* tenga una mayor capacidad de activar a *WUS* y/o menor de reprimir a *AG*, y por tanto su sobreexpresión de fenotipos más severos. Para comprobarlo, sería necesario evaluar un mayor número de líneas transgénicas en las que además se determinaran los niveles de expresión del mRNA y de las proteínas correspondientes a los transgenes introducidos.

Así, en definitiva, nuestros resultados apoyan y confirman otros resultados previos obtenidos a raíz de la sobreexpresión de alelos de *AP2* y *AP2-like* resistentes a la degradación por miR172. Además, parecen indicar que la función proteica de los miembros de la familia APETALA2 está muy conservada en cuanto al desarrollo floral, y que estos genes presentan funciones diferentes debido a sus diferentes patrones de expresión en la planta. No pudimos obtener líneas de sobreexpresión de alelos de *TOE3* resistentes a la degradación por el miR172 por los motivos mencionados anteriormente (falta de tiempo y problemas en los procesos de clonación y obtención de construcciones finales). Sin embargo, en trabajos anteriores, al sobreexpresar versiones resistentes de este gen resistentes a la degradación por miR172, se obtenían efectos fenotípicos muy similares a los que hemos descrito hasta ahora para *SNZ* o *AP2* (Jung *et al.*, 2010), reforzando esta hipótesis de funcionalidad conservada.

Finalmente, queríamos mencionar que, en algunas plantas con fenotipo ausente para los dos caracteres estudiados, pudimos observar un aumento en la proliferación del meristemo, dando lugar a la producción de mayor número de flores. Este hecho, nuevamente, puede deberse a un aumento de la actividad de *WUS*. Este resultado se obtuvo para los tres alelos de sobreexpresión estudiados y se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.-** Aumento de la actividad meristemática en las líneas de sobreexpresión de los diferentes alelos mutantes de *SNZ* y *AP2*

Con estos resultados, teníamos evidencia suficiente para pensar que *SNZ* y *TOE3* se comportan de manera muy parecida a *AP2* y aportó sentido a nuestra intención de caracterizar su efecto y utilidad en el control del GPA y el desarrollo del margen de valva, por lo que procedimos a desarrollar las estrategias que se expondrán a continuación.

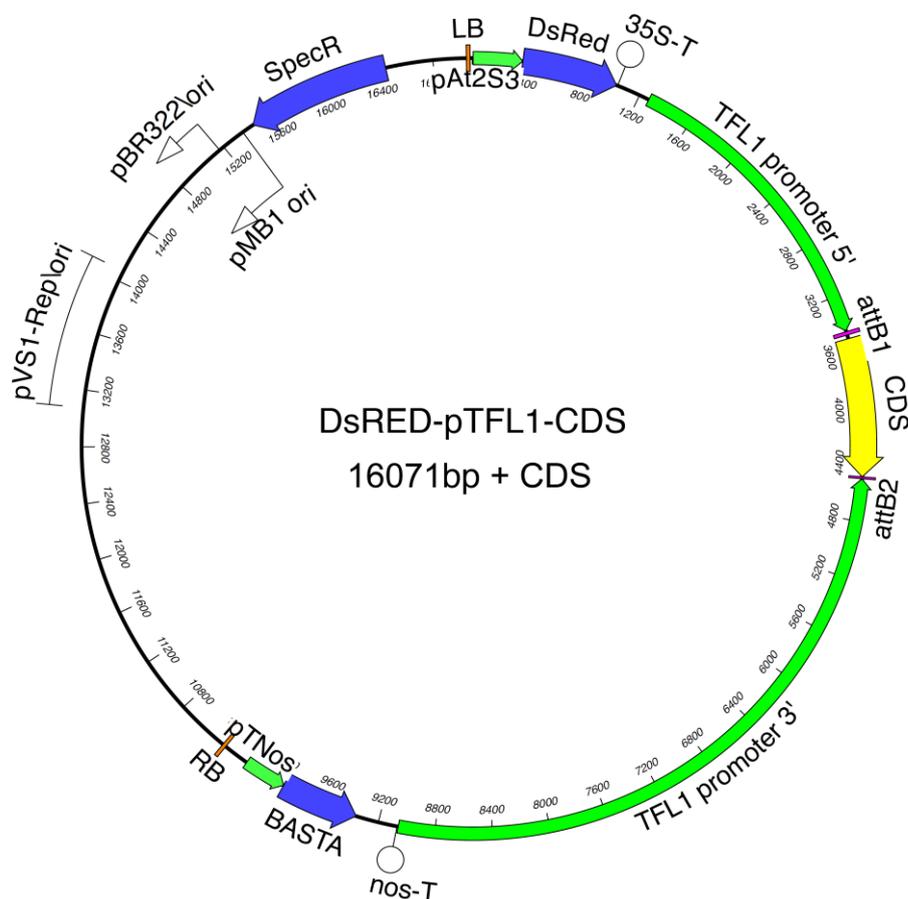
La última razón por discutir en este apartado es si entre la versión de *SNZ*<sub>truncada</sub> y la versión *SNZ*<sub>m3</sub> hay diferencias notorias. Con los resultados obtenidos hasta el momento, parece que no hay diferencia al sobreexpresar una u otra versión. Dejando de lado las diferencias en cuanto al número de fenotipos obtenidos en cada caso, los fenotipos fuertes obtenidos al sobreexpresar ambos alelos son prácticamente los mismos. Por tanto, de forma preliminar, se puede considerar que ambas versiones funcionan de forma equivalente, y que, por tanto, la parte C' terminal de la proteína no es muy importante para la función de la misma, siendo simplemente necesaria para una correcta regulación por el miR172. Al final de los resultados, comentaremos qué implicaciones podría tener este hecho. Sin embargo, se trata de un hecho en el que habría que profundizar más: utilizar más líneas, hacer más experimentos, y ver si este comportamiento se extiende también a versiones equivalentes de otros miembros de la familia AP2. Por tanto, y reiterando, es una conclusión preliminar. Para comprobarlo, por ejemplo, podríamos ver si se pueden rescatar fenotipos *snz* expresando una versión truncada de *SNZ* parecida a la nuestra bajo el control de su promotor, pero que incluya el sitio de degradación del miR172 para que tenga una regulación normal. Así, comprobaríamos si efectivamente esta parte C' terminal es necesaria o no.

. En el futuro, repetiremos el experimento de sobreexpresión para profundizar en diferentes aspectos: obtener un mayor número de plantas para ver si aparecen nuevos fenotipos; haremos conteo de hojas para obtener valores objetivos del retraso de la floración; y caracterizaremos todos los alelos restantes que, como se ha mencionado anteriormente, hasta el momento están en desarrollo.

### **5.3. Generación de herramientas para la caracterización del papel de *TOE3* y *SNZ* en el GPA.**

En primer lugar, con intención de determinar el efecto de estos genes en el GPA, tras clonar las secuencias codificantes en los vectores apropiados, recurrimos a la tecnología Gateway para transferirlas a vectores finales de expresión bajo el control del promotor de *TFL1*, generados previamente en el laboratorio mediante la tecnología GoldenBraid, tal y como se describe en [4.5.7.3.](#) y [4.5.7.2.](#) respectivamente. Se trata de vectores pDGB3-Ω1 que incorporan un gen de resistencia al herbicida BASTA y un gen de fluorescencia, el *dsRED*, bajo el control de un promotor específico de semilla, flanqueando ambos marcadores nuestras secuencias de interés por la derecha y por la izquierda respectivamente. Y todo ello flanqueado a su vez por los sitios LB y RB, necesarios para la integración del ADN-T en la planta. El ADN-T, se integra en el genoma de la planta comenzando por el

RB y terminando por el LB, de forma secuencial. Muchas veces, ocurren errores en el proceso que impiden una integración completa del ADN-T, quedando partes cercanas al extremo LB sin ser integradas en el genoma de la planta. Utilizar dos marcadores de selección flanqueantes a la secuencia de interés, como es el caso que acabamos de describir, nos permite tener certeza de que dicha secuencia se ha integrado correctamente en el genoma de la planta (Sheng *et al.*, 1996).

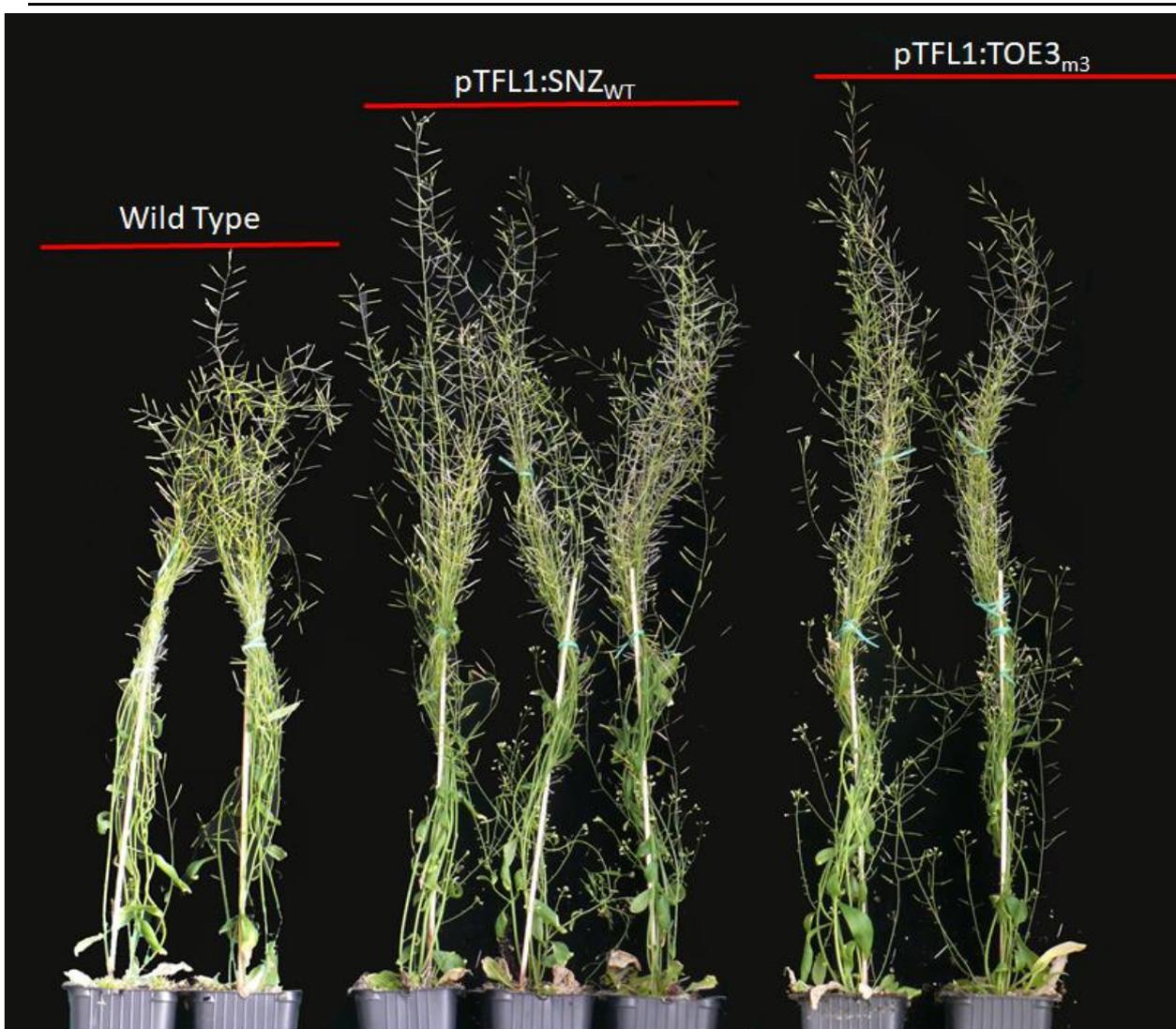


**Figura 12.-** Representación gráfica vector final de expresión. La CDS hace referencia a cada una de las versiones mutantes generadas, representadas en la Figura 6. Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios *attB* posteriores a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias.

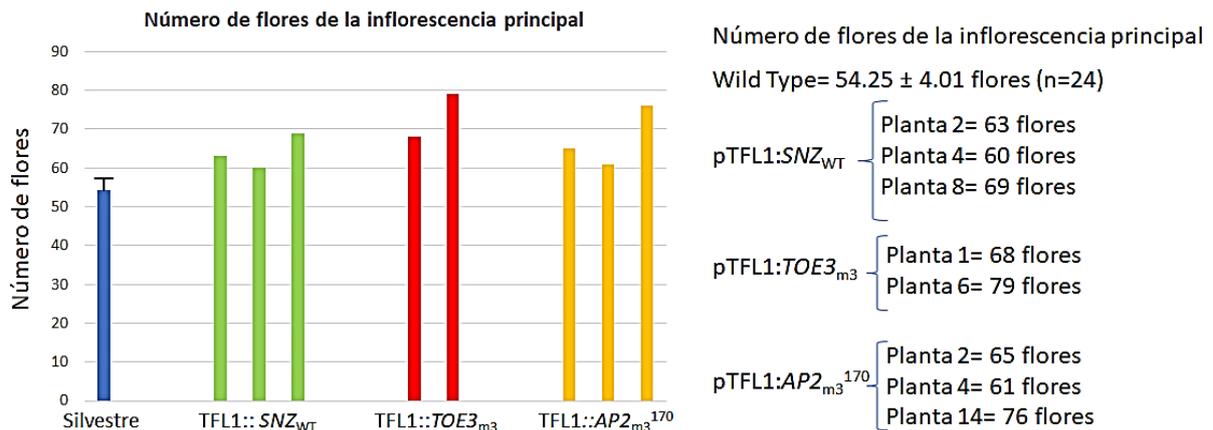
Así, generamos las construcciones TFL1::SNZ<sub>wt</sub>, TFL1::TOE3<sub>m3</sub> y TFL1::AP2<sub>m3</sub><sup>170</sup>, y las transferimos a *Agrobacterium tumefaciens*. El resto de construcciones, mostradas en la Figura 6, dieron más problemas experimentales que, sumados al poco tiempo que teníamos, ha ocasionado que aún estén en proceso de obtención o caracterización de las plantas. Decidimos generar también la construcción TFL1::AP2<sub>m3</sub><sup>170</sup> para comparar con el resultado obtenido previamente en el laboratorio al obtener plantas con el transgén TFL1::AP2<sup>170</sup>, otro alelo que, como se comentó anteriormente, es parcialmente resistente a la degradación por miR172 y tiene un cambio en la secuencia de la proteína (Balanzà *et al.*, 2018). Tras comprobar que las construcciones obtenidas eran correctas (como se describe en 4.5.5.4.) transformamos un total de 24 plantas con cada una de las tres construcciones mencionadas (3) tal y como se describe en 4.4.3. Transcurrido un tiempo, recogimos las semillas de las plantas transformadas como se describe en 4.4.2. y pasamos a seleccionar las transgénicas a raíz de la fluorescencia emitida a causa del *dsRED*, tal y como se describe en 4.6.4. Sembramos unas 20 plantas transgénicas para cada una de las tres construcciones mencionadas y procedimos, tras su germinación, a rociar BASTA sobre ellas cada 48 horas durante dos semanas, utilizando así ambos marcadores por el motivo descrito anteriormente. A día de hoy, hemos obtenido semillas T2, y debemos

de seleccionar aquellas plantas que solo tengan una inserción de ADN-T, es decir, que sigan una segregación mendeliana típica, con un 75% de semillas transgénicas y un 25% de semillas silvestres. A fin de tener algún resultado preliminar que nos indique si la expresión de *SNZ* y *TOE3* en el SAM juega algún papel en el GPA, procedimos a la caracterización preliminar de las líneas T1 que expresaban en el SAM los diferentes alelos obtenidos para estos genes. Para ello, esperamos a que se produjese el GPA y, en primer lugar, pudimos observar una diferencia clara en la longitud alcanzada por algunas plantas portadoras del transgén y las plantas silvestres. Este fenómeno se muestra en la Figura 13.

Esta mayor longitud alcanzada por las plantas portadoras del transgén, a priori, parecía indicativo de que el meristemo había estado activo durante más tiempo, retrasándose así el GPA, y, a consecuencia de ello, produciendo más frutos y alcanzando mayor longitud. Por eso, a fin de realizar esta pre-caracterización, decidimos hacer conteo de frutos de las plantas portadoras del transgén que tuviesen una longitud notablemente mayor que las plantas silvestres. El resultado de estos conteos se muestra en la Figura 14.

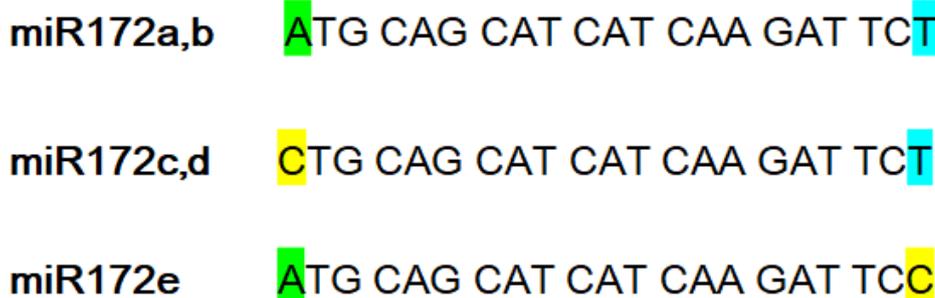


**Figura 13.-** Plantas transgénicas con expresión específica en el SAM del alelo silvestre de *SNZ* y la versión *TOE3*<sub>m3</sub>. Planta silvestre como control.



**Figura 14.-** Número de flores producidas en la inflorescencia principal. Se han representado los resultados con las plantas individuales de las plantas con el transgén, y una media de 24 plantas para el control silvestre.

Como se puede observar en la Figura 14, al utilizar el promotor de *TFL1* con expresión específica de SAM, tanto en la versión silvestre de *SNZ*, así como en las versiones *TOE3*<sub>m3</sub> y *AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, la producción de frutos en la inflorescencia principal de las plantas seleccionadas en base a su mayor longitud es mayor que en las plantas control, sin transformar. Los mejores resultados en cuanto a retraso del GPA se han obtenido con la construcción *TFL1::TOE3*<sub>m3</sub>, con un incremento del 46% de producción de flores en el mejor de los casos (Planta 6, Figura 14). Tras esta, la construcción que mayor incremento de producción ha logrado ha sido *TFL1::AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, con un incremento del 40% en el mejor caso (Planta 14, Figura 14). Finalmente, con la construcción *TFL1::SNZ*<sub>wt</sub>, se obtuvo un incremento del 27% en los mejores casos (Planta 8, Figura 14). Es decir, parece que estos alelos producen un retraso en el GPA cuando son expresados en el SAM. Parece que aquellos que tienen un mayor impacto en el GPA son *TFL1::TOE3*<sub>m3</sub> y *TFL1::AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>. En cuanto a *TOE3* y a *AP2*, es posible que el mayor efecto observado en *TOE3* se deba al azar, por el número de inserciones de T-DNA en la planta. Estos experimentos se refinarán en el futuro, utilizando plantas T2 con una inserción de ADN-T, caracterizando un mayor número de plantas y aplicando estadística, aunque, de forma preliminar, también podría ser un indicio de una mayor influencia de *TOE3* en la regulación del GPA. Con respecto a los resultados obtenidos con las plantas *TFL1::AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, son similares a los obtenidos previamente en el laboratorio por Irene Martínez con plantas *TFL1::AP2*<sup>170</sup>, donde también se observó un incremento del 40% en la producción de frutos en los mejores casos (Balanzà *et al.*, 2018). De forma preliminar, esto puede indicar que simplemente cambiando la guanina correspondiente a la versión 170 (Véase Figura 6), es suficiente para evitar la regulación negativa del miR172. Aunque, por los mismos motivos descritos anteriormente, es una hipótesis preliminar y habría que profundizar en el tema en el futuro. Finalmente, en principio, no esperábamos que al expresar la versión silvestre de *SNZ* bajo el control de *TFL1*, se consiguiese un retraso en el GPA, ya que dicho alelo no tiene modificado el sitio de reconocimiento del miR172, no “escapando” así de la represión negativa de este miARN y debiendo, en principio, estar regulado normalmente. Cabe aclarar aquí que, en *Arabidopsis*, hay identificados hasta cinco loci de miR172 que codifican hasta 3 versiones maduras diferentes con ciertos cambios principalmente en el principio y el final de la secuencia: miR172a, miR172b, miR172c, miR172d, miR172e (Sunkar *et al.*, 2012). Estos, se representan en la Figura 15. Además, actualmente Vicente Balanzà, del laboratorio de Cristina Ferrándiz, ha podido comprobar que los distintos miR172 presentan patrones de expresión diferentes, aunque estos resultados están aún sin publicar y requieren más trabajo.



**Figura 15.-** Representación gráfica de los diferentes miR172. Se han utilizado colores para resaltar los cambios de secuencia que se dan entre ellos.

Todo ello, sumado a que los posibles cambios entre las secuencias de las tres versiones maduras pueden ocasionar distinta afinidad y, por tanto, distinta regulación de los diferentes *AP2-like*, nos lleva a hipotetizar que tal vez, al expresar la versión silvestre de *SNZ* bajo el control del promotor de *TFL1* se consiga un retraso en el GPA porque tal vez este gen no se encuentra muy rigurosamente regulado por el miR172 maduro mayoritariamente presente en el SAM. Es decir, que tal vez la versión madura que mejor reprimiría la expresión de *SNZ* en el SAM, no se encuentra presente en este tejido. Estos resultados están respaldados con resultados obtenidos previamente en el laboratorio por Vicente Balanzá, donde hay indicios de que las diferentes versiones de miR172 regulan de diferente manera a *AP2*, reprimiendo su expresión en mayor o menor medida (resultados sin publicar). Tal vez, la regulación de los diferentes miR172 a los distintos *AP2-like* dependa de la afinidad que se da entre la secuencia del primero y la secuencia de reconocimiento que hay en los segundos (Figura 5 y Figura 11). Para esclarecer este asunto, en primer lugar habría que determinar si *AP2*, *SNZ* y *TOE3* tienen expresión en el SAM en fases tardías, cuando se produce el GPA, pues es algo que a día de hoy no se sabe a ciencia cierta. En segundo lugar, habría que esclarecer los patrones de expresión de los tres miR172 maduros diferentes. Y finalmente, habría que determinar si los diferentes *AP2-like* están regulados de distinta forma por las 3 versiones de los miR172.

Con los resultados obtenidos hasta la fecha, parece que *SNZ* y *TOE3* son capaces de regular el GPA cuando son expresados en el SAM, por lo que asientan una base sólida para proseguir con la investigación, afinar con los experimentos y obtener mejores conclusiones. Además, hemos confirmado resultados anteriores donde se manifestaba un papel importante de *AP2* en este proceso, y hemos podido sacar alguna conclusión preliminar acerca de su regulación por el miR172, pues parece que cambiando únicamente la guanina correspondiente a la versión *AP2*<sup>170</sup>, es suficiente para impedir la regulación negativa del gen.

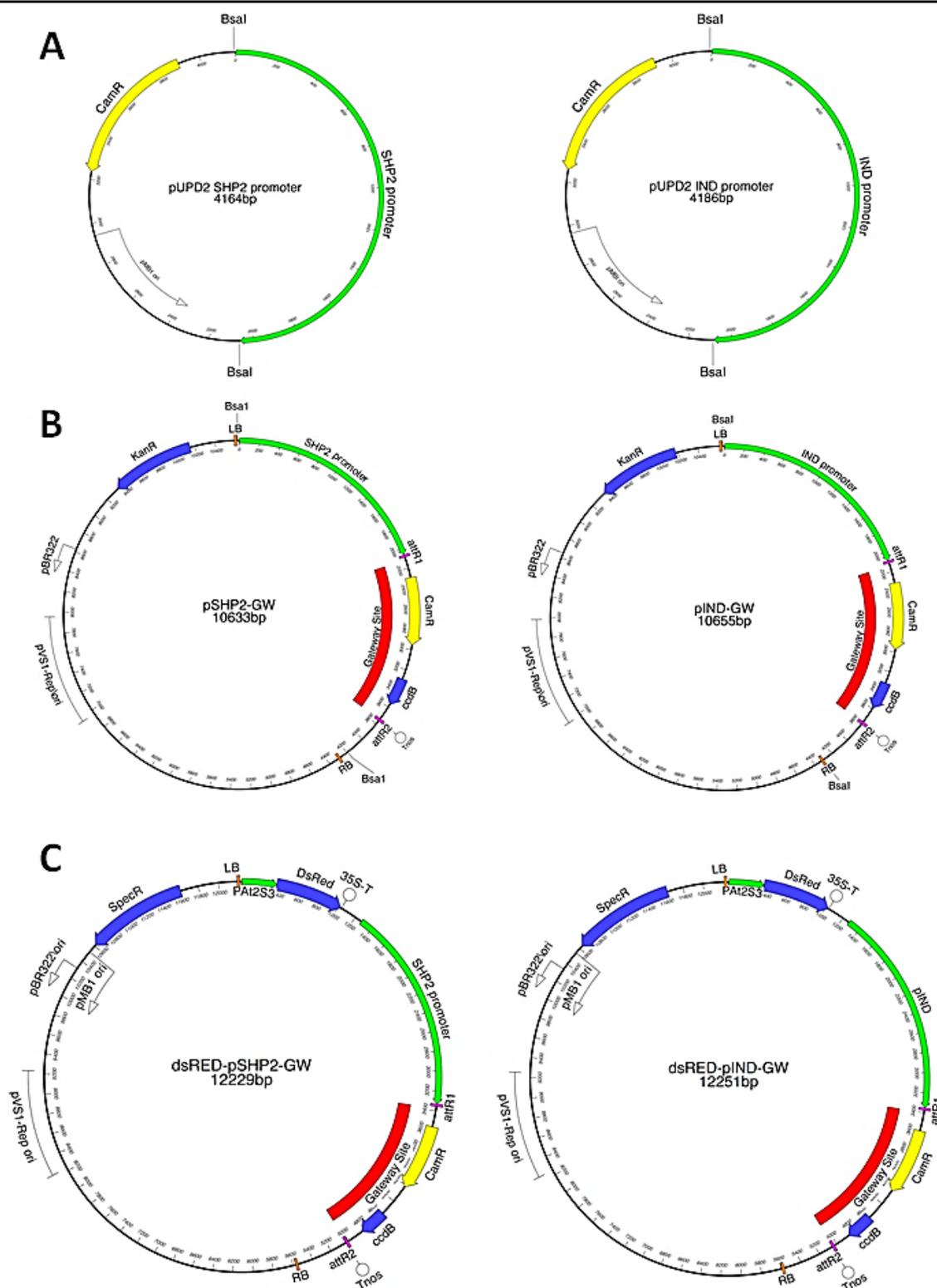
#### **5.4. Generación de herramientas para la caracterización del papel de *TOE3*, *SNZ* y *AP2* en el desarrollo del margen de valva.**

Para caracterizar el papel de estos genes en el margen de valva, recurrimos a la tecnología GoldenBraid. Mediante esta tecnología obtuvimos, tal y como se detalla en el apartado [4.5.7.2](#), dos vectores de expresión que incluyesen los promotores de *SHP2* e *IND* respectivamente. Se trata de genes típicos de identidad de margen de valva, con una expresión muy localizada en este tejido (Ma *et al.*, 1991; Savidge *et al.*, 1995; Flanagan *et al.*, 1996; Rajani and Sundaresan, 2001). Para obtener el promotor de *SHP2*, nos basamos en trabajos previos en los que se afirmaba que, para reproducir con fidelidad la expresión silvestre de este gen, basta con utilizar las 2 kb inmediatamente aguas arriba del mismo, región que se ha propuesto que contiene la totalidad o mayoría de regiones reguladoras encargadas de determinar el patrón de expresión de *SHP2* (Sehra *et al.*, 2017). Para *IND*, al no haber estudios de este tipo, decidimos simplemente amplificar toda la región que se extiende desde el final del gen anterior a *IND* hasta el inicio de éste, una región de, igualmente, 2 kb. En estudios previos, el uso de esta región era capaz de dirigir la expresión de GUS de forma específica al margen de valva (Sorefan *et al.*, 2009). Así, diseñamos los cebadores que se muestran en la Tabla 4 y los usamos para

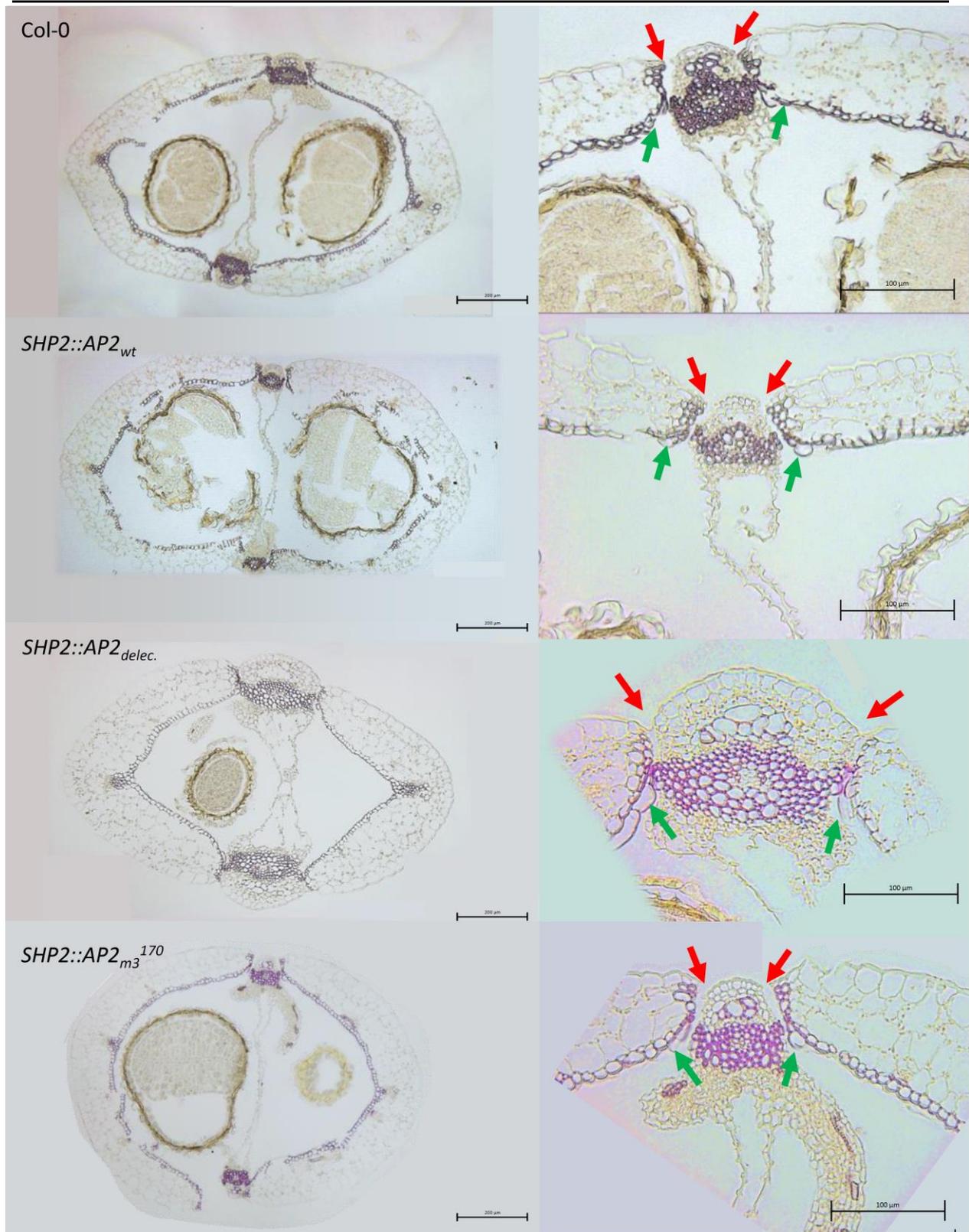
amplificar dichas regiones como se describe en [4.5.3](#). Tras ello, haciendo uso apropiado de la tecnología GoldenBraid, diseñamos con estos promotores una serie de vectores intermedios, que se muestran en la Figura 16. Una de las principales ventajas del GoldenBraid, es que es un sistema modular. Así, los vectores intermedios obtenidos se pueden utilizar para generar otras construcciones intermedias y finales diferentes a las nuestras, con otros propósitos diferentes, facilitando el trabajo de quien los requiera. De igual forma, para la generación de estos vectores, hemos utilizado módulos y unidades transcripcionales que ya se habían generado previamente: el módulo del sistema Gateway y el del terminador NOS, y la unidad transcripcional de la proteína fluorescente *dsRed*, con un promotor de expresión en semilla. Finalmente, utilizando el sistema Gateway como se describe en [4.5.7.3](#)., obtuvimos las siguientes construcciones finales SHP2::*AP2<sub>wt</sub>*, SHP2::*AP2<sub>m3</sub><sup>170</sup>*, SHP2::*AP2<sub>truncada</sub>*, (generadas previamente estas versiones de *AP2* en el laboratorio y clonadas en PCR8), SHP2::*SNZ<sub>m3</sub>*, SHP2::*SNZ<sub>truncada</sub>* e IND::*SNZ<sub>truncada</sub>* y transformamos un total de 24 plantas con cada una de ellas tal y como se describe en [4.4.3](#). El resto de construcciones, mostradas en la Figura 6, dieron más problemas experimentales que, sumados al poco tiempo que teníamos, ha ocasionado que aún estén en proceso de obtención o caracterización de las plantas. Recogimos las semillas de las plantas transformadas como se describe en [4.4.2](#) y pasamos a seleccionar las transgénicas a raíz de la fluorescencia emitida a causa del *dsRED*, tal y como se describe en [4.6.4](#). A día de hoy, estamos en posesión de las semillas T2. En este punto de la investigación, debemos de seleccionar aquellas plantas que solo tengan una inserción de ADN-T, es decir, que sigan una segregación mendeliana típica, con un 75% de semillas transgénicas y un 25% de semillas silvestres.

A fin de tener algún resultado preliminar que nos indique si la expresión dirigida de *SNZ* o *AP2* puede afectar de alguna manera el desarrollo del margen de valva, procedimos a la pre-caracterización de las líneas T1 obtenidas hasta el momento. Para ello, decidimos comprobar si en las plantas transgénicas obtenidas había variación en el desarrollo de algún tejido del fruto y/o variación en la acumulación de lignina. Cuando los frutos alcanzaron un estado de maduración 17-18, momento en el que empiezan a amarillear y acumular lignina, procedimos a su fijación, como se describe en [4.4.4](#). Tras ello, procesamos las muestras y las teñimos con floroglucinol, un compuesto que permite observar fácilmente la acumulación de lignina con color rojizo. Este procesado de las muestras se describe desde el punto [4.6.1](#). al [4.6.3](#). Tras observar dichas muestras al microscopio obtuvimos los resultados que se muestran en la Figura 17 y la Figura 18.

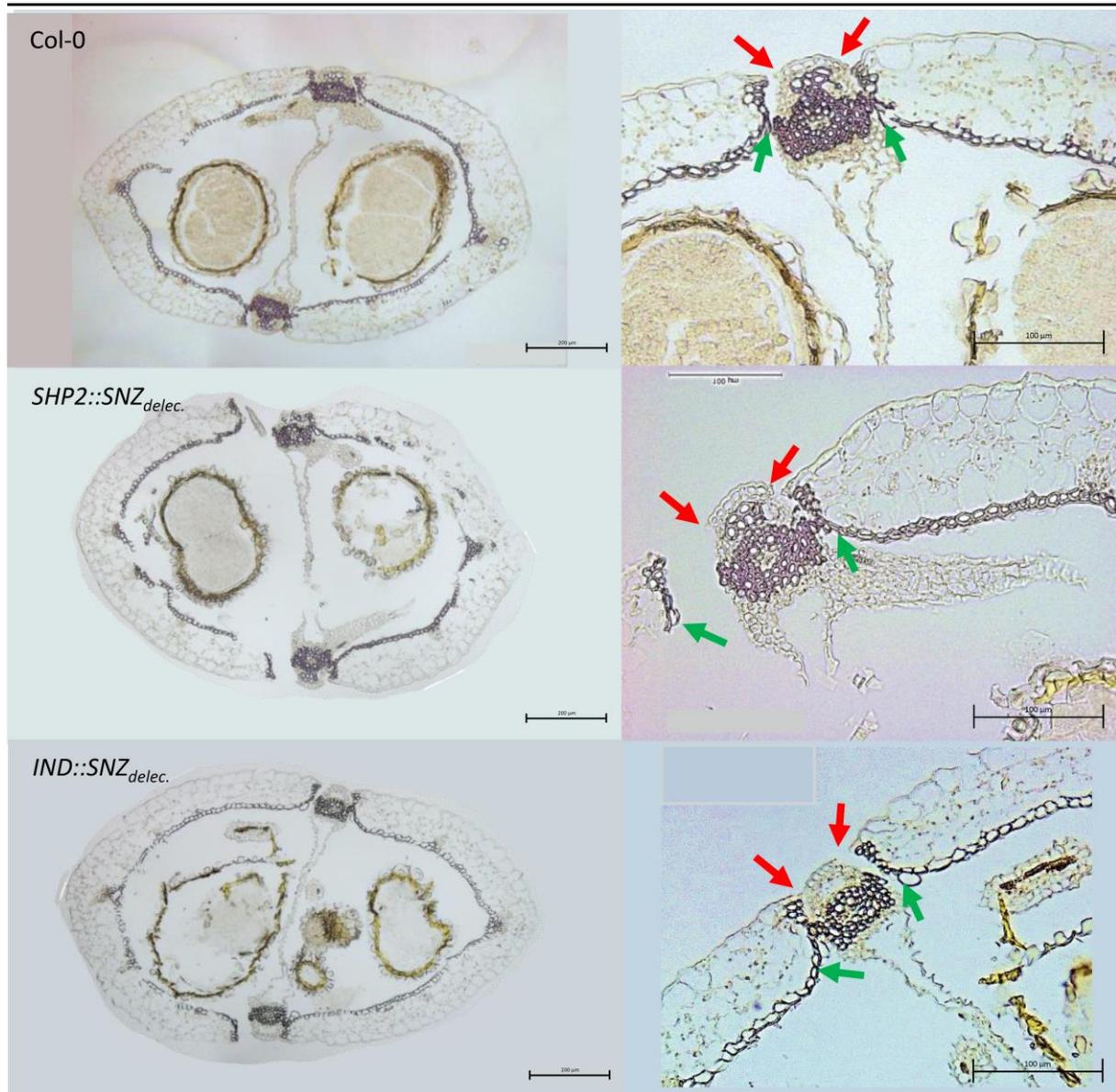
Además, a fin de tener más resultados que permitan elucidar el papel de *AP2* en el margen de valva, también trabajamos con alelos mutantes *ap2* generados por mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS), que ocasiona transiciones de bases en posiciones aleatorias del gen, previamente publicadas y caracterizadas por distintos autores. Estas líneas, disponibles para su compra, habían sido obtenidas y utilizadas previamente en el laboratorio para estudiar otras características del gen *AP2*. Las líneas utilizadas se representan en la Figura 19. Así, los mutantes *ap2-2* y *ap2-6*, tienen afectado el sitio donante de splicing, impidiéndose así un correcto procesamiento del ARN. *ap2-5* y *ap2-7*, por su parte, presentan alteraciones de aminoácidos que afectan a la funcionalidad de la proteína. Todos son mutantes recesivos que han sido caracterizados para el desarrollo floral, donde producen cambios homeóticos: en *ap2-2* y *ap2-6*, los pétalos se transforman en carpelos; en *ap2-7*, *ap2-5* y *ap2-6*, los sépalos se transforman en carpelos; y en *ap2-5* los pétalos se transforman en estambres (Kunst *et al.*, 1989; Bowman *et al.*, 1994). Sin embargo, no han sido caracterizados en el desarrollo del margen de valva. Para contribuir a ello, hemos realizado el mismo proceso descrito para nuestras plantas transgénicas de fijación de silicuas y su tinción con floroglucinol. El resultado se muestra en la Figura 20.



**Figura 16.-** Representación de los vectores intermedios generados: pUPD (A), pDGB3 $\alpha$ 2 (B) y pDGB3 $\Omega$ 1 (C). Se han representado, además, los genes de resistencia a antibióticos, los marcadores de selección, los sitios *attR* previos a la reacción LR del sistema Gateway, los sitios LB y RB, y orígenes de replicación para diversas bacterias. Los vectores finales de expresión no se representarán, pues son idénticos a los vectores intermedios (C), pero sustituyendo el sitio Gateway por las diferentes secuencias codificantes correspondientes.



**Figura 17.-** Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a una planta silvestre de ecotipo Columbia y plantas transgénicas con diferentes alelos de *AP2* bajo el control del promotor del gen *SHP2*. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. En la columna de la izquierda, se muestran imágenes a un aumento 10x. En la columna de la derecha, se muestran las mismas imágenes a 20x. En la esquina inferior derecha se muestra la barra de escala en micras.



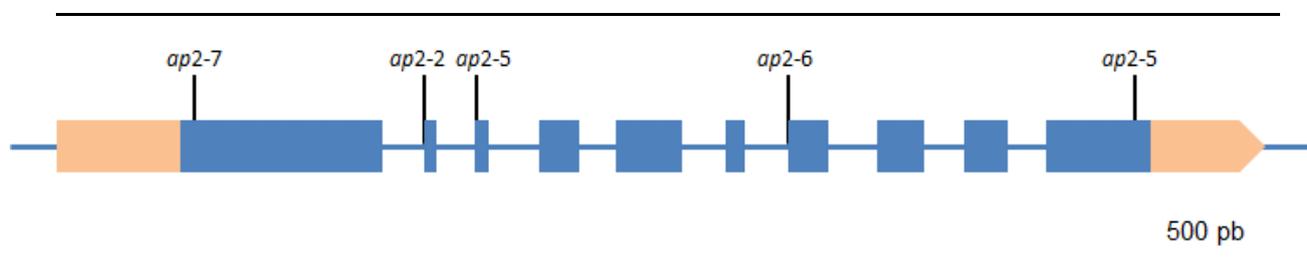
**Figura 18.-** Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a una planta silvestre de ecotipo Columbia y plantas transgénicas con diferentes alelos de *SNZ* bajo el control del promotor del gen *SHP2* y de *IND*. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. En la columna de la izquierda, se muestran imágenes a un aumento 10x. En la columna de la derecha, se muestran las mismas imágenes a 20x. En la esquina inferior derecha se muestra la barra de escala en nanómetros

En cuanto a las diferentes versiones de *AP2* estudiadas, lo más interesante a destacar es que, como puede observarse en la Figura 18, en la versión truncada, el replum es más grande que en el control. Además, si nos fijamos en las flechas verdes, hay lignificación en algunas células de la capa subepidérmica, mientras que ésta está totalmente ausente en el control. A priori, si tenemos en cuenta lo que comentamos en la introducción, no son los resultados que esperábamos. Esperábamos que al expresar versiones de *AP2* resistentes a la degradación del miR172 consiguiésemos aumentar la presencia de este factor en el margen de valva, reprimiéndose los genes de identidad de este tejido, *SHP2*, *IND* y *ALC*, y, de esta manera, obtener menor acumulación de lignina (Ripoll *et al.*, 2011 y 2015). Sin embargo, no solo no observamos una menor acumulación de lignina, sino que, en algunos casos, parece que la acumulación de lignina es mayor, estando presente en algunas células de la capa

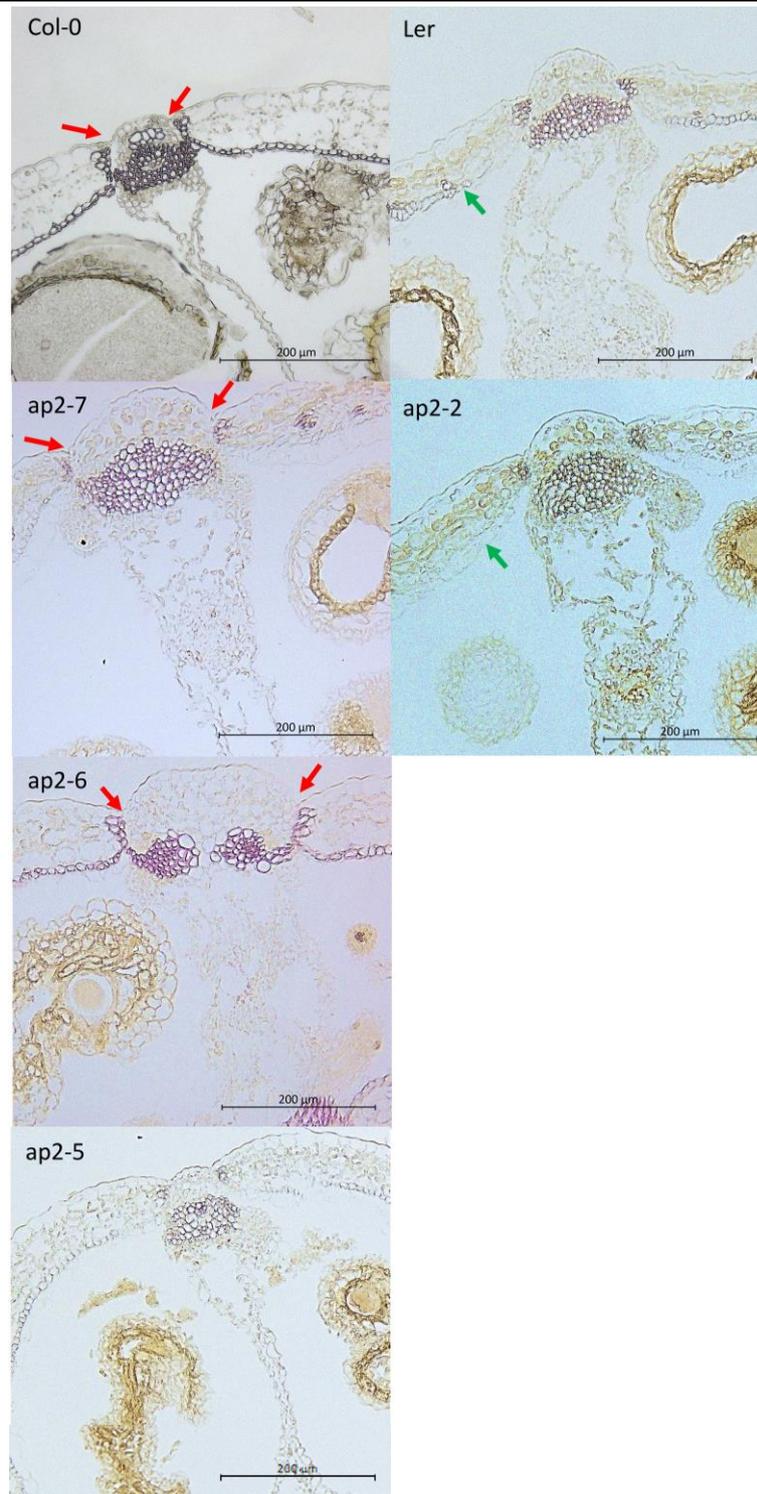
subepidérmica. Además, como también se comentó en la introducción, *AP2* reprime los genes de identidad de replum, *RPL* y *BP*. De esta manera, si la sobreexpresión de *AP2* en el margen de valva pudiese ocasionar también de alguna manera un incremento de la presencia de este gen en el replum, esperaríamos que este fuese más pequeño, no más grande, que de hecho es lo que se puede observar en la Figura 18. Por todo ello, la explicación más probable que encontramos es que se haya producido un fenómeno de cosupresión. Se trata de un mecanismo epigenético de silenciamiento génico post-transcripcional que se dispara cuando se alcanza un determinado umbral de ARNm del gen en cuestión, así el transgén se vuelve inactivo de manera reversible junto con la copia del gen en el cromosoma (Smyth *et al.*, 1997). Si este fuera el caso, se explicarían los extraños fenotipos obtenidos, contrarios a los esperados por un silenciamiento del transgén y del gen endógeno. Debemos recordar aquí que se trata de una pre-caracterización. No sabemos si las plantas estudiadas tienen una inserción o varias de ADN-T ni el nivel de expresión del transgén. Para seleccionarlas, muchas veces nos fijamos en que algunos frutos abiertos tuviesen las semillas rojas, fruto de la expresión del *dsRED*, que a veces se hace visible sin necesidad de fluorescencia. Es posible que estas plantas, con las semillas claramente rojas a simple vista, tengan más de una inserción, habiendo una carga excesiva del transgén que ocasiona el fenómeno de cosupresión mencionado.

En el caso de las versiones de *SNZ* testadas bajo el control del promotor de *IND* y *SHP2*, no puede observarse ninguna diferencia clara entre el control y las plantas transgénicas. Esto, podría ser un indicio de que, realmente, *SNZ* no es capaz de regular de modo significativo a los genes implicados en el desarrollo del margen de valva, por lo que su sobreexpresión no produce ningún efecto. Sin embargo, y reiterando, se trata de un proceso de pre-caracterización que queremos refinar más en el futuro, por lo que no queremos sacar conclusiones prematuras.

En cuanto a los distintos mutantes *ap2* caracterizados, como se observa en la Figura 20, aparecen patrones de lignificación atípicos: en cuanto al tamaño del replum, delimitado por flechas rojas, vemos que este es más grande en los mutantes *ap2-7* y *ap2-6* que en el control. Este hecho, por tanto, encaja con el papel de *AP2* descrito para el replum (Ripoll *et al.*, 2011), pues la ausencia de funcionalidad de este gen, represor de los genes de identidad de replum, hace que aumente la expresión de estos últimos genes, ocasionando un aumento de tamaño del replum. Sin embargo, esperaríamos que el patrón de lignificación fuese más fuerte, dado que se ha descrito el papel de *AP2* como represor de los genes de identidad del margen de valva, encargados de la lignificación (Ripoll *et al.*, 2011). Así, la ausencia de este gen, debería ocasionar un aumento de expresión de los genes de identidad del margen de valva y, por consiguiente, darse una mayor lignificación. Así, estos resultados no son cómo esperábamos y posteriormente discutiremos las posibles causas. Por otro lado, si nos fijamos en el mutante *ap2-2*, en fondo Landsberg, sí que parece que la capa subepidérmica, señalada con flechas verdes, está menos lignificada que en el control, pero de forma poco significativa.



**Figura 19.-** Estructura del gen *AP2*. Se muestran los lugares mutados en cada uno de los mutantes empleados en este trabajo. De color carne, se muestran el 5' y 3' UTR. Los recuadros azules representan los exones y las líneas azules los intrones. *ap2-2* y *ap2-6* presentan, respectivamente, transiciones A→G en posición 810 y G→A en posición 1616, teniendo afectados sitios donantes de splicing; *ap2-7* tiene una transición A→G en la posición 304 que ocasiona una sustitución Gln-10 a Glu; *ap2-5* tiene transiciones A→G en posiciones 937 y 2378 que ocasionan, respectivamente sustituciones Gly-159 y Gln-420 a Glu. ADN genómico tomado como referencia. Todos ellos en fono Columbia, excepto *ap2-2*, en fondo Landsberg.



**Figura 20.-** Silicuas teñidas con floroglucinol observadas al microscopio. Las muestras pertenecen a los distintos mutantes *ap2* que se muestran en la Figura 19. Las flechas rojas delimitan el replum. Las Flechas verdes señalan células de la capa subepidérmica. Todas las imágenes están tomadas a un aumento 10X. A la izquierda, se muestra Col-0 y las versiones mutantes que tienen ese ecotipo como fondo. En la columna de la derecha, se muestra Ler y la versión mutante que tiene ese ecotipo como fondo.

Estos resultados tan contradictorios podrían asociarse con una mala ejecución experimental: al ser la primera vez que realizaba una técnica de este estilo, no tuve suficiente cuidado con factores como la recogida de frutos en grado de maduración óptimo 17-18, que, como explicamos anteriormente, es en el que comienza la acumulación de lignina y con que ésta fuese absolutamente consistente entre las distintas líneas. Por tanto, los frutos se fijaron aún muy verdes y sin haber producido un patrón de lignina definitivo. Otro factor que no se tuvo en cuenta fue la optimización de la zona del ovario que debía tomarse para fijar y confeccionar los estuches de parafina. De esta manera, los cortes obtenidos podrían ser de zonas algo distintas del ovario (la parte apical del fruto, la parte basal, o la zona intermedia). Por ello, puede ser que lo que se observa al microscopio sean partes muy diferentes de la silicua, o muy cerca del ápice o muy centrales. Así, los resultados obtenidos no son del todo comparables y debemos repetir el experimento adecuadamente en el futuro para obtener mejores conclusiones. De esta manera, en sentido estricto, no podemos obtener muy buenas conclusiones en cuanto a la utilidad de las distintas versiones de *AP2* para modificar el desarrollo del margen de valva y el patrón de lignificación.

Así, el resultado más relevante de esta parte del trabajo es haber obtenido multitud de herramientas para la caracterización del papel de estos genes en el margen de valva: diferentes vectores de trabajo, plantas transgénicas T2, versiones mutantes de *ap2* con las que trabajar, etc.

### **Perspectiva General**

En general, hemos sentando una base sólida para seguir estudiando el papel de estos genes en el GPA y el desarrollo del margen de valva, habiendo obtenido muchas herramientas biotecnológicas para ello. Uno de los resultados más interesantes es la hipotética ausencia de funcionalidad en la parte C' terminal de *SNZ*. Si esto se confirma, se facilitaría el trabajo experimental dirigido a la obtención de alelos de *SNZ* resistentes a la degradación por el miR172 en distintas especies. Por lo tanto, se trata de un campo en el que profundizaremos en el futuro como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, el resultado que más nos ha sorprendido ha sido el obtenido con las plantas TFL1::*SNZ<sub>wt</sub>*. En trabajos publicados, la sobreexpresión de *AP2* apenas ocasiona efectos en cuanto a fenotipos como el retraso de la floración o el desarrollo floral, manifestándose este fenotipo muy débilmente en muy pocas plantas transformantes (Chen *et al.*, 2004; Balanzà *et al.*, 2018). Y lo mismo ocurre con *TOE3*, no ocasionando ningún fenotipo en floración al sobreexpresar la versión silvestre (Jung *et al.*, 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de versiones resistentes a la degradación por el miR172 de estos dos genes, por su parte, sí que dan lugar a fenotipo (Balanzà *et al.*, 2018; Jung *et al.*, 2014). Por ello, no esperábamos que al expresar en el SAM la versión silvestre de *SNZ*, fuésemos a obtener un retraso en el GPA. Como comentamos anteriormente, tal vez se deba a una diferente forma de regulación de estos genes, siendo esta una de las características que más en profundidad queremos estudiar en el futuro para esclarecer todo este tema.

## 6. Conclusiones y proyección futura

Este trabajo de Fin de Master surge como continuación y complemento a las diversas líneas de investigación que se están llevando a cabo en el laboratorio enfocadas en la caracterización de la Parada Global de la Proliferación, así como para caracterizar la implicación de los genes *AP2* y *AP2-like* en el desarrollo del margen de valva.

Hemos obtenido y clonado diferentes alelos mutantes de los genes *SNZ* y *TOE3* resistentes a la degradación por el miR172, además del alelo silvestre, para estudiar los efectos de su sobreexpresión en el SAM y el margen de valva.

Hemos generado construcciones finales de sobreexpresión de estos alelos bajo el control del promotor CaMV35S para determinar su impacto en diferentes procesos de la planta. Concretamente, hemos generado las construcciones 35S::*AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup> (versión obtenida previamente en el laboratorio), 35S::*SNZ*<sub>m3</sub> y 35S::*SNZ*<sub>truncada</sub>. Hemos transformado plantas con dichas construcciones y hemos obtenido semillas T2. Finalmente, hemos pre-caracterizado su efecto en el tiempo de floración y el desarrollo floral en plantas T1. En el futuro, obtendremos plantas con sobreexpresión de todos los alelos que faltan y procederemos a su caracterización.

Hemos generado construcciones finales con estos alelos bajo el control del promotor de *TFL1* para dirigir su expresión al SAM. Concretamente, hemos generado las construcciones TFL1::*SNZ*<sub>wt</sub>, TFL1::*TOE3*<sub>m3</sub>, TFL1::*AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>. Hemos transformado plantas con dichas construcciones y hemos obtenido semillas T2. Finalmente, hemos caracterizado su efecto en el GPA en plantas T1. En el futuro, obtendremos plantas con expresión dirigida en el SAM de todos los alelos que faltan y procederemos a su caracterización.

Hemos amplificado la región promotora de los genes *IND* y *SHP2* para dirigir la expresión de los diferentes alelos de *TOE3* y *SNZ* generados al margen de valva.

Hemos utilizado la tecnología GoldenBraid para generar una serie de vectores intermedios y finales que pueden ser utilizados con diferentes fines en función los intereses del investigador. Nosotros, en concreto, los hemos utilizado para obtener construcciones finales que contengan la región promotora de los genes *IND* y *SHP2* obtenidas y dirijan así la expresión de los alelos que hemos generado al margen de valva. Concretamente, hemos generado las construcciones SHP2::*AP2*<sub>wt</sub>, SHP2::*AP2*<sub>m3</sub><sup>170</sup>, SHP2::*AP2*<sub>truncada</sub> (todas estas versiones de *AP2* se habían obtenido previamente en el laboratorio), SHP2::*SNZ*<sub>truncada</sub> e IND::*SNZ*<sub>truncada</sub>. Hemos transformado plantas con estas construcciones y hemos obtenido semillas T2. Finalmente, hemos caracterizado su efecto en el desarrollo del margen de valva en plantas T1. Para ello, hemos observado la estructura de secciones transversales de silicuas de estas plantas y la acumulación de lignina en las mismas mediante su tinción con floroglucinol. En el futuro, obtendremos plantas con expresión dirigida en el margen de valva de todos los alelos que faltan y procederemos a su caracterización.

Hemos caracterizado el efecto en el desarrollo del margen de valva de diferentes alelos mutantes de *AP2*. Concretamente, hemos utilizado los alelos *ap2-5*, *ap2-6*, *ap2-7* (los tres en fondo Col) y *ap2-2* (en fondo Ler). Para ello, hemos observado la estructura de secciones transversales de silicuas de estas plantas y la acumulación de lignina en las mismas mediante su tinción con floroglucinol.

En el futuro, queremos, además de completar todas las construcciones y caracterizaciones que restan, determinar si los vectores que hemos generado mediante la tecnología GoldenBraid realmente dirigen la expresión de los genes al margen de valva. Para ello, queremos expresar la GFP (Green Fluorescent Protein) bajo el control de los promotores *IND* y *SHP2*, presentes en estos vectores. Además, seleccionaremos plantas T2 con una sola inserción de las construcciones mencionadas, seleccionando para ello aquellas que sigan una segregación mendeliana típica. Con estas plantas, procederemos a caracterizar en profundidad el efecto de estos alelos en el GPA y el desarrollo del margen de valva.

## 7. Bibliografía

- Alonso-Cantabrana, H., Ripoll, J. J., Ochando, I., Vera, A., Ferrándiz, C. and Martínez-Laborda, A. (2007). Common regulatory networks in leaf and fruit patterning revealed by mutations in the *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES1* gene. *Development* **134**: 2663-2671.
- Araki T. (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 63-68.
- 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.
- Balanzà V., Martínez-Fernández I., Sato S., Yanofsky M.F., Kaufmann K., Angenent G.C., Bemer M., Ferrándiz C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a *FRUITFULL-APETALA2* pathway. *Nature Communications* **9**: 565.
- Ballester P. and Ferrándiz C. (2017). Shattering fruits: variations on a dehiscent theme. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**: 68-75.
- Bellaoui, M., Pidkowich, M. S., Samach, A., Kushalappa, K., Kohalmi, S. E., Modrusan, Z., Crosby, W. L. and Haughn, G. W. (2001). The *Arabidopsis* *BELL1* and *KNOX TALE* homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals. *Plant Cell* **13**: 2455-2470.
- Bhatt, A. M., Etchells, J. P., Canales, C., Lagodienko, A. and Dickinson, H. (2004). *VAAMANA*-a *BEL1*-like homeodomain protein, interacts with *KNOX* proteins *BP* and *STM* and regulates inflorescence stem growth in *Arabidopsis*. *Gene* **328**: 103-111.
- Boscá S., Knauer S. and Laux T. (2011). Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Front Plant Sci* **2**: 93.
- Bouché F., Lobet G., Tocquin P. and Périlleux C. (2015). *FLOR-ID*: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **44**: 1667-1171.
- Bowman J. (1994). *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. New York, NY: Springer Verlag.
- Bowman J.L., Smyth D.R. and Meyerowitz E.M. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**: 1-20.
- Bowman JL, Smyth DR, Meyerowitz EM. (1991). Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **112**: 1-20.
- 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.
- Brand, U., Grünewald, M., Hobe, M. and Simon, R. (2002). Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**: 565-575.
- 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.
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in *Arabidopsis* flower development. *Science* **303**: 2022-2025.
- Chien J.C., Sussex I.M. (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol* **111**: 1321-1328.
- Cho Y. H. and Yoo S. D. (2009). Emerging complexity of ethylene signal transduction. *J. Plant Biol.* **52**: 283-288.
- Chuck, G., Lincoln, C. and Hake, S. (1996). *KNAT1* induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**: 1277-1289.
- Cole, M., Nolte, C. and Werr, W. (2006). Nuclear import of the transcription factor *SHOOT MERISTEMLESS* depends on heterodimerization with *BLH* proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **34**: 1281-1292.
- 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.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J. Z. and Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.* **10**: 967-979.
- Esau K. (1977). *Anatomy of Seed Plants*. New York: Wiley.
- Ferrándiz C. (2002). Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **53**: 2031-2038.

- Ferrándiz C., Pelaz S., and Yanofsky M.F. (1999). Control of carpel and fruit development in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 321-354.
- 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**: 725-34.
- Ferrandiz, C., Liljegren, S.J. and Yanofsky, M.F. (2000b). Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by *FRUITFULL* during *Arabidopsis* fruit development. *Science* **289**: 436-8.
- Flanagan, C.A., Hu, Y. and Ma, H. (1996). Specific expression of the *AGL1* MADSbox gene suggests regulatory functions in *Arabidopsis* gynoecium and ovule development. *Plant J.* **10**: 343-353.
- 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.
- Fujimoto S.Y., Ohta M., Usui A., Shinsh H. and Ohme-Takagi M. (2000). *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, *Plant Cell* **12**: 393-404.
- Gallavotti, A., Long, J. A., Stanfield, S., Yang, X., Jackson, D., Vollbrecht, E. and Schmidt, R. J. (2010). The control of axillary meristem fate in the maize ramosa pathway. *Development* **137**: 2849-2856.
- Gifford EM. (1954). The shoot apex in angiosperms. *Bot. Rev.* **20**: 429-47.
- Gu, Q., Ferrandiz, C., Yanofsky, M.F. and Martienssen, R. (1998). The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **125**: 1509-17.
- Guo H.W. and Ecker J.R. (2004). The ethylene signaling pathway: new insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 40-49.
- Han Y.C., Kuang J.F., Chen J.Y., Liu X.C., Xiao Y.Y., Fu C.C., Wang J.N., Wu K.Q. and Lu W.J. (2016). Banana transcription factor MaERF11 recruits histone deacetylase MaHDA1 and represses the expression of MaACO1 and expansins during fruit ripening. *Plant Physiol.* **171**: 1070:1084.
- Hay, A. and Tsiantis, M. (2010). *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development* **137**: 3153-3165.
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A. & Bleecker, A. B (1994). The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **106**: 863-876.
- Hensel, L.L., Grbic, V., Baumgarten, D.B., and Bleecker, A.B. (1993). Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 553-564.
- Hewitt E.J. and Eden A. (1953). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *The Analyst* **7**: 329-330.
- Hiratsu, K., Mitsuda, N., Matsui, K. and Ohme-Takagi, M. (2004). Identification of the minimal repression domain of *SUPERMAN* shows that the DLELRL hexapeptide is both necessary and sufficient for repression of transcription in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321**: 72-178.
- Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K. and Ohme-Takagi, M. (2002). The *SUPERMAN* protein is an active repressor whose carboxy-terminal repression domain is required for the development of normal flowers. *FEBS Lett.* **514**: 351-354.
- Honma T, Goto K. (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**: 525-29.
- Huang Z. (2017). *APETALA2* antagonizes the transcriptional activity of *AGAMOUS* in regulating floral stem cells in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **215**: 1197.1209.
- Irene M.F (2017). La ruta FUL-AP2 y la longevidad de los meristemos en *Arabidopsis thaliana*. Bases moleculares y potencial biotecnológico.
- Irish VF, Sussex IM. (1992). A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem. *Development* **115**: 745-53.
- 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 3117-3122.
- Jung J. H., Lee S., Yun J., Lee M. and Park C.M. (2010). The miR172 target *TOE3* represses *AGAMOUS* expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Science* **215-216**: 29-38.

- Jung J.H., Lee S., Yun J., Lee M., Park C.M. (2014). The miR172 target *TOE3* represses *AGAMOUS* expression during *Arabidopsis* floral patterning. *Plant Science* **215-216**: 29-38.
- Jung J.H., Seo Y.H., Seo P.J., Reyes J.L., Yun J., Chua N.H. and Park C.M. (2007). The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 2736-2748.
- Kanrar, S., Onguka, O. and Smith, H. M. (2006). *Arabidopsis* inflorescence architecture requires the activities of *KNOX-BELL* homeodomain heterodimers. *Planta* **224**: 1163-1173.
- Kerstetter R.A., Poethig R.S. (1998). The specification of leaf identity during shoot development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 373-398.
- Kim N. Y., Jang Y.J. and Park O.K. (2018). AP2/ERF Family Transcription Factors *ORA59* and *RAP2.3* Interact in the Nucleus and Function Together in Ethylene Responses. *Front. Plant. Sci.* **9**: 1675.
- Koyama T., Nii H., Mitsuda N., Ohta M., Kitajima S., Ohme-Takagi M. and Sato F. (2013). A regulatory cascade involving class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR transcriptional repressors operates in the progression of leaf senescence. *Plant Physiol.* **162**: 991-1005.
- Kunst L., Klenz J.E., Martinez-Zapater J. and Haughn G.W. (1089). AP2 Gene Determines the Identity of Perianth Organs in Flowers of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **1**: 1195-1208.
- Kushwahl N.S., Ahmad I., Ali S. (2014). Characterization of promoter of *Terminal Flower1 (TFL1)* gene of *Arabidopsis*. *Research journal of biotechnology* **9**: 35-40.
- Kushwahl N.S., Ahmad I., Ali S. (2014). Characterization of promoter of *Terminal Flower1 (TFL1)* gene of *Arabidopsis*. *Research journal of biotechnology* **9**: 35-40.
- Lee J.M., Joung J.G., McQuinn R., Chung M.Y., Fei Z.J., Tieman D., Klee H. and Giovannoni J. (2012). Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor *SIERF6* plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *Plant J.* **70**: 191-204.
- Li Y.C., Zhu B.Z., Xu W.T., Zhu H.L., Chen A.J., Xie Y.H., Shao Y. and Luo Y.B. (2007). *LeERF1* positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Rep.* **26**: 1999-2008.
- 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., 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**: 843-53.
- Liu M.C., Diretto G., Pirrello J., Roustan J.P., Li Z.G., Giuliano G., Regad F. and Bouzayen M. (2014). The chimeric repressor version of an ethylene response factor (ERF) family member, *Sl-ERF.B3*, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. *New Phytol.* **203**: 206-218.
- Liu, Z. and Karmarkar, V. (2008). Groucho/Tup1 family co-repressors in plant development. *Trends Plant Sci.* **13**: 137-144.
- Lohmann J. U., Hong R., 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.
- Lyndon R.F. (1990). *Plant Development: The Cellular Basis*. London: Unwin Hyman.
- Ma, H., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1991). *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Gene. Dev.* **5**: 484-495.
- Mathieu J., Yant L.J., Mürdter F., Küttner F. and Schmid M. (2009). Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *PLoS Biol.* **7**: e1000148.
- Mayer, K. F. X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Juergens, G. and Laux, T. (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805-815.
- Medford JI, Behringer FJ, Callos JD, Feldmann KA. (1992). Normal and abnormal development in the *Arabidopsis* vegetative shoot apex. *Plant Cell* **4**: 631-43.
- Nimchuk, Z. L., Tarr, P. T., Ohno, C., Qu, X. and Meyerowitz, E. M. (2011). Plant stem cell signaling involves ligand-dependent trafficking of the *CLAVATA1* receptor kinase. *Curr. Biol.* **21**: 345-352.

- Pauwels, L., Barbero, G. F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A. C., Chico, J. M., Bossche, R. V., Sewell, J., Gil, E. et al. (2010). *NINJA* connects the co-repressor *TOPLESS* to jasmonate signalling. *Nature* **464**: 788-791.
- Pelaz S, Ditta GS, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF. (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**: 200-3.
- Poethig R.S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* **250**: 923-930.
- Poethig RS. (1987). Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. *Am. J. Bot.* **74**: 581-94.
- Pouteau S. and Albertini C. (2009). The significance of bolting and floral transitions as indicators of reproductive phase change in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 3367-3377.
- Pré M., Atallah M., Champion A., De Vos M., Pieterse C.M. and Memelink J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* **147**: 1347-1357.
- Rajani, S. and Sundaresan, V. (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* **11**: 1914-22.
- Regal PJ. (1977). Ecology and evolution of flowering plant dominance. *Science* **196**: 622-629.
- 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. *Nat. Plants* **1**: 15036
- Ripoll, J. J., Roeder, H.K., Ditta, G.S., Yanofsky M.F. (2011). A novel role for the floral homeotic gene *APETALA2* during *Arabidopsis* fruit development. *Development* **138**: 5167-5176
- Robles P. and Pelaz S. (2005). Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 633-643.
- Roeder, A.H. and Yanofsky M.F. (2006). Fruit Development in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **4**: 0075.
- Roeder, A.H., Ferrandiz C. and Yanofsky M.F. (2003). The Role of the *REPLUMLESS* Homeodomain Protein in Patterning the *Arabidopsis* Fruit. *Curr. Biol.* **13**: 1630-1635.
- Rojo, E., Sharma, V. K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V. and Fletcher, J. C. (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the *Arabidopsis* *CLAVATA* stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**: 969-977.
- Rutjens, B., Bao, D., van Eck-Stouten, E., Brand, M., Smeeckens, S. and Proveniers, M. (2009). Shoot apical meristem function in *Arabidopsis* requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins. *Plant J.* **58**: 641-654.
- Sarrion-Perdigones A., Falconi E.E., Zandalinas S.I., Juarez P., Fernandez-del-Carmen A., Granell A. and Orzaez D. (2011). GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PLoS One.* **6**: e21622.
- Sarrion-Perdigones A., Palaci J., Granell A. and Orzaez D. (2014). Design and construction of multigenic constructs for plant biotechnology using the GoldenBraid cloning strategy. *Methods Mol Biol.* **1116**: 133-151.
- Sarrion-Perdigones A., Vazquez-Vilar M., Palaci J., Castelijns B., Forment J., Ziarsolo P., Blanca J., Granell A. and Orzaez D. (2013). GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol.* **162**: 1618-1631.
- Satina S, Blakeslee AF, Avery AG. (1940). Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras. *Am. J. Bot.* **27**: 895-905.
- Savidge, B., Rounsley, S.D. and Yanofsky, M.F. (1995). Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes. *Plant Cell* **7**: 721-733.
- 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.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G. and Laux, T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**: 635-644.
- Scofield, S., Dewitte, W. and Murray, J. A. (2007). The KNOX gene *SHOOT MERISTEMLESS* is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. *Plant J.* **50**: 767-781.
- Sehra B. and Franks R.G. (2017). Redundant CARG Box Cis-motif Activity Mediates *SHATTERPROOF2* Transcriptional Regulation during *Arabidopsis thaliana* Gynoecium Development. *Front. Plant. Sci* **8**: 1712.

- Sheng, O.J. and Citovsky, V. (1996). *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. *Plant Cell* **8**: 1699-1710.
- Smith, H. M. and Hake, S. (2003). The interaction of two homeobox genes, *BREVIPEDICELLUS* and *PENNYWISE*, regulates internode patterning in the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant Cell* **15**: 1717-1727.
- Smith, H. M., Campbell, B. C. and Hake, S. (2004). Competence to respond to floral inductive signals requires the homeobox genes *PENNYWISE* and *POUNDFOOLISH*. *Curr. Biol.* **14**: 812-817.
- Smyth D.R. (1997). Gene silencing: Cosuppression at a distance. *Current Biology* **7**: 793-796.
- Smyth D.R., Bowman J.L. and Meyerowitz E.M. (1990). Early Flower Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**: 755-767.
- Solano R., Stepanova A., Chao Q. and Ecker J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* **12**: 3703-3714.
- Sorefan K., Girin, T. Liljegren, S.J. Ljung, K. Robles, P. Galván-Ampudia C.S., Offringa R., Friml J., Yanofsky M.F., and Ostergaard L. (2009). A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature* **459**: 583-586.
- Spence, J., Vercher. Y., Gates, P. And Harris, N. (1996). 'Pod shatter' in *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* and *B. juncea*. *J. Microsc.* **181**: 195-203.
- Stebbins GL. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.
- Steeves TA, Sussex IM. (1989). Patterns in Plant Development. *Nordic Journal of Botany* **11**: 204-204.
- Sunkar, R. (ed.). (2012). *MicroRNAs in Plant Development and Stress Responses*. Berlin; Heidelberg: Springer.
- Szemenyei, H., Hannon, M. and Long, J. A. (2008). TOPLESS mediates auxin dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* **319**: 1384-1386.
- Taketa S., Amano S., Tsujino Y., Sato T., Saisho D., Kakeda K., Nomura M., Suzuki T., Matsumoto T., Sato K., Kanamori H., Kawasaki S. and Takeda K. (2008). Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 4062-4067.
- Tang Y.H., Qin S.S., Guo Y.L., Chen Y.B., Wu P.Z., Chen Y.P., Li M.R., Jiang H.W. and Wu G.J. (2016). Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in physic nut and overexpression of the *JcERF011* gene in rice increased its sensitivity to salinity stress. *PLoS ONE* **11**: e0150879
- Telfer A., Bollman K.M., Poethig R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 645-654.
- Tilney-Bassett RAE. (1986). *Plant Chimeras*. London: E Arnold.
- Tiwari, S. B., Hagen, G. and Guilfoyle, T. J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543.
- Trujillo L.E., Sotolongo M., Menendez C., Ochogavia M.E., Coll Y., Hernandez I., Borrás-Hidalgo O., Thomma B.P.H.J., Vera P. and Hernandez L. (2008) SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. *Plant Cell Physiol.* **49**: 512-525.
- van der Fits L. and Memelink J. (2000). ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295-297.
- van Loon L. C., Geraats B. P. and Linthorst H. J. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**: 184-191.
- Wang K. L., Li H., Ecker J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* **14**: 131-151.
- 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. *Front. Plant Sci.* **7**: 1383.
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**: 843-59.
- 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.
- Wuest, S. E., Philipp, M. A., Guthorl, D., Schmid, B. & Grossniklaus, U (2016). Seed production affects maternal growth and senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **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.
- Xiao Y.Y., Chen J.Y., Kuang J.F., Shan W., Xie H., Jiang Y.M. and Lu W.J. (2013). Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes. *J. Exp. Bot.* **64**: 2499-2510.
- Yadav, R. K., Perales, M., Gruel, J., Ohno, C., Heisler, M., Girke, T., Jonsson, H. and Reddy, G. V. (2013). Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Mol. Syst. Biol.* **9**: 654.
- 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 *Plant Cell* **22**: 2156–2170.
- Yin X.R., Xie X.L., Xia X.J., Yu J.Q., Ferguson I.B., Giovannoni J.J. and Chen K.S. (2016). Involvement of an ethylene response factor in chlorophyll degradation during citrus fruit degreening. *Plant J.* **86**: 403-412.
- 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. *Plant J.* **51**: 840-849.
- Zhu X.L., Qi L., Liu X., Cai S.B., Xu H.J., Huang R.F., Li J.R., Wei X.N. and Zhang Z.Y. (2014). The wheat ethylene response factor transcription factor PATHOGENINDUCED ERF1 mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. *Plant Physiol.* **164**: 1499-1514.
- Zou Y., Wang Y., Wang L., Yang L., Wang R. and Li X. (2013). miR172b Controls the Transition to Autotrophic Development Inhibited by ABA in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **5**: 64770.