



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y
Celular de Plantas

Caracterización del papel del factor de transcripción
SHORT VEGETATIVE PHASE en el control del final de la
floración

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de
Plantas

AUTOR/A: Gómez Abajo, María del Mar

Tutor/a: Gadea Vacas, José

Director/a Experimental: BALANZA PEREZ, VICENTE

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Resumen

Según la ONU, la población mundial va a seguir aumentando y se espera alcanzar los 9.700 millones de personas en el 2050. Hasta la fecha se ha asegurado la alimentación mejorando los rendimientos de los cultivos, pero también aumentando la superficie destinada a la agricultura. Lamentablemente, la superficie cultivable en el planeta es limitada, y las consecuencias del cambio climático están provocando ya la pérdida de miles de hectáreas cultivables. Es por ello que el desarrollo de plantas más productivas y mejor adaptadas a las nuevas condiciones climáticas es una prioridad para la comunidad científica. La producción de flores/frutos/semillas de los cultivos utilizados depende en gran medida de la actividad de los meristemas inflorescentes que las plantas y del tiempo que dura esta actividad. En plantas, el final de la etapa reproductiva está controlado principalmente por dos mecanismos: La ruta *FUL-AP2* y otro mecanismo que está controlado por el número de semillas producido por la planta. Se ha propuesto que el control del final de la floración ejercido por las semillas dependería, entre otros factores, de una señal móvil generada en las semillas que afectaría al funcionamiento del meristemo inflorescente. Resultados preliminares sugieren un posible papel del factor de transcripción SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) en el control del final de la floración en *Arabidopsis*. Además, se han descrito claras interacciones entre SVP y los componentes de la ruta *FUL-AP2* durante otros procesos del desarrollo, indicando que SVP podría ejercer un papel clave en el control de este proceso de desarrollo.

Palabras clave: meristemo apical del tallo; rendimiento; SVP; *FUL-AP2*

Abstract

According to the UN, the world's population will continue to grow and is expected to reach 9.7 billion people by 2050. So far, food security has been ensured by improving crop yields, but also by increasing the area used for agriculture. Unfortunately, the world's arable land is limited, and the consequences of climate change are already causing the loss of thousands of hectares of arable land. This is why the development of more productive plants that are better adapted to the new climatic conditions is a priority for the scientific community. The flower/fruit/seed production of the crops used depends to a large extent on the activity of the inflorescence meristems of the plants and the length of time this activity lasts. In plants, the end of the reproductive stage is mainly controlled by two mechanisms: The *FUL-AP2* pathway and another mechanism that is controlled by the number of seeds produced by the plant. It has been proposed that the control of the end of flowering exerted by the seeds would depend, among other factors, on a mobile signal generated in the seeds that would affect the functioning of the inflorescence meristem. Preliminary results suggest a possible role of the transcription factor SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) in the control of flowering end in *Arabidopsis*. In addition, clear interactions between SVP and components of the *FUL-AP2* pathway during other developmental processes have been described, indicating that SVP could play a key role in the control of this developmental process.

Key words: shoot apical meristem; yield; SVP; *FUL-AP2*

Índice

1. Introducción	1
1.1. Cambio climático y agricultura en el contexto actual.....	1
1.2. Estrategias reproductivas en plantas: monocarpia y polycarpia.....	1
1.3. Transición floral.....	2
1.4. Final de la floración	5
2. Antecedentes.....	8
3. Objetivos.....	9
4. Material y métodos.....	10
4.1. Material vegetal.....	10
4.2. Condiciones de cultivo en invernadero	10
4.3. Caracterización fenotípica de la cinética de producción de flores.....	10
4.5. Hibridación in situ de RNA no radiactiva.....	11
4.5.1. Diseño y cebadores de la sonda específica	11
4.5.2. Extracción de DNA genómico	11
4.5.3. Amplificación de la sonda mediante PCR.....	11
4.5.4. Preparación de muestras: recolección, fijación y procesado de las muestras	12
4.5.6. Preparación de bloques y seccionamiento de tejidos.....	12
4.5.7. Marcado y revelado de la sonda	12
4.5.8. Pretratamiento de las secciones	13
4.5.9. Hibridación y lavados	14
4.5.10. Reacción y detección de anticuerpos.....	14
4.6. Microscopía óptica	14
4.7. Detección histoquímica mediante tinción de la β -Glucuronidasa (GUS)	14
4.8. Microscopia de bajo aumento.....	15
4.9. Recolección y procesado de muestras para extracción de RNA y DNA	15
4.10. Extracción del RNA total.....	16
4.11. Purificación del RNA.....	16
4.12. Síntesis de cDNA	16
4.13. Cebadores de las PCR cuantitativas	16
4.14. PCR cuantitativa (qPCR).....	17
4.15. Generación de líneas transgénicas mediante el sistema CRISPR/Cas9.....	18
4.15.1. Síntesis de oligonucleótidos.....	18
4.15.2. Clonación mediante el sistema Golden Gate (GG).....	18
4.15.3. Amplificación de la secuencia mediante PCR	19
4.15.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa y purificación del DNA.....	19

4.15.5. Reacción de ligación	20
4.15.6. Vectores utilizados	20
4.15.7. Cepas bacterianas	20
4.15.8. Condiciones de cultivo de microorganismos	20
4.15.9. Agentes de selección	21
4.15.10. Transformación de células competentes	21
4.15.11. Identificación de las colonias positivas mediante PCR de colonias	21
4.15.12. Aislamiento del DNA plasmídico	22
4.15.13. Verificación de las colonias positivas por secuenciación	22
4.15.14. Cebadores utilizados para la detección y verificación de la construcción	22
4.15.16. Transformación genética de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
4.15.17. Recolección y almacenaje de semillas	23
5. Resultados.....	24
5.1. Fenotipado de la cinética de producción de flores	24
5.1.1. SVP inhibe el final de la floración	24
5.1.2 Impacto de la calidad de la luz y el fotoperiodo en el control del final de la floración	25
5.1.3. El control de SVP sobre la actividad del meristemo no depende de la biomasa, sino de posibles cambios en el SAM dependientes de la edad.....	29
5.1.4. SVP podría interactuar con la señal derivada de la semillas en el control del final de la floración	31
5.2. Análisis del patrón de expresión de SVP.....	33
5.3. Análisis de expresión de genes clave para el control del final de la floración en el mutante <i>svp-32</i>	37
5.4. Generación de herramientas moleculares para estudiar el papel de SVP en el control del final de la floración	40
6. Discusión	42
7. Referencias Bibliográficas.....	46
Anexo 1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030	51

Índice de Figuras

Figura 1: Vías mediante las que se produce la transición floral.....	3
Figura 2: Modelo de regulación génica del GPA de manera dependiente de la edad...	6
Figura 3: Fenotipado de la cinética de producción de flores en día largo (LD)	24
Figura 4: Fenotipado de la cinética de producción de flores con R/FR≈5.....	26
Figura 5: Fenotipado de la cinética de producción de flores en día corto (SD).....	28
Figura 6: Fenotipado de la cinética de producción de flores en plantas pasadas de día corto (SD) a día largo (LD).....	30
Figura 7: Fenotipado de la cinética de producción de flores en plantas sometidas a poda	32
Figura 8: Producción de flores total y días en los que se encuentra el meristemo activo en condiciones de poda	33
Figura 9: Patrón de expresión de SVP en el SAM 2 semanas después del bolting (2 wab).....	34
Figura 10: Patrón de expresión de la línea reportera pSVP:GUS:GFP en plántulas y transición floral.....	35
Figura 11: Patrón de expresión de la línea reportera pSVP:GUS:GFP en inflorescencias a 1, 2 y 3 semanas después del bolting (1,2 y 3 wab)	36
Figura 12: Patrón de expresión de la línea reportera pSVP:GUS:GFP en semillas	37
Figura 13: Niveles de expresión relativos en miR172a, miR172b, miR172d, FT, AP2 y FUL en el SAM, tallo, flor y fruto 2 semanas después del bolting (2 wab)	39
Figura 14: Secuencia genómica de SVP donde se ha introducido la delección mediante los gRNA	40
Figura 15: Esquema de la construcción generada para la obtención de mutantes nulos de SVP	41

Índice de Tablas

Tabla 1: Mutantes de pérdida de función utilizados en el presente trabajo.....	10
Tabla 2: Cebadores específicos para la amplificación de la sonda de SVP	11
Tabla 3: Cebadores específicos para los análisis de expresión génica mediante qPCR	17
Tabla 4: Cebadores específicos para la obtención del gRNA	18
Tabla 5: Vectores utilizados para la clonación.....	20
Tabla 6: Cepas bacterianas utilizadas.....	20
Tabla 7: Antibióticos utilizados como agentes de selección.....	21
Tabla 8: Cebadores utilizados para la detección y verificación de la construcción	22

1. Introducción

1.1. Cambio climático y agricultura en el contexto actual

Según la Organización de las Naciones Unidas, en los próximos 30 años la población mundial aumentará en casi 2.000 millones de personas, alcanzando una cifra de 9.700 millones de personas para el año 2050. En este contexto, no está asegurada la disponibilidad de alimentos para toda la población; esto, unido a los efectos del cambio climático, con episodios climáticos extremos que afectan a la disponibilidad de alimentos, recursos y superficie cultivable, supone un riesgo para la seguridad alimentaria.

Sin embargo, aunque la agricultura contribuye al cambio climático, es también parte de la solución. Producir alimentos de manera sostenible junto con estrategias que permitan adaptarse a esta situación cambiante, son elementos claves para afrontar la crisis climática y poblacional a largo plazo (FAO, s.f).

La producción de alimentos de manera sostenible es muy interesante, pero lo cierto es que urge aumentar las cifras de producción de estos a escala mundial. Para ello existen alternativas, sin embargo, aumentar la superficie de producción no es una de ellas. Es un hecho contrastado el rápido deterioro de los suelos en todo el mundo debido a la erosión, contaminación, pérdida de nutrientes y de carbono orgánico y otras amenazas (FAO, 2015). Aunque esta tendencia puede revertirse, las estrategias para la recuperación de suelos, no superan el ritmo al que aumenta la población y se pierde superficie disponible para el cultivo. Optimizar la productividad de los cultivos constituye gran parte de la solución. Con la Revolución Verde, se produjo un aumento de más del triple de la producción agrícola entre el año 1969 y el 2015, pero estos aumentos de rendimiento se están viendo muy ralentizados en los últimos años, por lo que el resurgimiento de la investigación y el desarrollo agrario van a ser cruciales en este proceso (FAO, 2017).

1.2. Estrategias reproductivas en plantas: monocarpia y polycarpia

La evolución biológica está determinada por el proceso de optimización de la supervivencia y de la reproducción de las diferentes especies en respuesta a los cambios experimentados en los ecosistemas. Los individuos presentan una serie de fases que conforman su ciclo vital, y en concreto las plantas pasan por una serie de estados fenológicos antes de la senescencia, entre los que se encuentran la germinación, la fase de crecimiento vegetativo, la floración y la maduración y producción de semillas, entre otras. Esta definición de las fases ha permitido estudiar y comprender mucho mejor los mecanismos del desarrollo (Kiefer et al., 2018).

A grandes rasgos, el ciclo vital de las plantas con semilla puede dividirse en dos categorías. Por un lado, se encuentran las plantas monocárpicas, las cuales completan su ciclo una vez llevada a cabo la floración y producción de semillas; y por otro, están las plantas policárpicas, cuyo ciclo vital se extiende, y suelen pasar por varias fases consecutivas de crecimiento vegetativo y reproductivo con floración y producción de semillas (Kiefer et al., 2018).

Tanto en plantas monocárpicas como policárpicas, la etapa reproductiva se inicia con la transición floral, un proceso durante el cual ocurre la transformación de los meristemos vegetativos a meristemos reproductivos. Este proceso ha sido ampliamente estudiado

en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, permitiendo la identificación y caracterización de las diferentes rutas que gobiernan este proceso. Este conocimiento, se ha extendido posteriormente a otras plantas y cultivos debido a su alto interés agronómico (Kiefer et al., 2018). El interés por entender los mecanismos que controlan la transición floral es evidente, ya que, desde un punto de vista agronómico, es a partir de ese momento cuando la planta inicia la producción de flores, frutos y semillas. Por otro lado, el número final de flores, frutos y semillas que se producen tras la transición floral queda establecido por la actividad del meristemo inflorescente y el momento en que éste detiene su actividad (final de la floración). Sorprendentemente, a pesar de su importancia en el control del número final de flores, frutos y semillas, apenas se dispone de información sobre los eventos que controlan este proceso.

La comprensión de los diferentes procesos que actúan durante la fase reproductiva, permitirá plantear soluciones adaptativas para afrontar las situaciones de cambio constante que se producen en los ecosistemas aumentando la resiliencia.

1.3. Transición floral

La floración en las plantas superiores implica la transición de un meristemo vegetativo, que produce hojas y tallos, a un meristemo floral, que produce flores. En comparación con el final de la floración, la transición floral es un proceso mucho más estudiado donde el papel de los diferentes componentes está bien establecido.

Este proceso de transición es consecuencia de la interacción entre factores endógenos, como los niveles hormonales o la edad, y exógenos, como el fotoperiodo, la temperatura o la disponibilidad de nutrientes. Es por ello que el control de la floración es extremadamente adaptable a los cambios estacionales, asegurando el éxito reproductivo de las especies vegetales. De esta manera, los genes implicados en el control de la floración mantienen un delicado equilibrio orquestado por diferentes mecanismos de señalización en respuesta a señales ambientales (Kaur et al., 2022).

Como se ha comentado, todas estas señales se integran en un entramado de vías genéticas que llevan a la transición floral. Los análisis genéticos y moleculares han permitido identificar cinco vías principales de floración: la del fotoperiodo, la autónoma, la de las giberelinas (GA), la de la vernalización y la de la edad (Amasino y Michaels, 2010; Blázquez et al., 2001; Capovilla et al., 2015; Jung et al., 2011; Kim et al., 2009; Song et al., 2013; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). De forma más reciente, se han integrado vías adicionales como la dependiente del azúcar, de otras hormonas, de la temperatura ambiente y en respuesta a estrés (Moghaddan y Ende, 2013; Conti, 2017; D' Aloia et al., 2011; Li et al., 2016; Rolland et al., 2002; Seo et al., 2011; Susila et al., 2018; Tsai y Gazzarrini, 2012; Wahl et al., 2013). Estas vías, que se muestran en la Figura 2, están reguladas por un conjunto muy pequeño de genes a los que se les denomina integradores de la transición floral (Lee et al., 2006).

En las diferentes vías que se han mencionado, destaca el papel de *FRUITFULL* (*FUL*) como promotor y *APETALA2* (*AP2*) como represor de la transición floral (Balanzà et al., 2014; Mathieu et al., 2009; Teper-Bamnolker y Samach, 2005). Además, estas vías se regulan por medio de las interacciones de *FUL* y *AP2* con *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* (*SOC1*) y el *microRNA172* (*miR172*) como integradores positivos y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) y *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) como integradores negativos de la transición floral. *FUL* es controlado de forma directa por *FT* y *SOC1* en respuesta a factores endógenos como el fotoperiodo;

en ese contexto *AP2* actúa como represor de estos (Mathieu et al., 2009; Teper-Bamnlker y Samach, 2005). El *miR172*, otro de los integradores positivos de la transición floral, también induce la expresión de *FUL* y actúa reprimiendo a *AP2* (Jung et al., 2011; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). Por otra parte, los integradores negativos *SVP* y *FLC* reprimen la transcripción de *FT* y *SOC1* y por tanto la de *FUL* y además inducen la expresión de *AP2* (Capovilla et al., 2015).

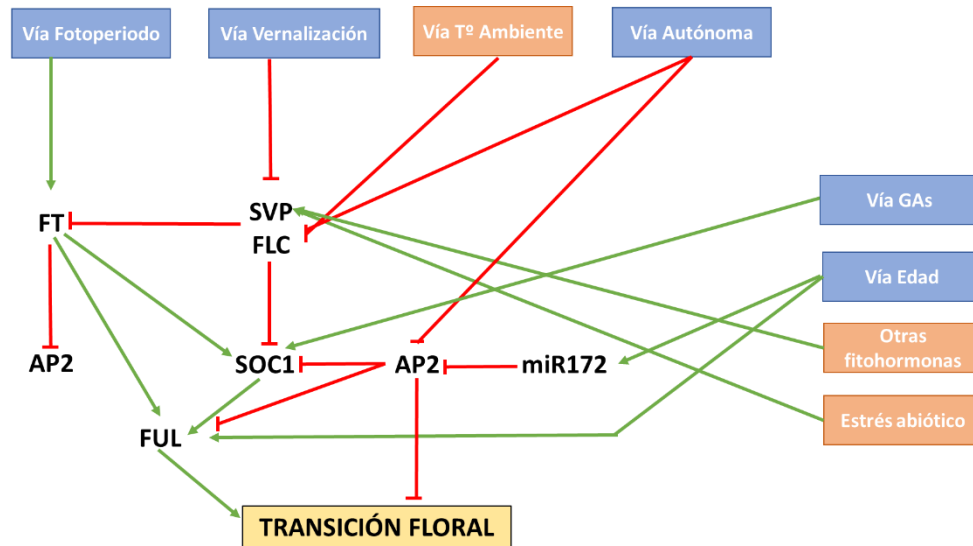


Figura 1: Vías mediante las que se produce la transición floral. Se consideran *FUL* y *AP2* como el principal promotor y represor de la transición floral respectivamente. *SVP* y *FLC* son los integradores negativos de esta transición y *SOC1*, *FT* y el *miR172* los integradores positivos

La vía del fotoperiodo depende de la duración del día. En *A. thaliana*, en condiciones de día largo (LD) se acelera el proceso de floración gracias a la función ejercida por la proteína *FLOWERING LOCUS T (FT)*. La proteína *FT* se caracteriza por componer el florigeno, la señal sistémica que induce a la planta a florecer (Corbesier et al., 2007). Una vez sintetizada en la vasculatura foliar, se mueve hasta el SAM a través del floema (Song et al., 2013). En este contexto, *FT* ejerce control sobre *FUL* en respuesta al fotoperiodo promoviendo la transición floral, mientras que *AP2* y otros miembros de su familia como el factor de transcripción *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* actuarían reprimiéndolos (Mathieu et al., 2009).

Por otra parte, la vía de la vernalización se basa en la necesidad de algunas especies de plantas de pasar por un periodo de frío invernal para que se inicie el proceso de floración. La vernalización es una adaptación a los climas templados que impide la floración antes del invierno y permite que se dé cuando las condiciones son favorables (Kim et al., 2009). En *Arabidopsis*, el nivel de expresión de *FLOWERING LOCUS C (FLC)* es el principal determinante de los requisitos de vernalización. *FLC* reprime la floración a través de la represión de los integradores florales *FT* y *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)* (Searle et al., 2006). Esta represión la ejerce en conjunto con otra proteína MADS-box, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, la cual constituye también uno de los principales integradores negativos de la transición floral. De hecho, otros estudios han demostrado que esta interacción entre *FLC* y *SVP* es bastante relevante, ya que la pérdida de *SVP* suprime parcialmente el retraso de la floración mediado por *FLC* (Li et al., 2008).

Muchos de los ecotipos de *Arabidopsis* que se utilizan en investigación (Columbia, Landsberg, Wassilewskija) no requieren vernalización (Kim et al., 2009). Esto concuerda con la existencia de vías endógenas que funcionan independientemente de las señales ambientales y están relacionadas con el estado de desarrollo de la planta (Amasino y Michaels, 2010). Esta vía autónoma actúa reprimiendo a *FLC* que a su vez es un represor de *SOC1* (Michaels y Amasino, 2001). Esta represión de *FLC* y también de *AP2* permite que se produzca la floración en un determinado momento sin necesidad de que se produzca la vernalización.

En cuanto a la vía de las GA, se ha demostrado que la señalización por GA induce la expresión de *SOC1* y permite que se produzca la floración en día corto (SD) (Moon et al., 2003).

En la vía dependiente de la edad, las señales endógenas que dependen de la edad de la planta actúan a través del *miR156* y el *miR172*. Hasta que la planta no alcanza cierto estado de desarrollo, la transición floral se encuentra bloqueada debido a la inducción de *AP2* como represor floral. Una vez que la planta alcanza el estado óptimo de desarrollo, *AP2* es reprimido a través del *miR172*, induciéndose la transición a través de *FUL* (Jung et al., 2011; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009).

Respecto a las vías adicionales, se ha descrito que la vía que depende de la temperatura ambiente se regula de forma muy similar a la vía autónoma. De esta manera, los genes involucrados en esta vía reprimen la expresión de *FLC* y, sobretodo, de *SVP*, que está considerado como un importante mediador en la regulación de la floración en respuesta a la temperatura ambiente (Capovilla et al., 2015). La disponibilidad de los azúcares también puede influir en la transición floral. En un estudio realizado por Roldán et al. (1999), se descubrió que *Arabidopsis* era capaz de florecer en completa oscuridad mediante el suministro de azúcares de forma exógena a las partes aéreas de la planta. Por otro lado, también hay indicios de una regulación negativa en la que los azúcares pueden inhibir la expresión de *FT* y *SOC1* reprimiendo la transición floral en fase temprana de roseta (Ohto et al., 2001).

Otras vías involucradas en la transición floral que no se han mencionado anteriormente, se centran en la acción de otras fitohormonas o estreses abióticos. El integrador negativo de la floración *SVP*, es también un factor clave en respuesta a estrés. De hecho, en *Arabidopsis* se ha descrito que es capaz de conferir resistencia a sequía regulando el catabolismo del ABA, de manera que en presencia de este estrés se induce la expresión de *SVP* que se une a genes capaces de promover la acumulación de ABA, fitohormona capaz de regular la apertura estomática para evitar la pérdida de agua (Kuromori et al., 2010; Wang et al., 2018). En otro estudio realizado por Zeng et al. (2021), se ha demostrado que *SVP* es activado directamente por *ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3)*, un factor de transcripción clave en la señalización del etileno. El etileno actúa tanto en el desarrollo de las plantas como en respuesta a estrés, y en las células madre actúa como centro neurálgico, siendo capaz de mantener el destino de las células madre y bloqueando su diferenciación cuando es necesario equilibrar la defensa y desarrollo de las plantas en entornos hostiles. Zeng et al., descubrieron que *SVP* integra señales endógenas de estrés para activar a *WUSCHELL (WUS)* que es el regulador principal en el mantenimiento de las células madre.

1.4. Final de la floración

En las plantas monocárpicas, el final de la floración marca el fin del ciclo vital y el inicio de la senescencia. En *A. thaliana* la senescencia suele partir de las hojas en roseta y luego se extiende a nivel de toda la planta tras la fase proliferativa en la que se generan las flores y los frutos (Wang et al., 2022). El final de la floración se inicia con la parada del crecimiento del meristemo apical del tallo (SAM). Este cese de la actividad del SAM fue descrito y caracterizado en 1994 por Hensel et al., utilizando la planta modelo *A. thaliana*. Fue entonces cuando se designó el término “parada global de la proliferación” conocido también por sus siglas en inglés GPA (“Global Proliferative Arrest”). Estos autores definieron el GPA como “una detención coordinada de la proliferación de todos los meristemos de inflorescencia” comenzando por la parada del meristemo principal que es seguido poco después por el resto de meristemos. Además, plantearon el papel que tienen los frutos en el tiempo en el que se produce el GPA; demostraron la influencia de la presencia de semillas/frutos mediante la caracterización de un mutante estéril, y también mediante la realización de una retirada continua de silicuas días después de la fertilización en plantas silvestres. En ambos casos la ausencia de frutos/semillas lleva a la producción de un mayor número de flores y un retraso en la parada del SAM. Por otra parte, observaron que la eliminación de los frutos después de la parada lleva a la reactivación de las inflorescencias detenidas y a la producción de nuevos frutos, sugiriendo que la detención de la inflorescencia es un estado reversible. De hecho, en estudios posteriores se ha demostrado que los meristemos en GPA de *Arabidopsis* parecen ser transcripcionalmente equivalentes a yemas axilares latentes con una baja actividad mitótica, reducción de las especies reactivas del oxígeno y acumulación de genes de respuesta al ácido abscísico (ABA) (Wuest et al., 2016)

Con la información obtenida, Hensel et al., (1994) discutieron las dos hipótesis propuestas para explicar el GPA. Por una parte, el modelo de limitación de recursos, en el que, en condiciones de competencia entre frutos/semillas en desarrollo y meristemos, se desencadena la parada proliferativa debido a la reducción de un recurso limitante por debajo de un determinado umbral (Molisch, 1928; Kelly et al., 1988). El otro modelo, basado en las hipótesis de Leopold (1961) propone la existencia de una señal procedente de los frutos o las semillas, la cual es responsable del cese de la actividad de los meristemos. Los datos obtenidos demostraron el importante papel de las semillas en la parada mediante análisis de fertilidad reducida y mutaciones embrionarias letales. Los resultados sugerían que solo los frutos que contienen más del 30% de semillas fértiles son capaces de desencadenar la detención proliferativa.

Independientemente de los modelos planteados por Hensel et al. en 1994 y las señales procedentes de las semillas, se ha planteado la existencia de una regulación del GPA a nivel génico. Este planteamiento surge de las observaciones realizadas por Balanzà et al. en 2018 permitiendo la identificación de la ruta *FUL-AP2*. Los mutantes en el gen *FUL* mostraban un retraso en el GPA con una mayor producción de frutos, pero de menor tamaño respecto al ecotipo silvestre. Para destacar un posible efecto causado por una reducción en el número de semillas en el mutante *ful-2* se realizó una comparación entre el mutante *ful-2* con otros mutantes que presentaban una producción similar de semillas. Estos mutantes, a pesar de producir un número similar de semillas a las producidas por el mutante *ful-2*, paraban a la misma vez que el ecotipo silvestre. Esto contrastaba con el comportamiento de *ful-2*, que paraba más tarde y presentaba una mayor producción de frutos. Así mismo, la eliminación continua de flores en el mutante *ful-2* y en el ecotipo silvestre, reveló que el mutante producía una mayor cantidad de nodos florales y, a diferencia del ecotipo silvestre, no producía una flor

terminal en el momento de la parada. Estos experimentos sugerían que el mecanismo mediante el cual *FUL* influye en el GPA es independiente de las señales desconocidas procedentes de las semillas. Este trabajo también demostró que el retraso en el final de la floración observado en el mutante *ful* se debía a la desregulación de los genes pertenecientes a la familia *AP2* (*AP2*, *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)* y *TOE3* (Balanzà et al., 2018; Ó'Maoiléidigh et al., 2021)), a los que *FUL* reprimía directamente.

Además, se había descrito la regulación positiva ejercida por *AP2* sobre *WUS*, un gen que, como se ha comentado antes, está involucrado en el mantenimiento de las células madre del SAM (Balanzà et al., 2018; Huang et al., 2017; Würschum et al., 2006; Zhao et al., 2007). Balanzà et al. (2018) también mostraron que el *miRNA172*, un regulador negativo de los niveles de *AP2* (Aukerman y Sakai, 2003), también participaba en la regulación del final de la floración junto a *FUL*. Curiosamente, tanto *FUL* como *AP2* son genes previamente descritos como dianas de una vía dependiente de la edad que controla las diferentes fases del desarrollo en *Arabidopsis* y en la que el *miR172* es un factor clave (Wang et al., 2009; Wu et al., 2009). Con todo esto, se propuso el modelo que se muestra en la Figura 2, donde se produce una regulación del final de la floración dependiente de la edad.

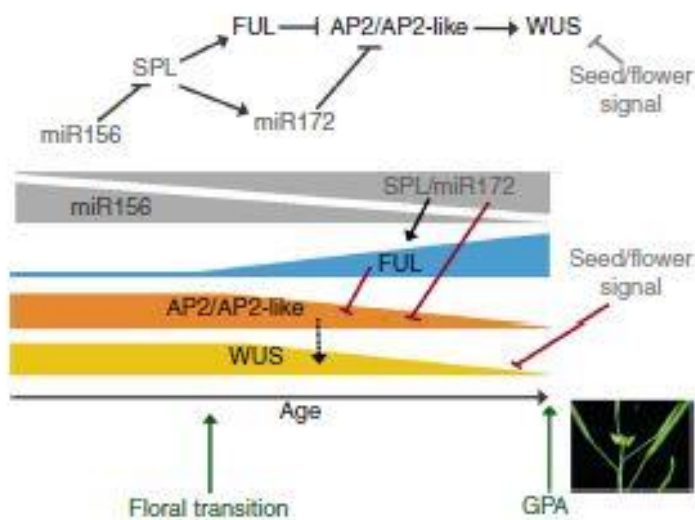


Figura 2: Modelo de regulación génica del GPA de manera dependiente de la edad. Balanzà et al., (2018)

En este modelo, a medida que aumenta la edad, los niveles de *microRNA156 (miR156)* disminuyen (Wang et al., 2009; Wu et al. 2009); de esta manera aumentan los niveles de la familia de factores de transcripción *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* que regulan de forma positiva los niveles de *miR172* y los niveles de *FUL* (Yamaguchi et al., 2009). Como se ha mencionado antes, tanto *FUL* como el *miR172* regulan de forma negativa a *AP2*, que mantiene el meristemo activo a través de *WUS*; por lo tanto, a medida que aumenta la edad, disminuyen los niveles de *AP2* y debido a ello disminuye la actividad del meristemo hasta que se produce la parada. En este modelo se incluye además la señal procedente de las semillas/frutos, que actuaría en paralelo y cuyos mecanismos moleculares aún no están del todo claros.

En cuanto a otros factores involucrados en el momento en el que se produce la parada, dado que la transición está estrechamente regulada por señales de luz y temperatura para garantizar la floración en la época óptima del año, parece lógico hipotetizar que las mismas señales también desencadenen la detención floral cuando las condiciones ya no son óptimas. Se ha sugerido como factor desencadenante de la parada un mecanismo de sincronización fototérmico que acumule información sobre la luz y/o la temperatura a lo largo del crecimiento de la planta, aunque no hay evidencias suficientes para contrastarlo (Walker y Bennett, 2018). En esta línea, Martínez-Fernández et al. (2020), al analizar la regulación mediada por la ruta *FUL-AP2*, observaron que *AP2* regula muchos genes que están implicados en respuesta a luz y temperatura. Estos resultados sugieren una posible convergencia entre los factores ambientales mencionados y factores endógenos como el ABA, las CK, la edad e incluso señales derivadas de las semillas, en la regulación de la actividad del meristemo, situando a *AP2* como el eje en la regulación de estas diferentes vías. Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a las observaciones previas realizadas por Wuest et al. (2016), indicando que los genes regulados durante la parada del meristemo (GPA) y su posterior reactivación por la eliminación de las semillas podría estar controlados por la acción de *AP2*.

En 2020, Ware et al. demostraron que las plantas son competentes para realizar la parada proliferativa solo después de alcanzar una cierta edad de desarrollo, y que la auxina exportada desde los frutos en desarrollo, podría ser la señal que desencadena la detención del meristemo alterando la canalización de auxinas en el tallo. De hecho, en otro estudio más reciente, se propone que el efecto que tienen los frutos sobre la parada proliferativa está mediado por los cambios que se producen en el transporte y señalización de las auxinas en la región apical del tallo, así como por cambios que se dan en la señalización y metabolismo del azúcar en el ápice de los brotes (Goetz et al., 2021). Toda esta información resulta aún dispersa y difícil de integrar en el marco temporal y espacial fijado para el GPA. En base a las cuestiones pendientes y centrándose en el papel de las CK al final de la floración, Merelo et al. (2022) obtuvieron unos resultados que les permitieron diferenciar en dos fases el final de la floración que conduce al GPA. En primer lugar, se produce una reducción de la señalización por CK y de algunos factores relacionados con ellas, como reguladores de la división celular o *WUS*; en segundo lugar, se produce una represión completa de estos factores relacionados con las CK y que dependen fuertemente de *FUL*, que en última estancia conduce a la detención proliferativa.

Todos estos datos tomados en conjunto, demuestran que el final de la floración está ampliamente regulado por numerosos factores. Además, todavía existen muchas incógnitas relacionadas con este proceso: ¿Cuáles es la señal derivada de las semillas que induce la parada del meristemo inflorescente? ¿Son las auxinas las únicas responsables de este efecto? ¿Qué otros reguladores pueden estar actuando sobre la ruta *FUL-AP2*?

2. Antecedentes

Mientras que los mecanismos que desencadenan la transición floral y su regulación están bastante estudiados, todavía existen muchas incógnitas sobre la regulación del final de la floración. Un conocimiento más profundo de los mecanismos que regulan el final de la floración abre la posibilidad de manipular con precisión este proceso para aumentar el rendimiento o, por el contrario, reducir el tiempo de floración y favorecer una cosecha temprana y más sincronizada en las especies cultivadas (González-Suárez et al., 2020).

El punto de partida de este trabajo se centra en la observación de que los genes descritos en el control del final de la floración (*FUL* y *AP2*) previamente se habían descrito como reguladores de la transición floral. Esta observación permitió la elaboración de una hipótesis en la que se planteaba si tanto el inicio como el final de la transición podrían estar controlados por mecanismos similares y por un mismo grupo de genes. Trabajos realizados anteriormente en el grupo donde se realiza este trabajo de final de master se han centrado en el papel de *FT*, un inductor de la transición floral, como regulador del final de la floración (Sánchez-Matilla, 2022). Este trabajo demostró que la ausencia de *FT* lleva a un aumento de la producción de flores y a un retraso en el GPA sugiriendo que *FT*, además de controlar el inicio de la floración, es un inductor del final de la floración. Se ha descrito que la unión de *FT* con el factor de transcripción *FD* en el meristemo activa la expresión de *FUL* al inicio de la transición floral (Abe et al., 2005; Teper-Bamnolker y Samach, 2005; Tylewicz et al., 2015) y este mecanismo podría seguir activo durante el final de la floración. En este trabajo se propuso que la mayor producción de flores y el retraso en el GPA en el mutante *ft* se debería a un aumento de los niveles de *AP2* y una menor expresión de *FUL*, ya que *FT* no se encuentra activando al *miR172* y tampoco reprime a la familia de genes *AP2* (Mathieu et al., 2009, Sánchez-Matilla, 2022). Por último, en este trabajo también se realizó una caracterización inicial del mutante *svp*, que como se ha comentado es un represor de la transición floral, indicando que al igual que *FUL*, *AP2* y *FT*, ejercía un papel en el control del final de la floración.

3. Objetivos

Los últimos avances realizados en la comprensión de los mecanismos reguladores del final de la floración, como la ruta *FUL-AP2* (Balanzà et al., 2018) han abierto nuevas vías de estudio. La identificación de factores que influyen sobre esta ruta y conocer la identidad de la señal que procede de las semillas son algunas de las cuestiones que aún quedan por resolver. *SVP* es un buen candidato como regulador del final de la floración. Se ha demostrado que *SVP* es un gen clave en la dormancia de yemas axilares de varias especies frutales (Bielenberg et al., 2008; Wu et al., 2017), un proceso que presenta una gran similitud con el GPA (Wuest et al., 2016; Martínez-Fernández et al. 2020). Además, los datos preliminares del grupo donde se realiza este Trabajo de Fin de Máster sugerían un papel regulador de *SVP* en el control del final de la floración.

Por estos motivos se planteó como objetivo general de este Trabajo de Fin de Máster el estudio del papel de *SVP* en el control del final de la floración, así como su posible interacción con la ruta *FUL-AP2*.

Los objetivos específicos que se han planteado para este trabajo son:

- Realizar una caracterización fenotípica del mutante *svp-32* para el estudio de su papel en el control del final de la floración.
- Análisis de los patrones de expresión de *SVP* mediante Hibridación in Situ y la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* para comprobar dónde se expresa, cuándo y desde dónde puede estar ejerciendo su papel.
- Análisis moleculares de los integradores de la transición floral mediante RT-qPCR en distintos tejidos y a distintas semanas para estudiar los niveles de expresión y su evolución a lo largo del tiempo.
- Generar herramientas que permitan aclarar los mecanismos de regulación implicados en el final de la floración.

4. Material y métodos

4.1. Material vegetal

Para realizar los diferentes experimentos contemplados en este trabajo, se utilizó la especie modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia* (*Col-0*). Los mutantes de pérdida de función utilizados en este Trabajo de Fin de Máster están indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: Mutantes de pérdida de función utilizados en el presente trabajo

Línea	Ecotipo	Fuente
<i>svp-32</i>	Col-0	Alonso et al., 2003
<i>ft-10</i>	Col-0	Yoo et al., 2005
<i>mir172ab</i>	Col-0	Ó'Maoiléidigh et al., 2021
<i>mir172cd</i>	Col-0	Ó'Maoiléidigh et al., 2021
<i>mir172abd</i>	Col-0	Ó'Maoiléidigh et al., 2021
<i>mir172e</i>	Col-0	Ó'Maoiléidigh et al., 2021
<i>mir172 quintuple</i>	Col-0	Ó'Maoiléidigh et al., 2021

4.2. Condiciones de cultivo en invernadero

En el caso de los conteos, las líneas reporteras GUS y la recolección de material vegetal, las semillas de *A. thaliana* se sembraron en alveolos de 6,5 x 6,5 x 5 cm que se colocaron en bandejas de plástico, estableciendo 48 alveolos por bandeja. En el caso de las transformaciones con *Agrobacterium tumefaciens*, se utilizaron macetas de plástico de 12 cm de diámetro. En primer lugar, se introdujo en los alveolos sustrato universal con una proporción de turba, perlita y vermiculita de 2:1:1 humedecido con agua potable, se incorporaron las semillas y se cubrieron con film para asegurar la hermeticidad. A continuación, pasaron por una etapa de estratificación durante aproximadamente 3 días, sujetas a condiciones de temperatura de 4°C y oscuridad con el objetivo de sincronizar la germinación. Posteriormente, se transfirieron a una cabina de invernadero a una temperatura aproximada de 22°C durante el día/noche. Las plantas de día largo (R/FR≈1) y (R/FR≈5) se sometieron crecieron bajo un fotoperiodo inductivo de 16h de luz y 8h de oscuridad. Las plantas de día corto se sometieron a un fotoperiodo de 8h de luz y 16h de oscuridad. Las plantas se regaron con agua potable.

4.3. Caracterización fenotípica de la cinética de producción de flores

La producción media total de flores se determinó realizando cada 2 días el conteo de flores/frutos presentes en la inflorescencia principal. La última flor en antesis se marcaba con un hilo para tenerla como referencia en el siguiente conteo. Al incluir la fecha de los conteos, inicio del *bolting* y primera flor, se pudieron calcular el resto de parámetros (periodo vegetativo, actividad del meristemo, tasa de producción de flores). Para los conteos se establecieron 12 plantas de cada línea (control y mutante *svp-32*).

La caracterización de la producción en el experimento de poda, se realizó eliminando con unas pinzas metálicas las flores y frutos de la inflorescencia principal cada 2 días. Luego se contabilizó el número de flores y frutos retirados hasta GPA.

4.5. Hibridación in situ de RNA no radiactiva

Se realizó una hibridación in situ con una sonda específica de *SVP* para su detección en el SAM.

4.5.1. Diseño y cebadores de la sonda específica

Para obtener una sonda que hibridase específicamente con *SVP*, se buscó una región del gen con alta especificidad y mediante una web se realizó un análisis *BLAST* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>). Se aceptó la secuencia con al menos un 99% de especificidad para el gen de interés. A continuación, se muestran los cebadores específicos que se diseñaron para amplificar la sonda (Tabla 2):

Tabla 2: Cebadores específicos para la amplificación de la sonda de *SVP*

Cebador	Secuencia (5'→3')
SVP Sonda SP6 Forward	ATTAGGTGACACTATAGGGAACTTCAAGGACTTGAC
SVP Sonda T7 Reverse	TAATACGACTCACTATAGGCTAACCACCATACGGTAAG

4.5.2. Extracción de DNA genómico

Para obtener la sonda de *SVP*, se tuvo que extraer el DNA de tejidos donde se expresaba el gen para usar este DNA como molde en el momento de amplificar la sonda.

Para la extracción del DNA del tejido vegetal, previamente triturado en un tubo de ensayo de 1,5 mL, se siguieron los pasos que se indican a continuación: (1) Se añadieron 200 µL del tampón de extracción (200 mM Tris HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 25 mM EDTA, 0,5% SDS). (2) Se le dió un vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. (3) Se pasaron 300 µL del sobrenadante a un nuevo tubo de ensayo de 1,5 mL. (4) En el nuevo tubo de ensayo se añadió un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm. (5) El sobrenadante se descartó y se lavó el pellet con etanol al 70% (v/v). (6) Por último se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos, se elimina el etanol y se deja secar en campana. (7) Cuando los restos de etanol se han evaporado por completo, se resuspende el pellet en 50 µL de H₂O miliQ y se guarda a 4°C.

4.5.3. Amplificación de la sonda mediante PCR

Para la amplificación de la sonda se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los reactivos utilizados fueron los siguientes: 10 µL del tampón 5x Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer, 4 µL de MgSO₄ (25 mM), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de la polimerasa *GoTaq G2 DNA Polymerase* a una concentración final de 1 U/µL, 1 µL de cada uno de los cebadores específicos de la sonda indicados en la Tabla 2, 2 µL de DNA genómico y 30,5 µL de H₂O miliQ.

El programa utilizado en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) constó de los siguientes pasos: (1) Un ciclo de desnaturalización del DNA a 96°C, 5 minutos (2) 35 ciclos con una fase de desnaturalización a 96°C, 30 segundos, otra fase de anillamiento a 55°C, 30 segundos y la fase de extensión a 72°C, 15 segundos. (3) Un ciclo final de extensión a 72°C, 5 minutos.

4.5.4. Preparación de muestras: recolección, fijación y procesado de las muestras

Se recogieron muestras de SAM del mutante *svp-32* y el control *Col-0* a 1, 2 y 3 semanas después del *bolting*. Se tomaron 5 meristemos por set de muestras, utilizando viales de cristal con FAE (50% etanol (v/v), 10% ácido acético glacial (v/v) y 5% formaldehído (v/v)). Posteriormente se pusieron las muestras al vacío durante 5 minutos. Finalmente, una vez fijadas las muestras, se retiró el FAE y se mantuvieron en etanol al 70% (v/v) hasta su procesado.

El procesado sirve para la deshidratación y fijación de las muestras histológicas en parafina líquida para el posterior montaje de los bloques. Este método se llevó a cabo con el procesador de tejidos Leica TP1020. Para ello, se llenan cada una de las jarras con 1,5 L de las soluciones indicadas para el programa, se colocan las muestras en la cesta portamuestras y se inicia el programa donde la cesta se va introduciendo en los reactivos en el siguiente orden: (1) Etanol al 70% (v/v) durante 1 hora. (2) Etanol al 90% (v/v) durante 1 hora. (3) Etanol al 90% (v/v) durante 1 hora. (4) Etanol al 90% (v/v) + eosina durante 1 hora. (5) Etanol a 95% (v/v) durante 1 hora. (6) Etanol absoluto durante 1 hora. (7) Histoclear durante 1 hora. (8) Histoclear durante 1 hora. (9) Histoclear durante 75 minutos. (10) Parafina en vacío durante 1 hora. (11) Parafina en vacío durante 3 horas. Una vez parado el programa se sube la cesta y se pasan los cassettes a la estación de inclusión.

4.5.6. Preparación de bloques y seccionamiento de tejidos

Las muestras de tejido procesadas se incluyeron en parafina mediante una máquina de inclusión de tejidos Leica EG1150H. Se utilizaron moldes de inclusión metálicos, donde se añadió un poco de parafina y después se colocó y se orientó la muestra. Cuando la parafina estaba algo sólida y la muestra orientada, se añadió más parafina y se colocó un cassette de plástico para inclusión de tejidos Histosette II sin tapa. Una vez que los bloques se habían enfriado y la parafina estaba sólida, se almacenó a 4°C hasta realizar las secciones. Previamente se retiraron los moldes de inclusión metálicos en frío.

Para realizar las secciones se utilizó el Microtomo Leica RM2025. Manteniendo los bloques en frío se seccionó el tejido a 7-8 μm . Una vez realizados los cortes, mediante el uso del microscopio se seleccionaron aquellos donde el SAM se mostraba por completo. Posteriormente se colocaron los cortes en portaobjetos y se añadió H₂O miliQ para expandir los tejidos. Luego se retiró el H₂O miliQ y se incubaron en el calentador de portaobjetos a 45-50°C o/n. Posteriormente se almacenaron en una caja en oscuridad con bolsas con gel de sílice para evitar el exceso de humedad.

4.5.7. Marcado y revelado de la sonda

Las sondas se sintetizan por transcripción in vitro y se marcan con Digoxigenina (DIG). Con la sonda diseñada para *SVP*, se inició el marcado con la siguiente reacción a temperatura ambiente: 13 μL de DNA de la sonda diluida en H₂O para dejarla a una concentración de 150 ng, 2 μL del buffer de reacción de transcripción (10x), 2 μL del mix

marcador de Digoxigenina (DIG), 1 μ L de RNAsin y 2 μ L de RNA polimerasa T7. Esta reacción se incubó a 37°C en un Thermomixer (Eppendorf) durante 1 hora y media.

Tras la incubación, se preparó un tubo de ensayo de 1,5 mL con 5 μ L de H₂O y 1 μ L de la reacción de transcripción. A los 19 μ L restantes de la reacción de transcripción se les añadió 1 μ L de DNasa I libre de RNAsa (1U/ μ L) y se preparó otro tubo de ensayo de 1,5 mL, con 5 μ L de H₂O y 1 μ L de la reacción de transcripción a la que se le había añadido la DNasa y se incubó en el Thermomixer (Eppendorf) a 37°C durante 15 minutos.

Se comprobó la transcripción mediante un gel de agarosa a una concentración del 1% (p/v), analizando 6 μ L de cada una de las dos reacciones. Una vez realizada la comprobación, se precipitó la sonda durante >1 hora a -20°C por medio de los siguientes reactivos: 1 μ L de tRNA de levadura libre de RNAsa (10 μ g/ μ L), 37,5 μ L de NH₄OAC (5M), 24 μ L de H₂O miliQ y 220 μ L de etanol. Posteriormente se recuperó el precipitado por centrifugación y se realizó un lavado con etanol al 80% (v/v).

Para el revelado de la sonda, se recuperó el precipitado por centrifugación y se resuspendió la sonda en 10 μ L de H₂O libre de RNAsa. Se usó 1 μ L para realizar las diluciones de 1/2, 1/25, 1/100 y 1/250. Los 91 μ L restantes del buffer de hibridación (6x SSC, 3% SDS, 50% Formamida, 100 μ g/mL tRNA y H₂O miliQ) se añadieron al resto de la sonda y se almacenó a -20°C. Para comprobar el marcado con DIG, se preparó un "dot blot" aplicando 1 μ L de cada dilución a una membrana y se dejó secar para hacer un "cross-link". El blot se reveló junto con una tira test de Roche en un tubo de ensayo de 15 mL, siguiendo los pasos que se indican a continuación: (1) Se mojaron las tiras en TBS durante 2 minutos. (2) Se incubaron en blocking/TBS durante 10 minutos (3) Se incubaron con el Anti-DIG-Ab (1/3000) en TBS durante 15 minutos. (4) Se lavaron con tampón de detección sin sustrato durante 1 minuto. (5) Se revelaron con el tampón de detección y el sustrato hasta que se visualizó en la tira test el último punto.

La sonda debe utilizarse a la concentración final que proporcione una señal similar a la segunda señal más diluida de la tira reactiva.

4.5.8. Pretratamiento de las secciones

Este tratamiento es necesario para facilitar el acceso de la sonda al tejido. Se basa en retirar la parafina y rehidratar el tejido, seguido de una permeabilización parcial de la membrana celular y una deshidratación final para realizar la hibridación. Los pasos a seguir fueron los siguientes: (1) Se sumergieron durante 10 minutos los portaobjetos en una cubeta de tinción de portaobjetos que contenía Histoclear. Este paso se realizó 2 veces. (2) Se rehidrató el tejido en series de etanol de 2 minutos por serie: etanol al 100% (v/v), etanol al 100% (v/v), etanol al 95% (v/v), etanol al 70% (v/v), etanol al 50% (v/v), etanol al 30% (v/v) y 2 series de H₂O miliQ. (3) Se realizó una hidrólisis ácida del tejido durante 20 minutos en ácido clorhídrico (HCl) 0,2 M a temperatura ambiente. (4) Se llevaron a cabo lavados de 5 minutos por lavado de H₂O miliQ, 2x SSC y H₂O miliQ de nuevo. (5) Se incubó a 37°C en 100 mM de Tris (pH=8), 50 mM de EDTA (pH=8) y proteinasa K durante 15 minutos. (6) Se realizó un lavado en PBS durante 2 minutos a temperatura ambiente. (7) Se bloqueó la proteinasa K con 2 mg/mL de glicina en PBS durante 2 minutos. (8) Se llevaron a cabo dos lavados con PBS de 2 minutos cada uno. (9) Se realizó una post-fijación del tejido en formaldehído al 3,7% en PBS (30 mL de FA al 37% (v/v) + 270 mL de PBS) durante 10 minutos. (10) Se llevaron a cabo dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno. (11) Se deshidrató el tejido en series de etanol de 2 minutos por serie: 2 lavados con H₂O miliQ, etanol al 30% (v/v), etanol al 30% (v/v), etanol al 50% (v/v), etanol al 70% (v/v), etanol al 95% (v/v), etanol al 100% (v/v) y etanol

al 100% (v/v). Finalmente se secaron los portaobjetos en un desecador al vacío durante 20 minutos.

4.5.9. Hibridación y lavados

Para empezar, se desnaturalizó la sonda a 80°C durante 5 minutos y se añadió una cantidad adecuada de buffer de hibridación precalentado a 50-60°C. Hay que mantener la solución de hibridación a 55°C para evitar la precipitación del SDS.

Se colocaron los portaobjetos en un calentador de portaobjetos a 50°C. Se añadieron 300 µL de la solución de hibridación al portaobjetos y se cubrió con la otra parte haciendo un “sándwich” y evitando la formación de burbujas. Finalmente se incubó o/n en una caja humidificada con papeles empapados en 6x SSC, 50% formamida y se colocó en un horno a 50-55°C.

Al día siguiente, se sacaron los portaobjetos de la caja y se retiraron las cubiertas de los “sándwiches” mediante su introducción en el buffer de lavado (2x SSC, 50% Formamida) a temperatura ambiente. Luego se colocaron los portaobjetos en una cubeta de tinción de portaobjetos con el buffer de lavado durante 1 hora a 50-55°C.

4.5.10. Reacción y detección de anticuerpos

Los pasos seguidos fueron los siguientes: (1) Se realizó un lavado en buffer de TBS durante 5 minutos. (2) Se incubó en blocking agent (0,5 % Roche blocking en TBS) durante 1 hora. Una vez realizado este paso, se transfirieron los portaobjetos a tarros Coplin para minimizar el volumen usado de los buffers (3) Se llevó a cabo un lavado en BSA al 1%, Tritón X-100 al 0,3% (v/v) en TBS durante 30 minutos. (4) Se realizó una dilución del anticuerpo 1:3000 en BSA al 1%, Tritón X-100 al 0,3% (v/v) en TBS. (5) Se realizaron tres lavados de 20 minutos por lavado con BSA al 1%, Tritón X-100 al 0,3% (v/v) en TBS. (6) Se llevó a cabo un lavado de 5 minutos con el buffer de detección (1 volumen de 10x DetBuf A, 1 volumen de 10x DetBuf B y 8 volúmenes de H₂O). (7) Se añadieron 150 µL de NBT (100 mg/mL) y 150 µL de BCIP (50 mg/mL) a 100 mL del buffer de detección, incubándolo en la oscuridad.

A las 12 horas se puede comenzar a detectar la señal si la expresión del gen es fuerte. La reacción se paró con una serie de lavados de 1 minuto por cada lavado: H₂O miliQ, etanol al 70% (v/v), etanol al 100% (v/v), etanol al 70% (v/v) y H₂O miliQ.

4.6. Microscopía óptica

Se utilizó el microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con el software NIS-Element F3.0 para poder observar la sonda de *SVP* marcada en los tejidos. Se colocaron los portaobjetos con las muestras y se llevó a cabo la visualización y la realización de las fotografías mediante la cámara Nikon Digital-Sight (DS-Fi1) acoplada al microscopio.

4.7. Detección histoquímica mediante tinción de la β-Glucuronidasa (GUS)

Este método posibilita detectar la expresión de un gen, en este caso *SVP*, al estar asociado a un gen marcador que codifica β-Glucuronidasa (GUS). Esto permite ver

teñidos de azul los dominios físicos en los que se expresa el gen de interés. La tinción se realiza mediante el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil Glucurónido (X-Gluc).

El protocolo utilizado consta de los siguientes pasos: (1) Las plántulas más grandes se recogieron en tubos de ensayo de 50 mL y los tejidos y plántulas más pequeñas en tubos de ensayo de 1.5 mL. En esos tubos se mantuvieron con acetona 90% (v/v) durante 1 hora. (2) Se retira la acetona y se hace un lavado con H₂O miliQ. (3) Se retira el H₂O miliQ y se añade a los tubos de ensayo el tampón de tinción (NaH₂PO₄ 13.42mM a pH 7.2; Na₂HPO₄ 11.58 mM a pH 7.2; ferrocianuro potásico 5 mM, ferricianuro potásico 5 mM, y Tritón X100 0.25mM). (4) Se retira el tampón de tinción y se añade de nuevo tampón de tinción al que se le ha añadido X-Gluc de manera previa. (5) Se ponen las muestras al vacío durante 5 minutos. (6) Se incuban las muestras en oscuridad y a 37°C o/n. (7) Se elimina el tampón y se realiza una serie de lavados con etanol al 20% (v/v), etanol al 35% (v/v) y etanol al 50% (v/v) durante 30 minutos por lavado. (8) Se retira el etanol y se fijan las muestras con FAE (50% etanol (v/v), 10% ácido acético glacial (v/v) y 5% formaldehído (v/v)) durante 1 hora. (9) Se retira el FAE y se conservan las muestras fijadas en etanol al 70% (v/v).

4.8. Microscopia de bajo aumento

Se utilizó el microscopio Leica DMS1000 con el software de análisis de imagen LAS-X para poder observar la expresión del gen *SVP* en plántulas, transición y SAM en primera, segunda y tercera semana después del bolting. Para realizar las fotografías, las muestras más pequeñas se colocaron en portaobjetos y las grandes en una placa redonda de cultivo celular, añadiendo posteriormente H₂O miliQ en ambos casos. Las muestras se cubrieron con un cubreobjetos de 20x20 mm (Labbox).

4.9. Recolección y procesado de muestras para extracción de RNA y DNA

Las muestras se recogieron en tubos de ensayo de 1,5 mL que contenían 2 o 3 bolas de vidrio para triturar posteriormente los tejidos y se conservando las muestras en nitrógeno líquido hasta su procesado. Las muestras de las PCR cuantitativas se recogieron de la siguiente manera: (1) para fruto, 8 frutos jóvenes por tubo de ensayo, (2) para flor, 8 flores por tubo de ensayo, (3) para hoja, 3 hojas caulinares por tubo de ensayo, (4) para meristemo, 5 meristemos a los que se les eliminó el máximo número de primordio posibles para evitar que su interferencia en las qPCR, (5) para tallo, 5 segmentos de tallo sin frutos ni flores.

Tras la recolección, los tubos de ensayo fueron introducidos en el molino de bolas TissueLyser II (QIAGEN). Esto permite la disrupción de las muestras mediante una agitación de alta velocidad. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80°C hasta la extracción.

4.10. Extracción del RNA total

La extracción del RNA total de las muestras recolectadas se realizó con el sistema E.Z.N.A Plant RNA Kit (OMEGA), según el protocolo del fabricante. El fundamento de este sistema se basa en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación.

4.11. Purificación del RNA

Para optimizar el proceso, se decidió utilizar una DNAsa distinta a la incluida en el kit de extracción de RNA. Los pasos seguidos para la digestión fueron los siguientes: (1) A 17 μL del RNA diluido, se añadió 1 μL de DNAsa y 2 μL del buffer de DNAsa 10x, se dió un spin y se incubó la reacción a 37°C durante 30 minutos. (2) Se añadieron 2 μL de resina de inactivación y se dejó reposar 2 minutos a temperatura ambiente, mezclando con toques suaves. (3) Se centrifugó a 14000 rpm durante 4 minutos. (4) Se pasó el sobrenadante de los tubos a nuevos tubos de ensayo evitando tocar la resina que estaba precipitada.

4.12. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA a partir de RNA, también denominado retrotranscripción, se llevó a cabo con la SuperScriptR IV Reverse Transcriptase (Invitrogen), la cual emplea una transcriptasa inversa (RT) para la síntesis de cDNA a partir de un molde de RNA.

La cantidad utilizada de RNA de las muestras fue de 1 μg . Para el mix del RNA se utilizaron 11 μL de RNA, 1 μL de random hexamers y 1 μL de dNTPs (10 mM) y para el mix de la reacción de RT se utilizaron 4 μL de 5x SSIV buffer previamente centrifugado, 1 μL de DTT, 1 μL de Ribonuclease Inhibitor y 1 μL de SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen) previamente diluida en H₂O miliQ (1:4).

Los pasos seguidos fueron los siguientes: (1) El mix de RNA se centrifugó y se incubó a 65°C durante 5 minutos para después incubarlo en hielo durante 1 minuto (2) Se preparó el mix de la reacción de RT, se mezcló y se centrifugó. (3) Se añadió el mix de la reacción de RT al mix de RNA. (4) Se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. (5) Se incubó a 55°C durante 10 minutos (6) Se incubó a 80°C durante 10 minutos.

4.13. Cebadores de las PCR cuantitativas

Para realizar los análisis de expresión génica de los diferentes genes implicados en la ruta *FUL-AP2*, se utilizaron los siguientes cebadores (Tabla 3).

Tabla 3: Cebadores específicos para los análisis de expresión génica mediante qPCR

Gen	Cebador	Secuencia (5'→3')
At1g13320	REF1_At1g13320_qRT_F	AAGCGGTTGTGGAGAACATGATACG
At1g13320	REF1_At1g13320_qRT_R	TGGAGAGCTTGATTTGCGAAATACCG
miR172a	miR172apre_qRT-PCR_F	TCTCTCTCTCTCTCCCTCTGTATAG
miR172a	miR172apre_qRT-PCR_R	GCTTACTGATCTTGATGTTGTGACTC
miR172b	miR172bpre_qRT-PCR_F	GAACAACAAGATCGTGAGCACAGATCG
miR172b	miR172bpre_qRT-PCR_R	TCTGGTCTCTGGACGAACTATTCTG
miR172c	miR172cpre_qRT-PCR_F	CTGTTGCTGTTGGAGCATCATC
miR172c	miR172cpre_qRT-PCR_R	AGCCACTGATTGCAGCTGCAG
miR172d	miR172dpre_qRT-PCR_F	AGTCATTGTTTGCTATTGCAACA
miR172d	miR172dpre_qRT-PCR_R	ATCATCAAGATTCTCAAACCA
FT	FT_qRT-PCR_F	CGCATCACACACTATATAAGTAAAACA
FT	FT_qRT-PCR_R	CGAGTAACGAACGGTGATGA
AP2	AP2_qRT-PCR_F	GTGGAGTAGAAGCGGATATC
AP2	AP2_qRT-PCR_R	ATTGACCCATTTCGAGCTTCC
FUL	FUL_qRT-PCR_F	GAAGGACAATTAGTCCAATGCTC
FUL	FUL_qRT-PCR_R	GTGAGATAGTTCTACTCGTTCCG

4.14. PCR cuantitativa (qPCR)

La reacción de qPCR se llevó a cabo con tubos de Mic PCR (Bio Molecular Systems) utilizando 48 tubos por reacción, a los cuales se agregaron 4 μ L de cDNA, 2 μ L de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos (Tabla 3) y 1 μ L de H₂O miliQ, completando un volumen final de 10 μ L en cada uno de los tubos. A continuación, se introdujeron en un termociclador Mic qPCR (Bio Molecular Systems) acoplado al software informático Mic qPCR. Las fases de la reacción fueron: (1) atemperación de 20 segundos a 50°C (2) una fase de desnaturalización de 15 minutos a 95°C (3) 40 ciclos de amplificación (desnaturalización de 15 segundos a 95°C y elongación de 1 minuto a 60°C). Para cada muestra se emplearon tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas.

La expresión relativa de los genes se cuantificó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde Ct (Ciclo umbral o Threshold Cycle), es el ciclo en el cual comienza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia. Para la normalización se utilizó el gen de expresión constitutiva *At1g13320*.

4.15. Generación de líneas transgénicas mediante el sistema CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 utiliza un RNA guía único (sgRNA) diseñado para proporcionar especificidad de secuencia, y depende de la actividad endonucleasa del complejo sgRNA/Cas9 para producir roturas de doble cadena en los sitios genómicos especificados por las guías. Las roturas de doble cadena provocan la activación del sistema de reparación del DNA en las células huésped, normalmente a través de la vía de unión de extremos no homólogos. Dado que la vía de reparación es propensa a errores, se introducen pequeñas deleciones o inserciones durante el proceso de reparación, dando lugar a mutaciones. Este sistema tan altamente eficiente y fácil de usar, puede utilizarse para realizar modificaciones del genoma, y está suplantando el uso de ZFN y TALEN para convertirse en la tecnología estándar de edición del genoma (Wang et al., 2015).

Si se obtienen líneas transgénicas derivadas de células embriogénicas que expresan el sistema CRISPR/Cas9, pueden ser homocigóticas para los genes diana editados en la primera generación, lo que indica que los genes diana son editados en las células embriogénicas antes de la primera división celular (Wang et al., 2015).

En este trabajo de Fin de Master, se ha utilizado el sistema de transformación descrito por Wang et al. (2015) en el que el uso de un promotor específico de ovocitos para dirigir la expresión de Cas9 permite obtener mutantes homocigotos con mucha eficiencia. El uso de dos RNA guías (gRNA), permitió introducir una deleción que generó alelos nulos para el gen *SVP*.

4.15.1. Síntesis de oligonucleótidos

Para este protocolo se buscaron dos sitios diana de 20 pb (5'-N₂₀NGG-3') sin exones del DNA genómico de la secuencia del gen de interés. Se evaluó la especificidad de las dianas escogidas en una web que evalúa la existencia de posibles sitios off-target (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>).

Los oligonucleótidos se obtuvieron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies). Las secuencias escogidas para las guías y los oligonucleótidos diseñados mediante la estructura indicada en el protocolo se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4: Cebadores específicos para la obtención del gRNA

Cebador	Secuencia (5'→3')
DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTGGTAAAGAGAAGAGATGGAGGGTT
DT1-F0	TGGTAAAGAGAAGAGATGGAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
DT2-R0	AACCCGGAAAAC TGTTCGAGTTCCAATCTCTTAGTCGACTCTAC
DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAACCCGGAAAAC TGTTCGAGTTCCAA

4.15.2. Clonación mediante el sistema Golden Gate (GG)

La utilización de la herramienta Golden Gate sirve para realizar ensamblajes modulares de secuencias de DNA. Este sistema permite realizar combinaciones múltiples de ensamblaje y la realización de construcciones que puede ser simples, con piezas

individuales como promotores, secuencias de DNA, terminadores, etc. Pero también puede realizar construcciones más complejas a partir de vectores que contienen una o más unidades transcripcionales. Este sistema se basa en el uso de enzimas de restricción tipo IIS y la T4 DNA ligasa. No se presenta diana de corte, si no que tiene un sitio de reconocimiento no palindrómico y se produce el corte unos nucleótidos más allá, dejando extremos protuberantes. Las partes que se ensamblan están flanqueadas por las dianas de las enzimas de restricción con una orientación hacia dentro del fragmento. Esto facilita que se produzca una unión sin costuras, ya que la diana desaparece tras el ensamblaje (Engler et al., 2008; Engler et al., 2009).

El primer paso para el uso de este sistema fue la domesticación de la secuencia de interés para asegurar su compatibilidad con Golden Gate. En este paso se eliminaron los sitios de restricción no deseados en la secuencia. Una vez realizada la domesticación, se amplificó la secuencia en una reacción que contiene los cebadores con los sitios de reconocimiento de corte de la enzima Bsal flanqueando la secuencia, para facilitar su inserción en el vector plasmídico pCBC-DT1T2, el cual incorpora los sitios de reconocimiento para Bsal. Para comprobar la Una vez amplificada, se llevó a cabo la reacción de ligación en la que se introduce la construcción en el vector de destino pHEE401, que contiene el promotor específico de la célula huevo y el terminador que estabiliza a la Cas9.

4.15.3. Amplificación de la secuencia mediante PCR

El primer paso para la obtención de la construcción con las dos guías fue llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde los reactivos utilizados fueron los siguientes: 10 μ L del tampón Phusion HF Buffer al 5x, 3 μ L de MgSO₄ (25 mM), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de la enzima Taq Phusion a una concentración final de 0,02 U/ μ L, 1 μ L del plásmido PCBC-DT1T2 (diluido 200 veces), 1 μ L de cada uno de los cebadores de la Tabla 1, DT1-BsF y DT2-BsR a una concentración de 20 μ M y DT2-R0 y DT1-F0 a una concentración de 1 μ M y 32 μ L de H₂O miliQ.

El programa utilizado en el termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies) constó de los siguientes pasos: (1) Un ciclo de desnaturalización del DNA a 98°C, 30 segundos (2) 35 ciclos con una fase de desnaturalización a 98°C, 15 segundos, otra fase de anillamiento a 60°C, 30 segundos y la fase de extensión a 72°C, 40 segundos. (3) Un ciclo final de extensión a 72°C, 5 minutos.

4.15.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa y purificación del DNA

Para la obtención del producto de PCR purificado, se procedió a cargar las muestras de DNA en un gel de agarosa al 1% (p/v) con tampón TBE 1x (Tris; Borato; EDTA) y bromuro de etidio 0,5 μ g/mL para poder visualizar las bandas al irradiar con luz ultravioleta. La electroforesis se realizó mediante el sistema horizontal Sub-Cell GT conectado a la fuente de alimentación *PowerPack™ Basic* (BioRad). El tampón de carga utilizado para las muestras fue el TriTrack 6x (Thermo Scientific™) y el marcador de peso molecular el GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™).

Para obtener las bandas de DNA de interés, se cortó con una cuchilla estéril la zona donde se visualizaba la banda mediante el uso de luz ultravioleta. La recuperación de la banda se llevó a cabo con el Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) siguiendo el protocolo indicado en el kit.

4.15.5. Reacción de ligación

Con el producto de PCR purificado y para introducir la construcción en el vector destino se llevó a cabo una reacción de ligación mediante los siguientes componentes: (1) 3 μL del producto de PCR purificado ($\sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 1 μL de pHEE401 ($\sim 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 1,5 μL del buffer T4 DNA Ligasa 10x (NEB), 1,5 μL de BSA 10x, 1 μL de Bsal (NEB), 1 μL de T4 DNA Ligasa (HC, NEB) y 6 μL de H_2O miliQ.

Las condiciones de la reacción de ligación fueron las siguientes: (1) 5 horas a 37°C . (2) 5 minutos a 50°C . (3) 10 minutos a 80°C .

4.15.6. Vectores utilizados

En la Tabla 6 se muestran los vectores utilizados para la clonación y la transformación de las plantas de *A. thaliana* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

Tabla 5: Vectores utilizados para la clonación

Vector	Resistencia	Uso
pCBC-DT1T2	Cloranfenicol	Vector para fabricar casetes de expresión con los sitios diana de sgRNA. Contiene los sitios de restricción para Bsal
pHEE401	Higromicina	Vector destino con el promotor específico de célula huevo. Contiene el scaffold de sgRNA para la inserción de las dianas

4.15.7. Cepas bacterianas

Para el clonaje y la transformación de las plantas de *A. thaliana* con la construcción diseñada, se utilizaron las siguientes cepas bacterianas (Tabla 6):

Tabla 6: Cepas bacterianas utilizadas

Bacteria	Cepa	Origen
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	Promega
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 pMP90	Koncz y Schell (1989)

4.15.8. Condiciones de cultivo de microorganismos

Los microorganismos utilizados para la transformación se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) compuesto por 10 g/L de triptona (Panreac), 10 g/L de NaCl (Duchefa), 5 g/L de extracto de levadura (Duchefa) y 800 mL de H_2O miliQ. Antes del uso del medio LB, este fue previamente esterilizado en el autoclave, durante 20 minutos a 120°C y 1

bar de presión. Además, en función del cultivo se añadió la cantidad necesaria de agente de selección (Tabla 7). El medio LB sólido constó también de 3 g/L de agar bacteriológico, que se autoclavó, se atemperó a 55°C en un baño termostatzado y se utilizó para preparar las placas Petri de cultivo bacteriológico, en una cabina de flujo laminar esterilizada mediante radiación ultravioleta. Cuando el LB de las placas se solidificó, se almacenó a 4°C en oscuridad para su posterior uso.

4.15.9. Agentes de selección

Para realizar la selección de las cepas bacterianas transformadas y de las líneas transformantes, se utilizaron distintos antibióticos como agentes de selección (Tabla 7).

Tabla 7: Antibióticos utilizados como agentes de selección

Antibiótico	Stock	Concentración de uso
Kanamicina	100 mg/mL	50 µg/mL
Rifampicina	50 mg/mL	50 µg/mL
Spectinomicina	100 mg/mL	100 µg/mL

4.15.10. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes de *E.coli* se llevó a cabo con la cepa bacteriana que se indica en la Tabla 6. Para transformar se siguieron los siguientes pasos: (1) Se añadió 1 µL de la reacción de ligación a una alícuota de células competentes y se dejó durante 5 minutos en hielo. (2) Se extrajeron 40 µL de la mezcla y se colocaron en una cubeta de electrodos de 0,1 cm de separación (BioRad). (3) La electroporación se realizó con el sistema GenePulse TM (BioRad) someténdolas a un pulso de corriente eléctrica de 1600 V. (4) Después de la electroporación, se añadió 1 mL de LB líquido, se mezcló y se pasó el contenido a un tubo de ensayo de 1,5 mL. (5) Una vez pasado al tubo de ensayo, se incubó a 37°C durante 1 hora en el caso de *E. coli* y a 28°C durante 2 horas en el caso de *A. tumefaciens*. (6) Tras la incubación se plaquearon 50 µL en medio LB sólido que contiene el agente de selección adecuado para cada organismo. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad durante 2 días a temperatura ambiente.

4.15.11. Identificación de las colonias positivas mediante PCR de colonias

Para identificar aquellas colonias de *E. coli* positivas para el inserto, se realizó una PCR de colonias, utilizando los reactivos y las condiciones que se utilizaron para la sonda de la ISH. Para añadir el DNA, mediante el uso de un mechero Bunsen para garantizar la esterilidad, se tocaron levemente con una punta de pipeta, hasta 16 colonias al azar procedentes del cultivo de las células competentes de *E.coli* que habían sido transformadas. En otra placa de cultivo celular se establecieron las 16 colonias de forma que se pudiesen identificar, y finalmente se depositó la punta de pipeta en los tubos de ensayo para la PCR, aportando el DNA a la reacción. Tras la reacción de PCR, se cargaron las muestras de DNA de las 16 colonias en un gel para detectar las que eran positivas para el inserto.

4.15.12. Aislamiento del DNA plasmídico

Las colonias positivas se cultivaron en viales con 5 mL de medio LB líquido con el antibiótico correspondiente y se mantuvieron en ese medio 12 horas en oscuridad y con agitación a 37°C. Para este procedimiento se utilizó 1,5 mL de cada colonia obteniendo por medio de columnas el aislamiento del DNA plasmídico. La realización se llevó a cabo mediante el NZY Miniprep kit (Nzytech) siguiendo el protocolo indicado en el kit y una vez finalizado, se midió la calidad y la cantidad de DNA plasmídico mediante el uso de Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific).

4.15.13. Verificación de las colonias positivas por secuenciación

Para verificar la selección de las colonias positivas, se realizó la secuenciación en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia) con el secuenciador ABI 3130 XL (Applied). Las muestras se prepararon según las indicaciones que se habían especificado y para la secuenciación se utilizaron los cebadores específicos de los vectores (Tabla 8), así como las propias secuencias analizadas.

4.15.14. Cebadores utilizados para la detección y verificación de la construcción

Los cebadores utilizados para detectar las colonias positivas con el inserto y verificarlas mediante la secuenciación son los que se indican a continuación (Tabla 8).

Tabla 8: Cebadores utilizados para la detección y verificación de la construcción

Cebador	Secuencia (5'→3')	Uso
U6-26p-F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	PCR de colonias
U6-29p-R	AGCCCTCTTCTTTTCGATCCATCAAC	PCR de colonias y Secuenciación
U6-29p-F	TTAATCCAAACTACTGCAGCCTGAC	Secuenciación

4.15.16. Transformación genética de *Arabidopsis thaliana*

En primer lugar, se inoculó el cultivo de *A. tumefaciens* en un tubo Falcon con 5 mL de LB líquido y los agentes de selección correspondientes (Kanamicina y Rifampicina). Se incubó durante 24°C en una cámara a 28°C y en oscuridad. Una vez incubado, se precipitó mediante centrifugación a 5000 rpm durante 20 minutos y a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 mL de una solución de sacarosa al 5% (p/v) con Silwet L-77 (500 µL/L). Por último, se homogeneizó mediante una agitación suave.

Con esta solución se transformaron los mutantes mir172ab, mir172cd, mir172abd, mir172e, Q mir172 y FT. Se sembró una planta por maceta en macetas de 12 cm de diámetro. Para transformar, con una pipeta se fue depositando la solución con *A. tumefaciens* gota por gota en el meristemo de las inflorescencias. Las ramificaciones más jóvenes se eliminaron y se cubrió con un plástico para mantener la humedad. También se evitó la incidencia de luz directa para favorecer la acción de *A. tumefaciens*. Este proceso de transformación se repitió a los pocos días para transformar los

meristemas de las inflorescencias más jóvenes y mejorar la eficiencia de la transformación.

4.15.17. Recolección y almacenaje de semillas

Tras completar el ciclo de vida de las plantas y una vez que se secaron por completo, se recolectaron las semillas en tubos de ensayo de 1,5 mL, tamizadas de forma previa. Después, fueron secadas durante 2 días a 37°C. Las semillas se almacenaron en completa oscuridad, en una cámara refrigerada a 10°C y humedad del 25%, para su correcta conservación.

5. Resultados

5.1. Fenotipado de la cinética de producción de flores

5.1.1. SVP inhibe el final de la floración

Puesto que se había identificado al factor de transcripción *SVP* como un posible regulador del final de la floración, se decidió realizar la caracterización fenotípica del mutante *svp-32* y analizar como afectaba a este proceso. Con este propósito se crecieron plantas del ecotipo silvestre *Columbia* (*Col-0*) y del mutante *svp-32* en condiciones estándar de crecimiento (ver Material y Métodos) y se contabilizaron las flores que se producían en la inflorescencia principal cada 2-3 días desde la aparición de la primera flor en antesis hasta el momento en el que se detenía la producción de flores. Los datos obtenidos mostraron claras diferencias entre el mutante *svp* y las plantas control. Mientras que los controles produjeron una media de $46,25 \pm 3,49$ flores, el mutante *svp* apenas produjo la mitad de flores (reducción del 55%), con una media de $20,77 \pm 3,86$ flores producidas en la inflorescencia principal (Figura 3A, 3B).

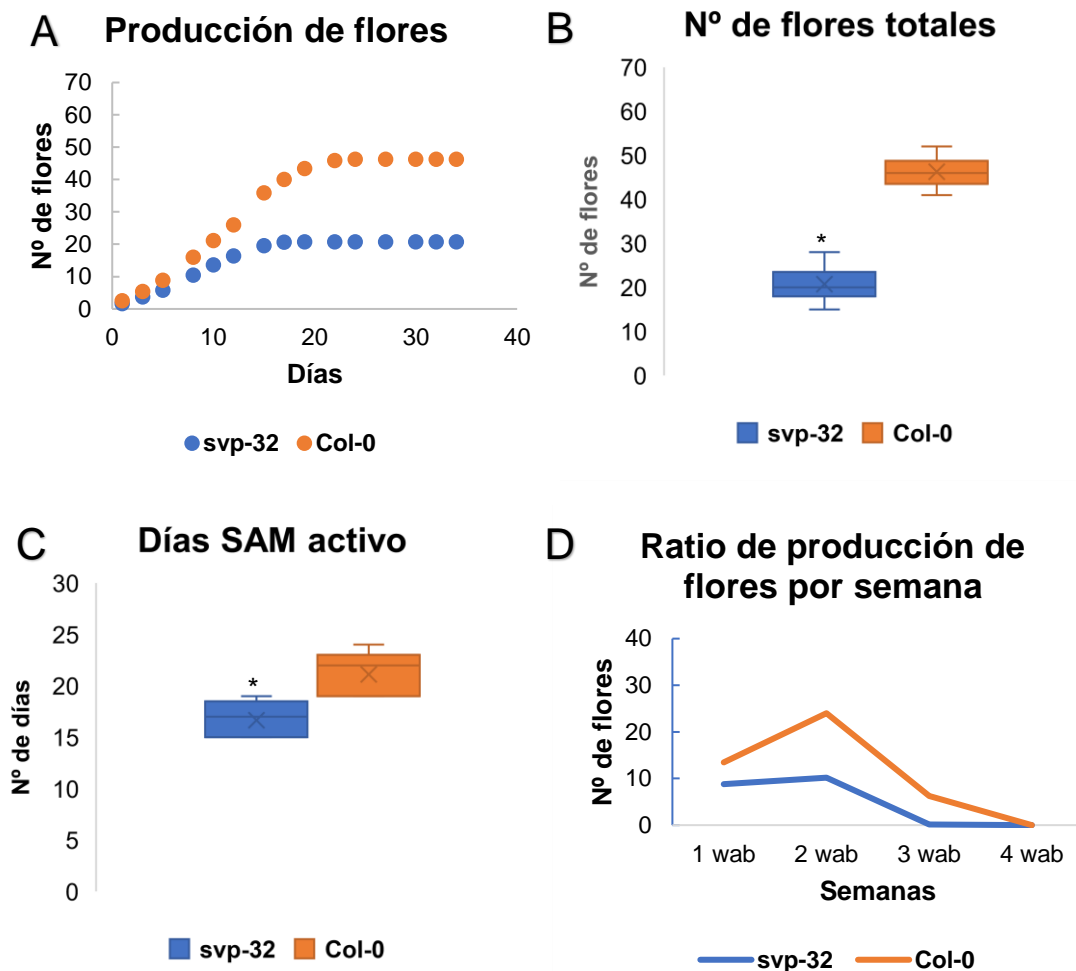


Figura 3: Fenotipado de la cinética de producción de flores en día largo (LD) **A.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **B.** Representación de la producción de flores totales de *svp-32* y *Col-0*. **C.** Representación de días totales en los que se mantiene el SAM activo en *svp-32* y en *Col-0*. **D.** Ratio de flores producidas por semana por *svp-32* y *Col-0*. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

El número total de flores producidas por el SAM está determinado por dos factores: el tiempo que el meristemo permanece activo (duración del periodo de floración) y la velocidad a la que este meristemo produce nuevos primordios (tasa de producción). En plantas mutantes para genes involucrados en el final de la floración como *ful*, se ha observado que la mayor producción de flores se debe a una extensión temporal de la actividad del SAM (Balanzà et al., 2018), o lo que es lo mismo, a una extensión del periodo de floración. El análisis de nuestros datos sugería que en el mutante *svp*, la reducción en el número total de flores producidas por el SAM se podría deber a alteraciones en los dos factores comentados, reducción del periodo de floración y una menor tasa de producción de flores. El mutante *svp* presentaba un periodo de floración de unos $16,6 \pm 1,73$ días frente a los $21,11 \pm 2,15$ días de las plantas silvestres (Figura 3A, 3C). Por otro lado, el mutante *svp* presentaba también una menor tasa de producción de flores durante la segunda semana tras el *bolting* (Figura 3A, 3D), aunque este valor podría estar afectado por el adelanto en el final de la floración observado, que siempre se asocia con una menor tasa de producción.

Los resultados obtenidos indicaban que SVP podría tener un papel en la regulación de la actividad del meristemo inflorescente, promoviendo su actividad e impidiendo una parada temprana.

5.1.2 Impacto de la calidad de la luz y el fotoperiodo en el control del final de la floración

5.1.2.1. SVP modula la actividad del SAM en función de la calidad de la luz

El papel regulador de SVP en el control de la transición floral está ampliamente documentado (Capovilla et al., 2015; Hartmann et al., 2000; Li et al., 2008), donde actúa como un represor. Durante la transición floral, el papel de SVP está relacionado en muchos casos con la respuesta de la planta frente a estímulos ambientales, hormonas y estrés. Por este motivo, se decidió testar si determinadas señales ambientales afectaban al final de la floración y si estas dependían de SVP. Debido a las limitaciones de tiempo y de infraestructuras se decidió caracterizar el final de la floración en dos condiciones de crecimiento diferentes: Modulando el ratio rojo/rojo lejano (R/FR) y el fotoperiodo.

Las plantas tienen la capacidad de percibir y responder de forma diferencial a determinadas longitudes de onda específicas a través de los fotorreceptores (Demotes-Mainard et al., 2016), permitiéndoles adaptar su crecimiento en función de la calidad de la luz que reciben. Por ejemplo, la proporción entre rojo y rojo lejano es una de los factores que condicionan el crecimiento de las plantas, ya que las plantas absorben luz roja y reflejan luz roja lejana, modificando su ciclo biológico en base a estas señales. En condiciones normales de luz solar el ratio R/FR es de aproximadamente 1. Para evaluar los efectos de la calidad de la luz, se comparó la producción del experimento anterior, donde el mutante *svp-32* y el control *Col-0* estaban expuestos a una luz con ratio R/FR \approx 1 (equivalente a la luz solar), con la exposición de ambas líneas a una luz con ratio R/FR \approx 5 (luz artificial). Los resultados para *svp-32* y *Col-0* en ambas condiciones evolucionaron de manera similar (Figura 3, Figura 4).

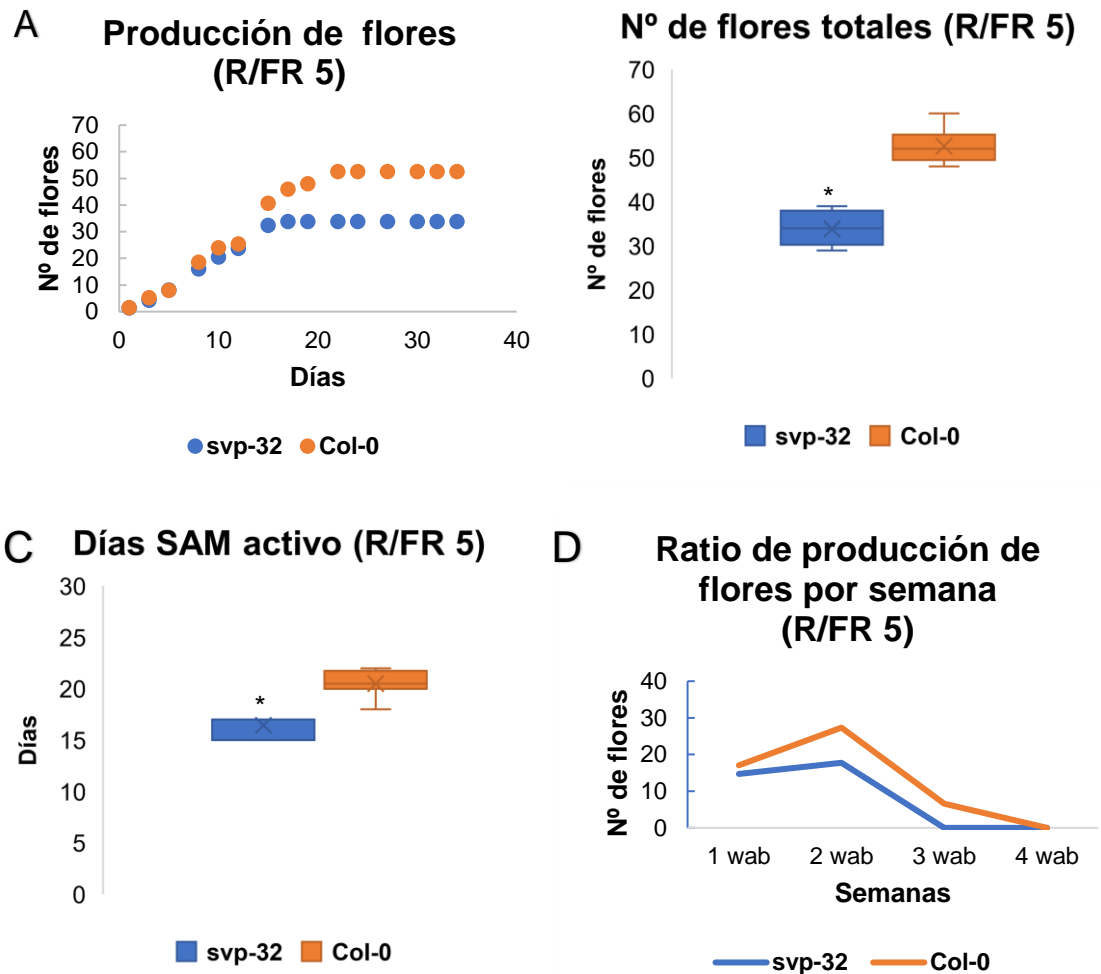


Figura 4: Fenotipado de la cinética de producción de flores con R/FR≈5. **A.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* con R/FR≈5 donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **B.** Representación de la producción de flores totales de *svp-32* y *Col-0* con R/FR≈5. **C.** Representación de días totales en los que se mantiene el SAM activo en *svp-32* y en *Col-0* con R/FR≈5. **D.** Ratio de flores producidas por semana por *svp-32* y *Col-0* con R/FR≈5. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

En las líneas expuestas a una luz artificial (R/FR≈5), el mutante *svp-32* produjo un total de $33,87 \pm 3,8$ flores mientras que *Col-0* produjo un total de $52,63 \pm 3,8$ flores (Figura 4A, 4B). Estos resultados indicaban que el mutante *svp-32* producía un 35% menos flores que las plantas control. Interesantemente, bajo estas condiciones de luz (R/FR≈5) tanto el mutante *svp-32* como las plantas silvestres aumentaron el número de flores producidas si se comparan con el experimento anterior (R/FR≈1). De este modo, las plantas control incrementaron un 12% su producción, mientras que el mutante *svp-32* lo hizo en un 38%.

Estos resultados confirman el papel regulador de *SVP* en el control de la actividad del meristemo inflorescente ya que el mutante *svp* volvió a producir menos flores que las plantas control. A su vez, esta misma caracterización sugería que el mutante *svp* podría ser más sensible a cambios en el ratio R/RF, complementándose parcialmente su fenotipo al incrementar la proporción de luz roja en el experimento.

Al analizar la duración del periodo de floración en estas condiciones ($R/FR \approx 5$) (Figura 4A, 4C) no se observaron cambios respecto al experimento inicial ($R/FR \approx 1$) (Figura 3A, 3C). De este modo, los incrementos observados en la producción de flores se debieron a un incremento de la tasa de producción de flores (Figura 3A, 3D; Figura 4A, 4D). Tanto el mutante *svp* como las plantas control se comportaron de forma similar en ambas condiciones de crecimiento, pero con unas tasas de producción mayores.

Nuestros datos indicaron de nuevo que *SVP* es importante en el control del final de la floración, actuando como un represor de este proceso. Por otro lado, nuestros resultados también indicaron que la calidad de la luz, y en concreto el ratio R/FR , modula la tasa de producción del meristemo inflorescente, aunque aparentemente no afectan a la extensión del periodo de floración. Además el efecto de un ratio R/FR elevado en la tasa de producción del meristemo podría estar modulado por la actividad de *SVP*, ya que la respuesta del mutante *svp* fue considerablemente mayor que la de las plantas silvestres.

5.1.2.2. *SVP* modula la actividad del SAM en condiciones de día corto luz

El mutante *svp* presenta un fenotipo de floración temprana, iniciando la transición floral tras la producción de un número reducido de hojas (Balanzà et al., 2014). Se ha descrito que la función de *SVP* en la transición floral es prolongar las etapas de la fase vegetativa hasta conseguir una adecuada movilización de materia orgánica y energía acumulada (Hartmann et al., 2000) que permita el desarrollo de la inflorescencia. De este modo, en comparación con las plantas silvestres, el mutante *svp* presenta una biomasa mucho menor. Estas observaciones nos hicieron plantearnos si el fenotipo observado en *svp* podría ser la consecuencia de esta reducción en biomasa y de una menor capacidad para producir energía. En esta línea, se ha descrito que las plantas que crecen expuestas a luz roja, con una menor proporción de rojo lejano, son plantas más vegetativas y de mayor tamaño (Eskins, 1992). Nuestros datos en condiciones de $R/FR \approx 5$ reflejan una mayor actividad meristemática asociada a una más alta tasa de producción, aunque no se evaluó si existía una relación con un incremento en biomasa.

Bajo estas premisas, se decidió caracterizar el final de la floración en condiciones de fotoperiodo de día corto, permitiéndonos evaluar el efecto que pudiera generar un incremento de biomasa, así como las propias condiciones del fotoperiodo. En *Arabidopsis*, la transición floral en día largo (LD) se desencadena por medio de *FT*. Sin embargo, cuando la transición se da en día corto (SD), se realiza mediante otras vías como la de las GAs o la autónoma. En estas condiciones, las plantas silvestres presentan un fuerte retraso de la floración que se asocia con un claro incremento en el número de hojas producidas.

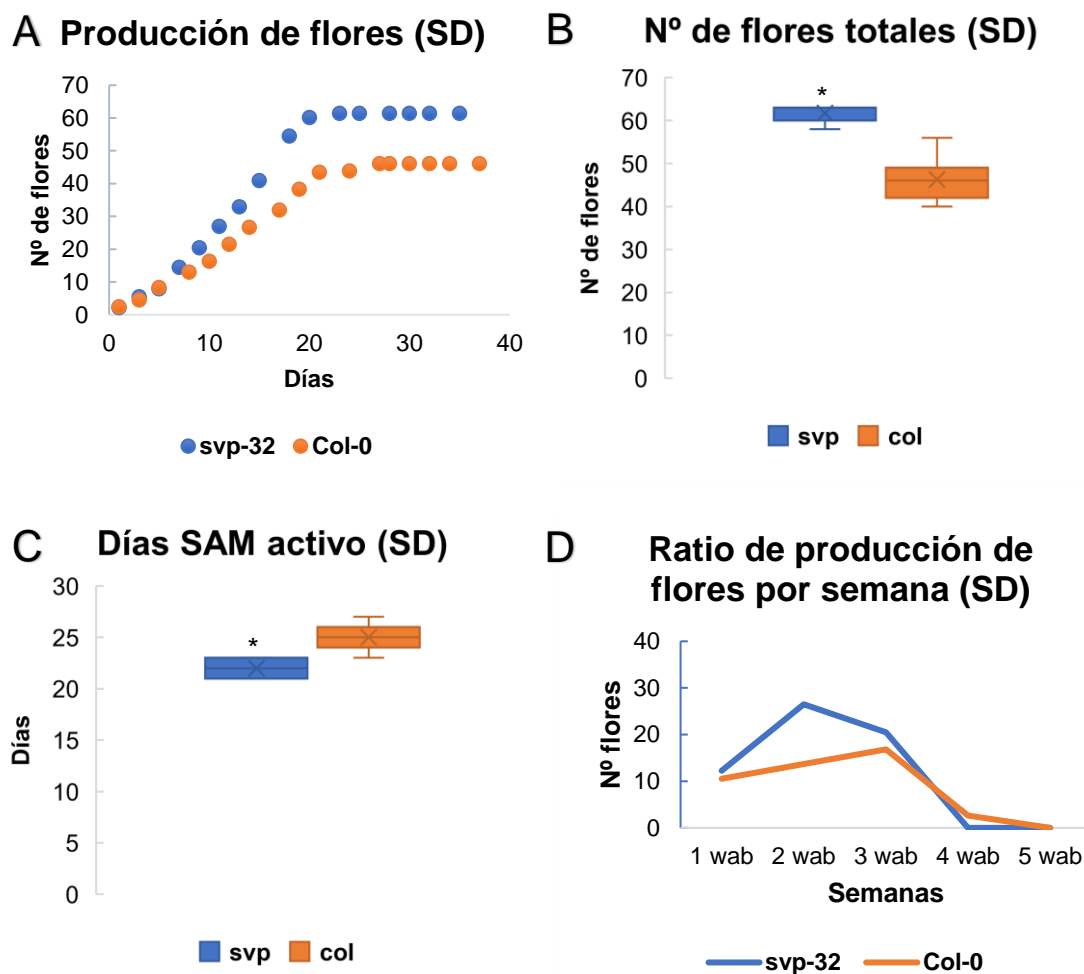


Figura 5: Fenotipado de la cinética de producción de flores en día corto (SD) **A.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* en SD donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **B.** Representación de la producción de flores totales de *svp-32* y *Col-0* en SD. **C.** Representación de días totales en los que se mantiene el SAM activo en *svp-32* y en *Col-0* en SD. **D.** Ratio de flores producidas por semana por *svp-32* y *Col-0* con en SD. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

En condiciones de SD, *svp-32* presentó una producción de $61,50 \pm 1,9$ flores, frente a las $46,22 \pm 4,9$ flores producidas por el ecotipo *Col-0* (Figura 5A, 5B). Sorprendentemente, en estas condiciones, la tendencia observada en experimentos anteriores se invirtió, produciendo el mutante *svp* un 33% más flores que el control en estas condiciones, y un 200% más que *svp* en condiciones de LD. Por su parte, las plantas silvestres tuvieron un producción similar a la observada en LD.

En condiciones de SD se observó además, un incremento del periodo de floración respecto a condiciones de LD. El mutante *svp-32* estuvo produciendo flores durante unos $22 \pm 1,1$ días frente a los $16,6 \pm 1,73$ días de LD, mientras que las plantas control estuvieron produciendo flores durante $25 \pm 1,3$ días frente a los $21,11 \pm 2,15$ días de las LD (Figura 3A, 3C; Figura 5A, 5C). A pesar de la extensión en el periodo de floración producida en SD, de nuevo se observó que las plantas *svp* presentaban periodos de floración más cortos que las plantas control, reforzando la hipótesis de un papel regulador de *SVP* en el control del final de la floración.

Al analizar los datos de tasa de producción de flores se confirmaron nuestras observaciones anteriores. El mutante *svp* presentaba tasas de producción mayores que las plantas control, explicando la mayor producción de flores observada en el mutante *svp* a pesar de detenerse antes (Figura 5A, 5D).

De estos resultados se pueden concluir varias cosas. Aparentemente el incremento en biomasa no afecta significativamente a la producción de flores en las plantas silvestres, aunque no podríamos descartar un efecto en el mutante *svp*. Por otro lado, el fotoperiodo sí que tiene un efecto en el periodo de floración. En condiciones de SD este se extiende, retrasándose el final de la floración. Además, teniendo en cuenta lo observado en las plantas control, en condiciones de SD la tasa de producción de flores disminuye, ya que se producen las mismas flores en SD que en LD. Por último, *SVP* parece tener un papel adicional en la regulación de la actividad del meristemo en estas condiciones, controlando la tasa de producción de flores, similar al efecto observado en condiciones R/FR≈5.

5.1.3. El control de SVP sobre la actividad del meristemo no depende de la biomasa, sino de posibles cambios en el SAM dependientes de la edad

Debido a las grandes diferencias en número de hojas producidas por el mutante *svp* en las dos condiciones de crecimiento analizadas (LD y SD) y para poder descartar un posible efecto de este factor en el control del final de la floración, se decidió realizar un experimento adicional. Con intención de caracterizar el mutante *svp* con diferentes biomasa, se sembraron varias bandejas que contenían plantas del mutante *svp-32* junto con el control *Col-0*. Estas plantas iniciaron su desarrollo en SD y cada bandeja se cambió a LD a diferentes tiempos de desarrollo. Luego se realizó un seguimiento de la producción de flores y frutos, así como del tiempo en el que el SAM se encuentra activo. Las condiciones analizadas fueron las siguientes:

- Plantas 15 días en SD pasadas a LD
- Plantas 25 días en SD pasadas a LD
- Plantas 30 días en SD pasadas a LD
- Plantas 35 días en SD pasadas a LD

De las cuatro condiciones, tan solo la última (35d SD) había realizado la transición floral en condiciones de SD. Al analizar los datos, se observó que tanto las plantas pasadas a 15, 25, 30 días en SD a condiciones de LD se comportaron como las plantas crecidas en LD (Figura 3A; Figura 6A, 6B, 6C), mientras que las plantas que se pasaron a LD tras haber estado 35d en SD se comportaron como las plantas crecidas de forma continua en SD (Figura 5A; Figura 6D): Las plantas del mutante *svp* pasadas a LD tras 35 días en SD produjeron un total de $59,36 \pm 4,9$ flores por inflorescencia principal ($61,50 \pm 1,9$ en SD), mientras que *Col-0* produjo una media de $47 \pm 5,8$ flores ($46,22 \pm 4,9$ en SD). Además, el mutante *svp* tuvo el SAM activo unos $21 \pm 1,4$ días ($22 \pm 1,1$ días en SD), frente a la actividad del SAM de *Col-0*, que se mantuvo $25 \pm 2,9$ días ($25 \pm 1,3$ días en SD).

Estos datos confirman que el mecanismo que controla el final de la floración es independiente de la biomasa (número de hojas) que desarrolla la planta, al menos en *Arabidopsis*.

Por otro lado el efecto descrito para las condiciones de SD parece estar determinado por un evento temprano en la formación o establecimiento del meristemo inflorescente.

El mutante *svp* crecido durante 35 días en SD y pasado a LD tras haber realizado la transición floral se comportó de forma idéntica a si hubiera completado el periodo de floración en condiciones de SD, sugiriendo que una vez iniciada la transición se predetermina el desarrollo de la inflorescencia. Por otro lado, en las plantas control, donde la transición no había tenido lugar, también se observó un comportamiento similar al presentado por las plantas que completaron su ciclo vital en condiciones de SD. Tomados estos datos en conjunto, podríamos hipotetizar que durante el crecimiento vegetativo en condiciones de SD, podrían inducirse cambios en el SAM que determinarían su posterior capacidad proliferativa. Estos cambios, además, serían dependientes de la edad de la planta, ya que solo se observaron a partir de los 35 días de crecimiento en condiciones de SD.

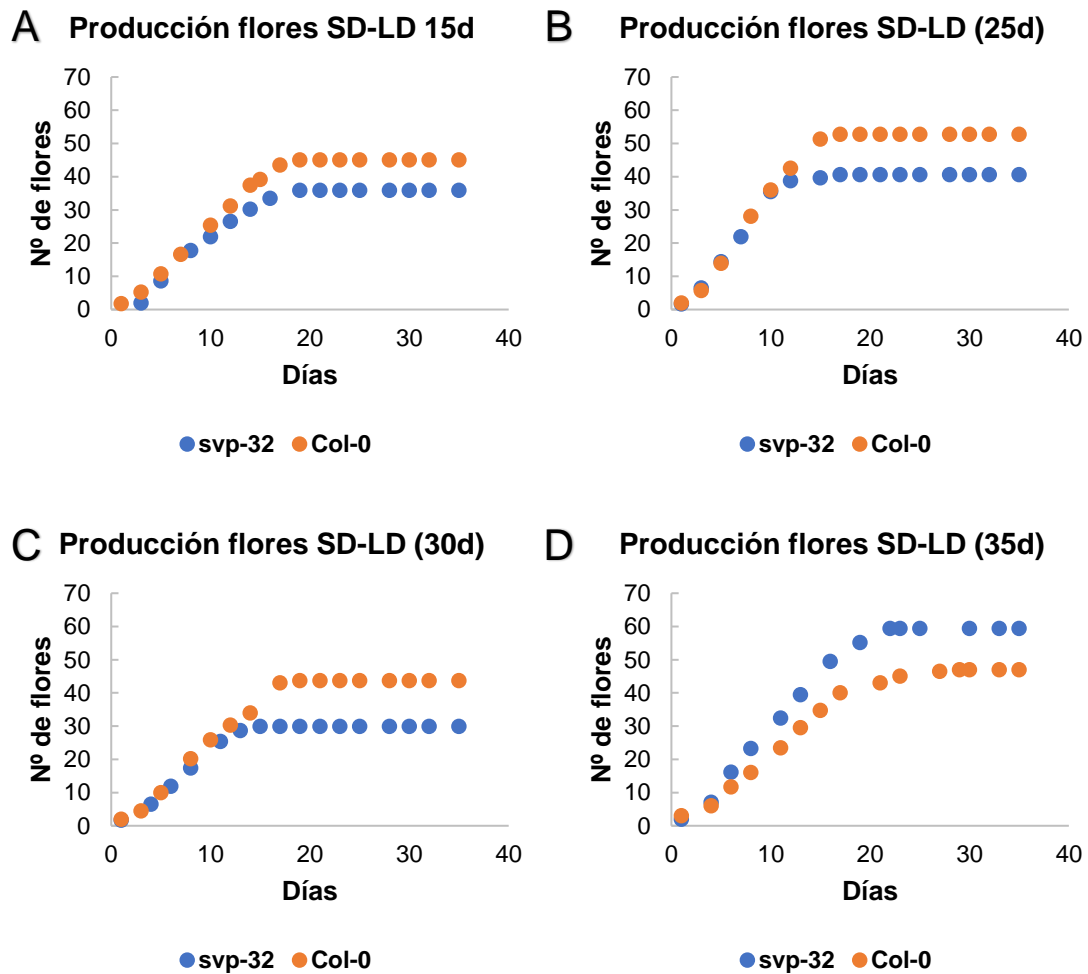


Figura 6: Fenotipado de la cinética de producción de flores en plantas pasadas de día corto (SD) a día largo (LD) **A.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* 15 días en SD pasadas a LD, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **B.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* 25 días en SD pasadas a LD, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **C.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* 30 días en SD pasadas a LD, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **D.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* 35 días en SD pasadas a LD, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

5.1.4. SVP podría interactuar con la señal derivada de la semillas en el control del final de la floración

Los resultados obtenidos en condiciones de SD también hicieron plantearnos una nueva hipótesis sobre el papel de *SVP*. La producción de semillas es un factor determinante en el control del final de la floración (Hensel et al., 1994; Noodén et al, 2004). La acumulación de biomasa parecía no tener un efecto en el final de la floración, obteniéndose una producción similar de flores/frutos/semillas, sugiriendo que la producción de semillas podría estar dirigiendo la parada del meristemo inflorescente. Puesto que el mutante *svp* parecía ser capaz de producir muchas más flores/frutos/semillas sin adelantar drásticamente el final de la floración, nos preguntámos si *SVP* podría formar parte del mecanismo regulador que regula/integra la señal derivada de las semillas que controla este proceso.

Para analizar el efecto de las semillas se realizó un experimento en el cual se fueron eliminando las flores producidas por el SAM cada dos o tres días, comparándose con plantas no podadas. La diferencia entre las plantas podadas y las no podadas se basaba en la ausencia de semillas en el eje principal, permitiéndonos analizar su impacto en la actividad del meristemo.

Los resultados obtenidos reflejaron un claro incremento en el número de flores producido en las plantas podadas. Las plantas control del mutante *svp* y del ecotipo silvestre produjeron un total de $34,2 \pm 1,2$ y $46,2 \pm 3,6$ flores respectivamente (Figura 7A, 7B; Figura 8A). Al aplicar la poda en el eje principal, las plantas del mutante *svp* y del ecotipo silvestre produjeron un total de $42,6 \pm 2,2$ y $68,2 \pm 4,1$ flores respectivamente (Figura 7A, 7B; Figura 8A). Así, la ausencia de semillas provocó un incremento en el número total de flores producido por el SAM del 24% en el mutante *svp*, mientras que la respuesta en las plantas silvestres fue de un incremento del 47%. Nuestros datos indicaron que el mutante *svp* respondía a la ausencia de semillas, aunque más débilmente que las plantas control, sugiriendo una posible interacción entre la señal dependiente de las semillas y la función de *SVP*.

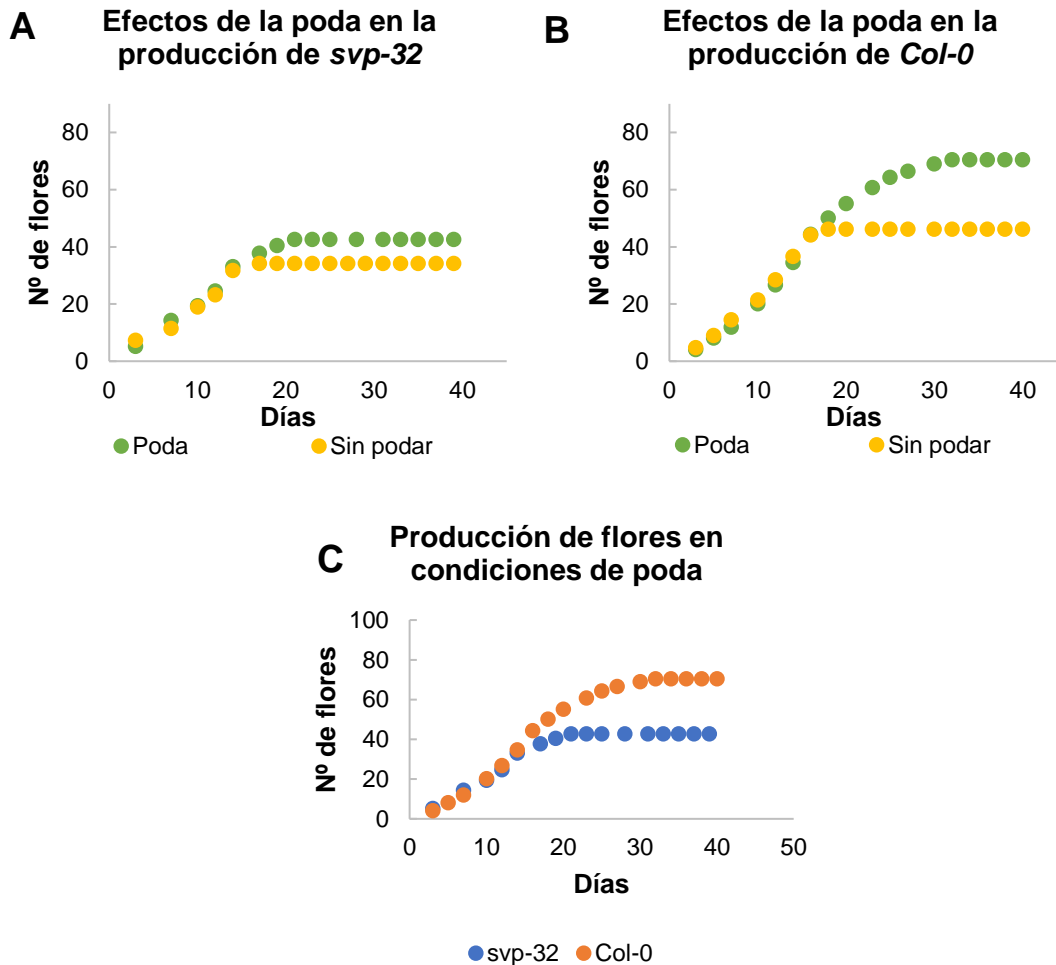


Figura 7: Fenotipado de la cinética de producción de flores en plantas sometidas a poda. **A.** Producción de flores en plantas podadas del mutante *svp-32*, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **B.** Producción de flores en plantas podadas del control *Col-0*, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. **C.** Producción de flores de *svp-32* y *Col-0* en condiciones de poda, donde cada punto representa la media en el número de flores producido del conjunto de plantas para ese día. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

Al comparar el periodo de floración entre plantas podadas y no podadas también se observó una extensión de la actividad del meristemo. En este experimento el mutante *svp* detuvo su actividad tras $15,5 \pm 1,7$ días, mientras que las plantas podadas lo hicieron a los $21,0 \pm 0,0$ días (Figura 7A, 7B; Figura 8B). Por su parte las plantas control pararon a los $17,5 \pm 1,0$ días, mientras que los controles podados lo hicieron tras $32,0 \pm 0,0$ días (Figura 7A, 7B; Figura 8B). De nuevo se observó que el mutante *svp* presentaba un periodo de floración más corto que las plantas silvestres, y que en ausencia de semillas apenas se incrementaba la duración del periodo de floración respecto a las plantas silvestres. De nuevo, nuestros datos sugerían cierto grado de insensibilidad en el mutante *svp* a la ausencia de semillas.

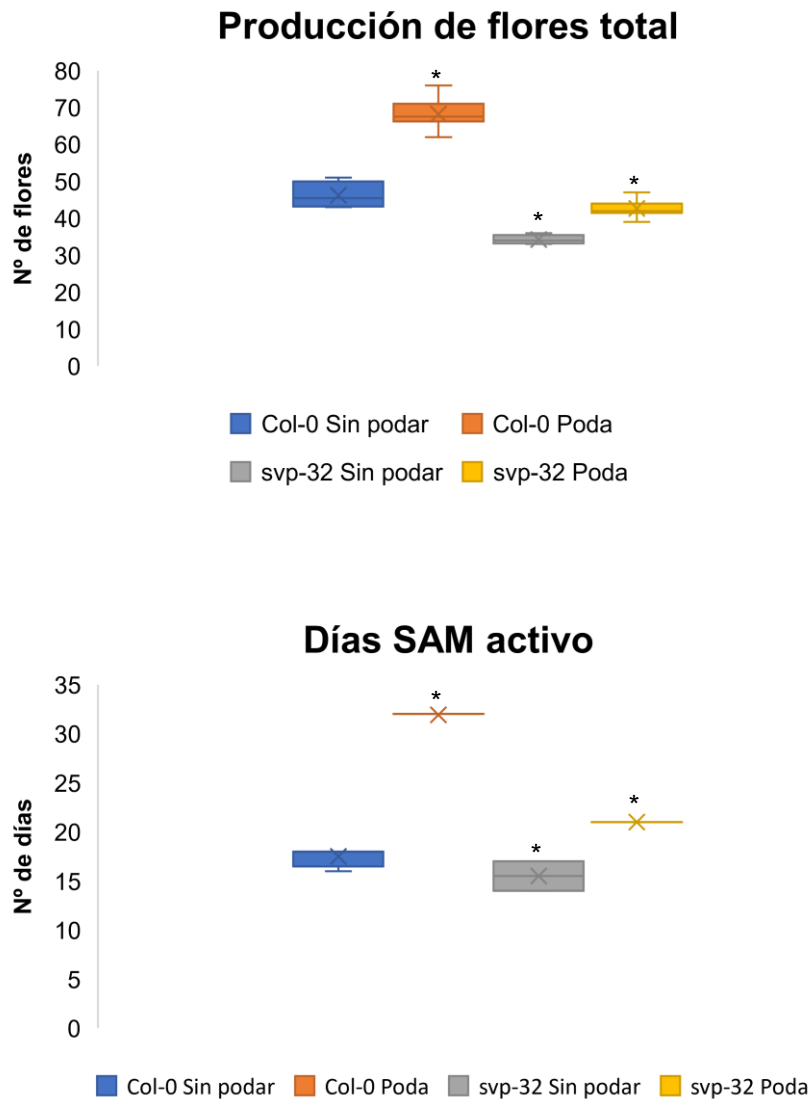


Figura 8: Producción de flores total y días en los que se encuentra el meristemo activo en condiciones de poda. **A.** Producción total de flores de *svp-32* y *Col-0* en condiciones de poda y sin podar. **B.** Días en los que se encuentra el SAM activo de *svp-32* y *Col-0* en condiciones de poda y sin podar. Todos los datos han sido sometidos a una prueba estadística t-student para comprobar las diferencias significativas de *svp-32* con respecto a los valores de *Col-0*.

5.2. Análisis del patrón de expresión de SVP

Nuestro análisis fenotípico indicaba que *SVP* podría estar actuando en el SAM, regulando su actividad y controlando el final de la floración. Por otro lado también indicaba que *SVP* podría estar interactuando con la señal emitida desde las semillas. Para establecer desde que tejidos podría estar actuando *SVP*, decidimos analizar su patrón de expresión durante el desarrollo de la inflorescencia.

Al analizar la bibliografía descubrimos que existían muy pocos análisis sobre el patrón de expresión de *SVP* y estos, se limitaban al momento en el que se produce la transición floral. Sin embargo, nuestro trabajo indica que *SVP* desarrolla un papel en el final de la floración, y por lo tanto debería expresarse durante esta etapa del desarrollo. Recientemente se ha descrito una débil expresión de *SVP* en el centro organizador del

meristemo inflorescente (Zeng et al., 2021), apoyando nuestra hipótesis de que *SVP* puede estar presente en la inflorescencia tras la transición floral. Para comprobar como evolucionaba el patrón de expresión de *SVP* en el SAM, se realizó una hibridación in situ en 1^o, 2^o y 3^o semana después de realizar el *bolting* (1 wab, 2 wab, 3 wab). Los resultados obtenidos no fueron los deseables ya que esta técnica requiere en ocasiones un proceso de optimización que no se pudo llevar a cabo por falta de tiempo. No obstante, en algunas de las muestras se pudo detectar la expresión de *SVP*. Se detectó una débil expresión de *SVP* en el meristemo y en los primordios florales en 2 wab, aunque la calidad de los tejidos fue muy baja (Figura 9). En el resto de cortes realizados, el SAM estaba demasiado dañado para observar la expresión por lo que no se obtuvieron resultados de 1 wab y 3 wab, y los que se obtuvieron de 2 wab no eran concluyentes.



Figura 9: Patrón de expresión de *SVP* en el SAM 2 semanas después del bolting (2 wab). El * indica el SAM mientras que las flechas indican la posición de los primordios florales. La imagen fue tomada con una cámara acoplada al microscopio óptico Nikon Eclipse E600 e incluye la escala en μm en el margen derecho.

A su vez, también se decidió analizar el patrón de expresión de una línea reportera *pSVP:SVP:GUS:GFP* (Gregis et al., 2009) mediante tinción histoquímica. Los estadios analizados fueron desde el periodo de plántula, el momento de la transición floral y 1^o, 2^o y 3^o semana después del *bolting*. El análisis de esta línea durante las etapas vegetativas mostró una fuerte actividad del gen *GUS* en hojas jóvenes (marcando sobretodo la vasculatura) y en el SAM, acorde con lo que se ha descrito en la bibliografía (Hartmann et al., 2000) (Figura 10A, 10B). En el momento de la transición, se produjo una disminución de los niveles de *GUS* en hojas y, aunque se detectó expresión en el SAM, esta era mucho más débil que la presentada en estadios más tempranos (Figura 10C, 10D)

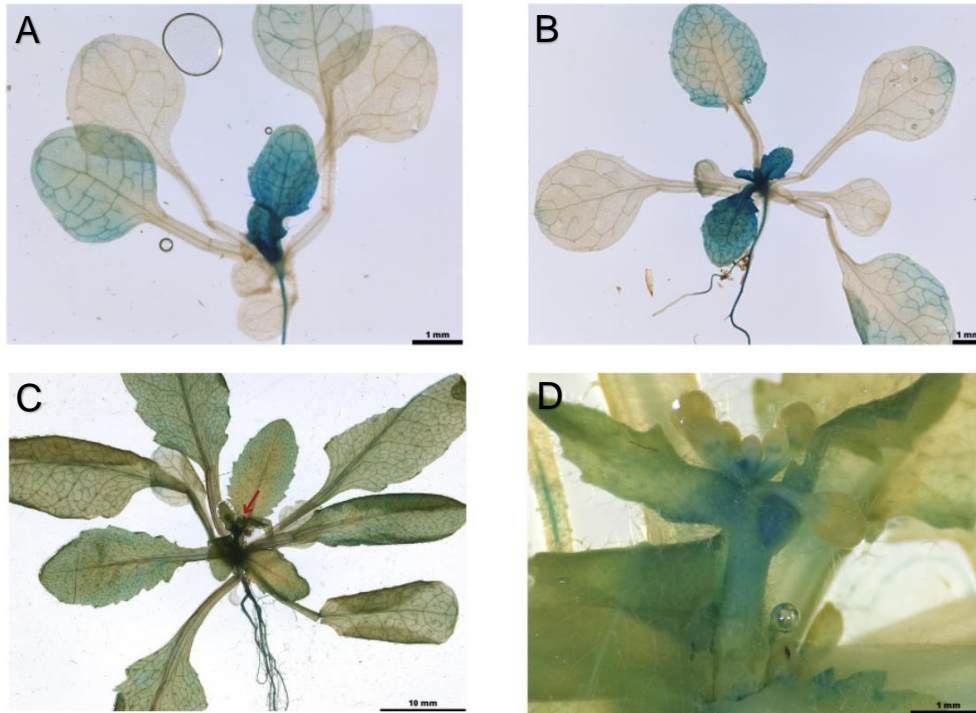


Figura 10: Patrón de expresión de la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* en plántulas y transición floral. **A y B.** Patrón de expresión de la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* en plántulas a día 7 (**A**) y día 12 (**B**). **C.** Patrón de expresión de la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* en una planta en bolting. **D.** Detalle de **C**, mostrando la expresión en la inflorescencia. La flecha indica la posición del SAM. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Leica DMS1000 a distintos aumentos e incluyen la escala en milímetros en el margen derecho

Al analizar la evolución de la expresión de la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* después del *bolting*, se observó que la señal GUS se acumulaba principalmente en la base de los pedicelos de las flores y frutos, en los filamentos de los estambres de flores en anthesis y en la base de los frutos, así como en la zona del tallo cercana al SAM y el propio SAM (Figura 11A, 11D). Este patrón de expresión se mantuvo durante la segunda semana de la inflorescencia semana, aunque la señal fue más débil (Figura 11B, 11E). Durante la tercera semana, cuando ya ha ocurrido el final de la floración, se observó una fuerte acumulación de señal en el tallo de la inflorescencia, aunque esta señal era inexistente en la zona del tallo cercana al SAM (Figura 11C, 11F). La señal GUS en el SAM se mantuvo hasta la tercera semana (Figura 11G).

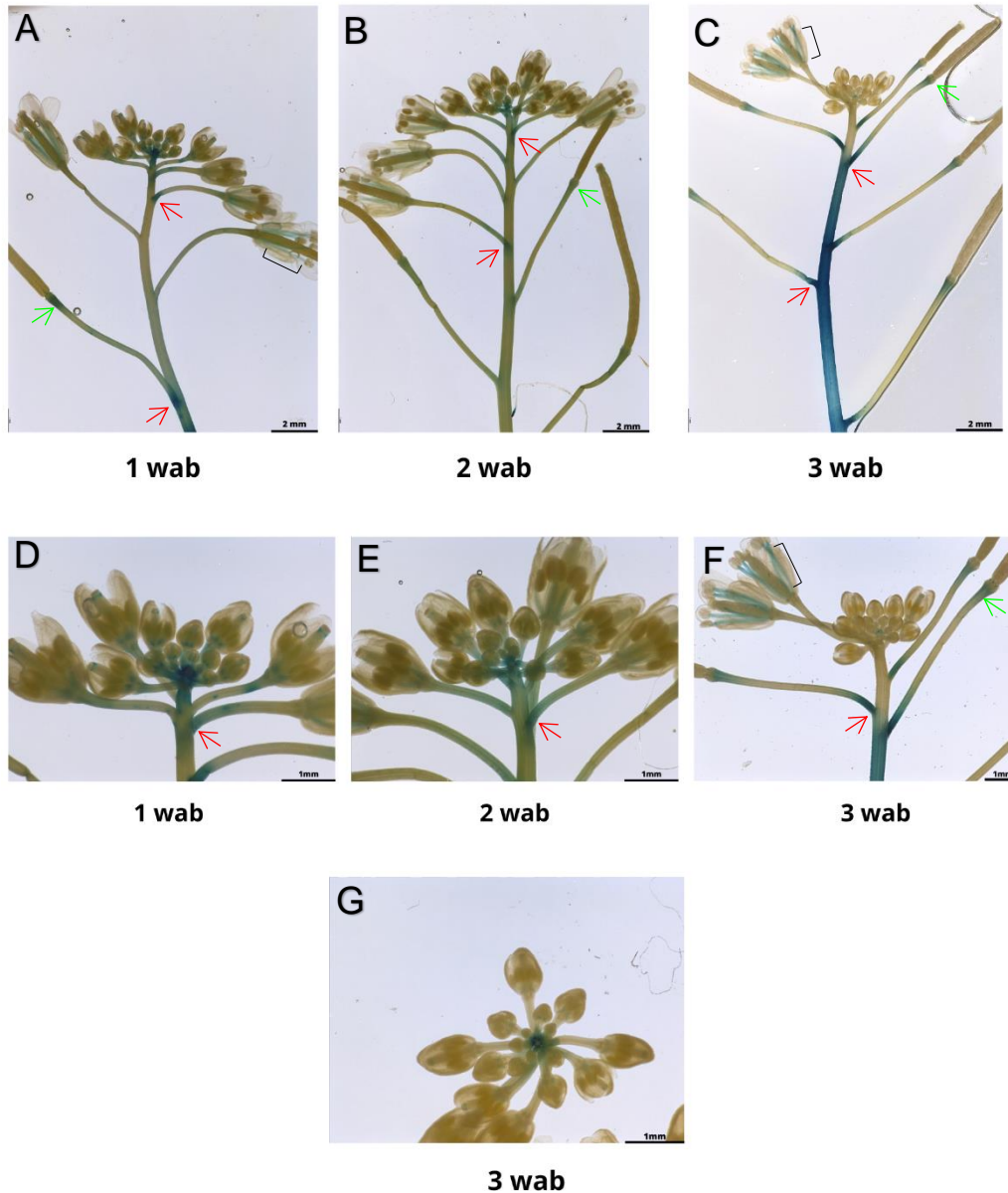


Figura 11: Patrón de expresión de la línea reportera $pSVP:GUS:GFP$ en inflorescencias a 1, 2 y 3 semanas después del *bolting* (1,2 y 3 wab) **A, B y C.** Señal detectada en inflorescencias a 1 (**A**), 2 (**B**) y 3 (**C**) wab. **D, E y F.** Detalle de las imágenes mostradas en A (**D**), B (**E**) y C (**F**). **G.** Señal en el SAM en el final de la floración (3wab). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Leica DMS1000 a distintos aumentos e incluyen la escala en milímetros en el margen derecho. Las flechas rojas indican la base de los pedicelos y las verdes la base de los frutos. El corchete negro indica la expresión detectada en los filamentos de los estambres.

Para finalizar, se examinó también el patrón de expresión en detalle en frutos pre y post-antesis, donde ya se ha iniciado la formación de las semillas (Figura 12). En estos tejidos se detectó señal en la zona del estilo y óvulos en pre-antesis (Figura 12A). En frutos post-antesis, desapareció la señal del estilo, pero se mantuvo la expresión en las semillas recién iniciadas.

La información derivada de estos experimentos, indicó que la expresión de *SVP* no se restringe a etapas previas a la transición floral, si no que está presente durante todo el ciclo vital de *Arabidopsis*, incluyendo el final de la floración. Los análisis realizados

indicaban que *SVP* se expresaba durante todo el periodo de floración, localizándose la expresión en tejidos donde podría estar modulando la actividad del meristemo inflorescente e interactuando con la señal derivada de las semillas.

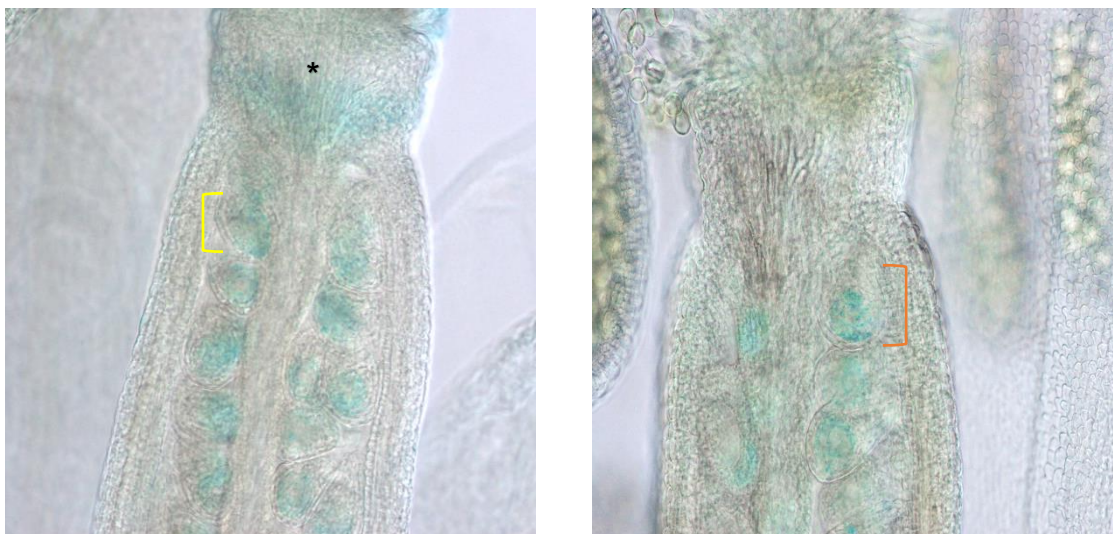


Figura 12: Patrón de expresión de la línea reportera *pSVP:GUS:GFP* en semillas. A. Fruto en pre-antesis. B. Fruto en post-antesis. El corchete amarillo indica la expresión en el óvulo. El corchete naranja indica la expresión de las semillas. El asterisco marca la expresión en la zona del estilo.

5.3. Análisis de expresión de genes clave para el control del final de la floración en el mutante *svp-32*

Para comprender mejor los mecanismos moleculares que determinan el efecto ejercido por *SVP* en el control del final de la floración, además de la menor producción de flores observada en el mutante *svp-32*, se decidió estudiar la expresión génica de varios de los genes involucrados en el control de este proceso, los componentes de la ruta *FUL-AP2* (Balanzà et al., 2018), así como dianas ya descritas de *SVP* que participan en este proceso, como *FT* y los diferentes *miR172* (Balanzà et al., 2018; O'Maoiléidigh et al., 2021; Sánchez Matilla, 2022).

Nuestro análisis fenotípico indicaba un papel regulador de *SVP* en el final de la floración (temporal) y en algunas condiciones de crecimiento, sobre la actividad (tasa de producción). Además, también habíamos detectado una posible interacción con la señal derivada de las semillas. Por otro lado, nuestro análisis de expresión mostró un patrón dinámico y no exclusivo del meristemo. La señal en el meristemo podría relacionarse directamente con la función de *SVP* en este tejido, pero la señal detectada en tallo/pedicelo y semilla podría relacionarse con la posible relación de *SVP* con la señal derivada de semillas.

Con estas premisas, se decidió recolectar muestras a 2 semanas tras el *bolting* del mutante *svp-32* y el ecotipo silvestre *Col-0*. Se eligió este tiempo porque se ha descrito que una semana antes de la parada proliferativa del meristemo es cuando se inician los cambios moleculares que desencadenan la parada (Merelo et al., 2022). Las muestras recogidas fueron de SAM (meristemos diseccionados incluyen una pequeña porción de tallo), tallo, flores en antesis y frutos de dos días tras polinización.

Los genes que se analizaron fueron *AP2* y *FUL*, por su papel directo de represión e inducción del final de la floración respectivamente. También se evaluó *FT* por su relación con *SVP* y su papel como promotor del final de la floración. Por último, se evaluó también la expresión del *miR172a*, el *miR172b*, el *miR172c* y el *miR172d* por su relación con *AP2*. De esta lista inicial, se eliminó el *miR172c* ya que al testar los oligos diseñados mostraron una baja especificidad.

Al analizar las muestras de SAM se observaron cambios significativos en la expresión de dos de los *miR172*, el *a* y el *d*, y en los niveles de *FT* (Figura 13A).

El papel represor de *SVP* sobre el *miR172a* se ha descrito previamente durante la transición floral. Además, *SVP* ejerce esta represión mediante su unión directa con el promotor del *miR172a* (Cho et al., 2012). Interesantemente esta represión no se ha descrito previamente para otros miembros de esta familia de *miRNA*, pero nuestros datos sugieren que esta represión por *SVP* también se podría ejercer sobre el *miR172d*, cuya actividad se ha relacionado directamente con el control del tamaño del meristemo inflorescente (Lian et al., 2021).

El *miR172b* no mostró cambios significativos, sugiriendo que sus niveles no dependerían de *SVP* en esta etapa del desarrollo.

Los resultados obtenidos para *FT* confirman el papel represor de *SVP* sobre este gen ya descrito durante la transición floral (Jang et al., 2009; Li et al., 2008).

A pesar de los cambios observados en la expresión de los *miR172a* y *d*, no se apreciaron cambios significativos en los niveles de expresión de *AP2* y *FUL*, genes clave en el control del final de la floración. Este resultado sugería que *SVP* actuaría de forma independiente de *FUL*, aunque no podemos afirmar lo mismo respecto a *AP2*. Puesto que los *miR172* son reguladores específicos de los genes *AP2* esperaríamos ver algún cambio en su expresión, aunque no es necesario que esto ocurra para regularlos. Aunque el primer mecanismo descrito en la regulación por *miRNA* en plantas fue la degradación de su mensajero se ha comprobado que además existe un potente mecanismo de inhibición de la traducción ejercido por el *miR172* sobre *AP2* (Chen, 2004; Aukerman y Sakai, 2003), que se traduciría en unos bajos niveles de proteína no detectable con las técnicas utilizadas en este TFM.

Por otro lado, los análisis de expresión de estos genes en el resto de tejidos seleccionados (tallos, flores y frutos) no dieron resultados significativos para ninguno de estos genes (Figura 13B, 13C, 13D).

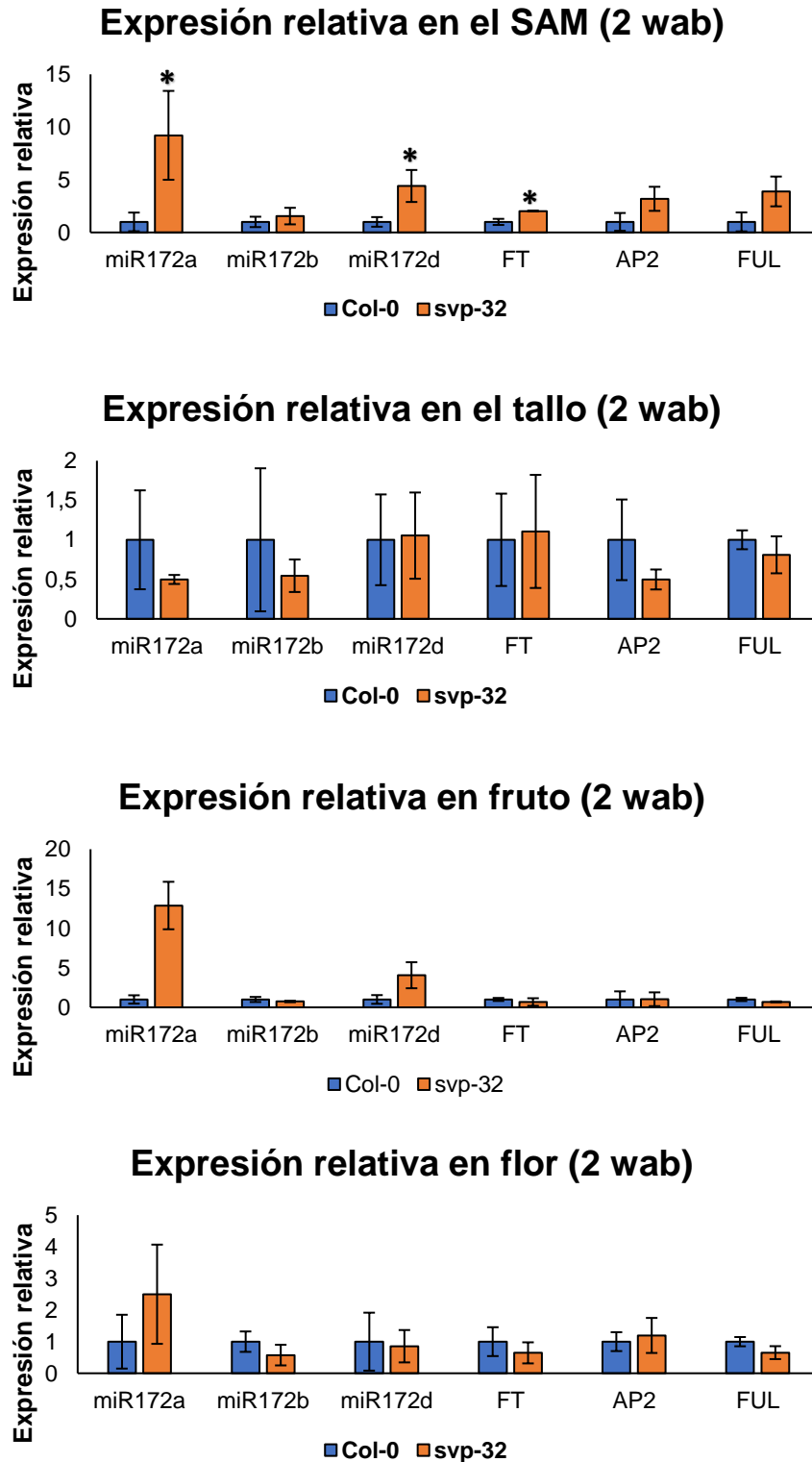


Figura 13: Niveles de expresión relativos en *miR172a*, *miR172b*, *miR172d*, *FT*, *AP2* y *FUL* en el SAM, tallo, flor y fruto 2 semanas después del bolting (2 wab). El nivel de expresión de cada gen está normalizado con respecto a la expresión del gen constitutivo *At1g13320* usando 3 réplicas biológicas (experimentos independientes). Por cada réplica biológica se realizaron tres réplicas técnicas. Se realizó un análisis t-student para medir la significancia estadística de las muestras.

5.4. Generación de herramientas moleculares para estudiar el papel de SVP en el control del final de la floración

El incremento de expresión detectado de algunos *miR172* en el SAM en ausencia de *SVP*, sugiere que existe una regulación negativa de *SVP* sobre estos genes y que además esta regulación podría tener un papel en el control del final de la floración. La hipótesis que nos planteamos fue que, en ausencia de *SVP*, se produciría una desregulación de los *miR172* afectando a los niveles de la proteína *AP2* y por tanto, al final de la floración. Para poder demostrar esta interacción a nivel genético, se precisaba la generación de combinaciones mutantes de *svp* con los diferentes mutantes de los *miR172* y analizar su relación y dependencia, permitiendo conocer si existe alguna relación de epistasia entre ellos. El resultado esperado sería que en ausencia de *SVP* y del *miR172* aumentasen mucho los niveles de *AP2*, produciéndose un retraso notable en el momento del GPA. Puesto que en *Arabidopsis* existen 5 locus que codifican el *miR172* y la generación de mutantes hécuples es muy laboriosa, se decidió adoptar un abordaje más directo aprovechando la disponibilidad en el laboratorio de diferentes combinaciones mutantes para el *miR172*. Con este propósito, se diseñó una construcción para generar una delección en el gen *SVP* que diese lugar a alelos nulos (Figura 14).

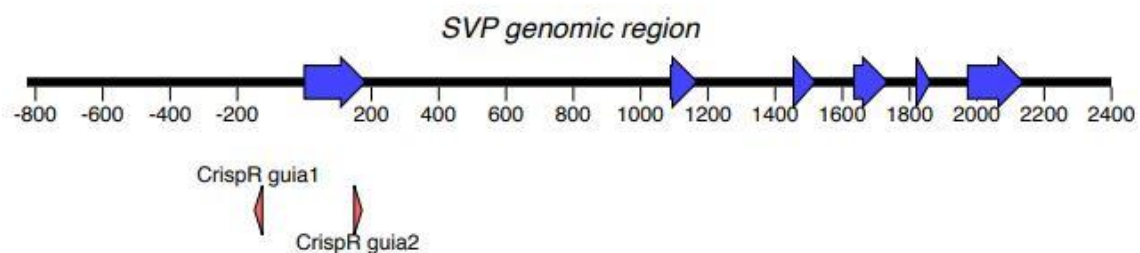


Figura 14: Secuencia genómica de *SVP* donde se ha introducido la delección mediante los *gRNA*. En la parte inferior de la figura se muestra en rojo la posición de las dos guías

Para esta construcción se usó el método de clonación Golden Gate (GG) y se siguió el protocolo descrito por Wang et al. (2015). Para introducir la delección se diseñaron dos guías de *gRNA* que se introdujeron en el plásmido *pHEE401*. Este plásmido contiene el promotor *U6* específico de célula huevo y también las secuencias necesarias para activar a la *Cas9*. El promotor de la célula huevo, permite que se produzca la expresión del cassette con la delección en estadios tempranos del desarrollo embrionario, obteniendo líneas transgénicas homocigotas para los genes editados en la primera generación y con bastante eficiencia. La construcción final consta también de terminadores adecuados para una mayor eficiencia en la transformación y una secuencia scaffold de las *gRNA* (Figura 15).

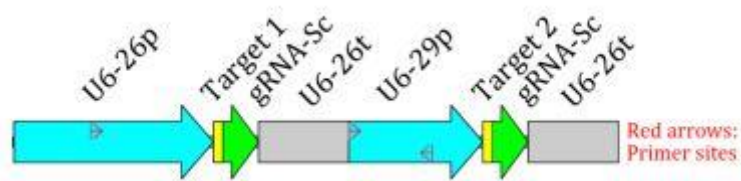


Figura 15: Esquema de la construcción generada para la obtención de mutantes nulos de *SVP*. En azul se indica el promotor de célula huevo U6, en amarillo las dianas de corte, en verde el scaffold de las gRNA y en gris el terminador. Las flechas rojas corresponden a la posición de los cebadores utilizados para verificar el inserto mediante la PCR de colonias y secuenciación.

Las líneas transformadas con esta construcción, fueron los mutantes de pérdida de función *mir172ab*, *mir172cd*, *miR172abd*, *mir172e* y *mir172Q*. Se escogieron estos mutantes de los miembros de la familia de *miR172* en base a diferentes características. Se ha descrito que el mutante *mir172ab* tiene un efecto muy pronunciado en el tiempo de floración, mientras que el mutante *mir172cd* afecta al tamaño del SAM y el meristemo floral. El mutante *mir172abd* combina el efecto de los dos anteriores, por lo que se decidió transformar las 3 líneas mutantes. Por otro lado, se desconoce bastante acerca de las funciones y regulación del *mir172e*, por lo que también se decidió realizar su transformación para observar su comportamiento. Por último, se decidió transformar el quintuple mutante del *miR172* para comprobar el efecto que se producía en ausencia de *SVP* y en ausencia total de los *miR172*.

Desafortunadamente, la falta de tiempo en este trabajo, ha impedido la selección de líneas editadas. Sin embargo, se han generado stocks de semillas transformadas que permitirán esta selección en un futuro.

6. Discusión

El final de la floración y los mecanismos implicados en este proceso no han sido tan ampliamente estudiados como la transición floral y otros procesos del desarrollo. A pesar de ello, el potencial biotecnológico que tiene el control del final de la floración puede llevar a mejoras muy sustanciales en la productividad agrícola y en la rentabilidad de los cultivos.

Trabajos recientes sobre los factores implicados en este proceso, han permitido abrir nuevas vías de estudio para continuar desentrañando los mecanismos que gobiernan el final de la floración. Uno de estos trabajos es el descubrimiento de la ruta *FUL-AP2*, que controla la actividad del meristemo de una manera dependiente de la edad (Balanzà et al., 2018). Por otro lado, sigue sin conocerse la identidad de la señal móvil procedente de las semillas que actúa regulando la actividad del meristemo (Leopold, 1961; Noodén et al., 2004; Wuest et al., 2016), aunque se han propuesto a las auxinas y como posible candidato (Ware et al., 2020). Además, tampoco se ha descrito de qué manera interactúa esta señal derivada de las semillas con la ruta *FUL-AP2*.

En el presente trabajo se ha identificado el papel del factor de transcripción *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* como represor del final de la floración, posiblemente promoviendo la actividad del meristemo inflorescente. En condiciones de día largo, el mutante *svp-32* produjo un 55% menos flores que las plantas control, debido principalmente a una parada temprana de la actividad del meristemo (periodo de floración significativamente más corto). El acortamiento del periodo de floración se observó en todos los experimentos realizados, indicando que esta función de *SVP* no dependería de las condiciones de crecimiento. Este papel concuerda perfectamente con la función descrita para *SVP* como promotor de *WUS* (Zeng et al., 2021), por lo que la ausencia de *SVP* provocaría niveles bajos de este gen clave en el mantenimiento del meristemo dirigiendo su parada.

El papel de *SVP* como integrador de señales ambientales en la transición floral está ampliamente descrito (Capovilla et al., 2015; Wang et al., 2018; Zeng et al., 2021). Los experimentos realizados en este TFM han mostrado que la luz roja puede modificar la actividad del meristemo, aunque aparentemente no afecte al periodo de floración. Los resultados que se obtuvieron de las plantas expuestas a luz con ratio R/FR-5 mostraron un aumento en el número total de flores que se correlacionaba con un aumento en la tasa de producción de flores y no con una extensión del periodo de floración. Una mayor producción de flores se suele asociar con incrementos en el tamaño del meristemo (Serrano-Mislata et al. 2017; Kitagawa y Jackson, 2019), que se asocian a mayores niveles de *WUS* y una mayor disponibilidad de espacio y células para generar nuevos primordios. En ausencia de *SVP*, el aumento de la tasa de producción fue más pronunciado que en las plantas control, sugiriendo que *SVP* podría estar modulando la respuesta del meristemo a la exposición a luz roja. Sería interesante analizar si la exposición a altos ratios R/FR induce meristemas más grandes (por ejemplo, mediante *confocal live imaging*) y si esta respuesta estuviera regulada de algún modo por *SVP*. De comprobarse, implicaría una capacidad dual de *SVP* en el control de la actividad meristemática, por un lado, promoviendo los niveles de *WUS* al final de la floración, y por otro reprimiendo la señalización de la luz roja que supuestamente activaría a *WUS*.

Los resultados obtenidos en día corto, sugerían que el fotoperiodo tendría un efecto sobre la actividad del meristemo, disminuyendo la tasa de producción de flores y

retrasando el final de la floración. Sorprendentemente, el mutante *svp* presentaba una tasa de producción de flores altísima, sugiriendo un papel relevante de *SVP* en el control de la actividad del meristemo. Nuestros análisis posteriores buscando respuesta al efecto de la biomasa en la producción de flores finales, negaron estas conclusiones. Lo que observamos en condiciones de día corto parecía estar asociado más con un factor relativo a la edad de la planta que con el régimen lumínico aplicado, ya que plantas crecidas en condiciones de SD durante un tiempo prolongado (35 días) y transferidas a condiciones de LD, se comportaban como las plantas que permanecían en SD. Esta observación sugiere que la respuesta asociada a las condiciones de día corto originalmente, responden a otro factor, ya que se mantenían en condiciones de LD. Aunque no se han realizado estudios de expresión en día corto, los datos obtenidos en día largo apoyan la regulación de los *miR172a* y *d* por *SVP*, componentes de un mecanismo de respuesta dependiente de la edad. La relación entre *SVP* y los *miR172* no explicaría *per se* el fuerte incremento en la tasa de producción observado en SD. El estudio detallado de esta ruta mediada por el equilibrio *mir172/miR156* y sus dianas (Gu et al., 2009) en día corto, podría arrojar luz sobre los fenotipos observados. Por otro lado, se ha descrito que, bajo condiciones de día corto, las giberelinas aceleran la floración en el SAM activando la transcripción de genes como *LEAFY*, *FUL*, *SOC1* y *SPLs* (Blázquez et al., 1998; Moon et al., 2003; Yu et al., 2012). De igual modo, durante la fase vegetativa, *SVP* modula la síntesis de las GAs ejerciendo una acción represora sobre el gen de biosíntesis de giberelinas *GIBBERELLIN 20 OXIDASE 2* en el SAM (Andrés et al., 2014). En base a esta información, cabe la posibilidad de que las giberelinas puedan tener efecto sobre la capacidad proliferativa del meristemo en día corto, explicando que en ausencia de *SVP* el meristemo produce una mayor tasa de flores. De acuerdo con este razonamiento, se ha descrito que las proteínas DELLA, que se degradan en presencia de giberelinas, restringen el tamaño del meristemo (Serrano-Mislata et al. 2017).

La función descrita para *SVP* en la transición floral es prolongar etapas de la fase vegetativa para conseguir la energía y la materia orgánica necesaria (Hartmann et al., 2000). *Arabidopsis*, es una planta facultativa de día largo, y cuando crece el día corto, su periodo de floración se retrasa y se extiende (Koornneef et al., 1991). Esto va asociado al incremento en el número de hojas que produce. Así mismo, las plantas del mutante *svp* producen un número más reducido de hojas en día largo (Balanzà et al., 2014). La caracterización de la producción de flores en plantas pasadas de día corto a día largo permitió descartar que la reducción en la tasa de producción de flores experimentada en ausencia de *SVP* fuese debida a la biomasa de la planta. Además, este efecto también se observó en las plantas silvestres, confirmando que el desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis* es independiente de la biomasa desarrollada por la planta.

Nuestros datos también sugieren que *SVP* pudiera regular o participar de algún modo en la señal derivada de las semillas. Nuestro análisis de expresión indica que *SVP* podría estar presente en semillas, pedicelos y tallo. Desde estos tejidos podría afectar de algún modo esta señalización. Por ejemplo, la presencia de *SVP* en semillas, podría indicar que fuese un regulador de esta señal. A su vez, la presencia de *SVP* en la base de los pedicelos y el tallo, podría sugerir un papel modulador del movimiento de esta señal hacia el SAM. Si *SVP* ejerciera su efecto en las semillas para controlar la actividad final del SAM, hipotéticamente lo haría reprimiendo esta señalización, haciendo que el meristemo estuviera activo más tiempo y en el mutante tendríamos un efecto opuesto, deteniendo el meristemo antes que en plantas silvestres, como se observa en nuestros experimentos. Nuestros experimentos de poda descartan esta posibilidad, ya que, en

ausencia de semillas, y por tanto de señal, el mutante *svp* sigue parando antes, indicando una situación diferente. De acuerdo con este razonamiento, al analizar la expresión de *FT*, propuesto como un componente de esta señal por nuestro laboratorio (Sanchez-Matilla, 2022), no se aprecian cambios en sus niveles de expresión en el mutante *svp*. Los *miR172* también podrían formar parte de esta señal derivada de las semillas, ya que se han identificado como moléculas móviles (Kasai et al., 2010). Del mismo modo que ocurría con *FT*, tampoco se detectaron cambios significativos en estos tejidos. Por otro lado, nuestros datos de expresión sí que indican un efecto de *SVP* en el SAM, donde los niveles de *miR172a*, *miR172d* y *FT* se muestran elevados en el mutante *svp*. Tras estas observaciones, nuestros datos indican que posiblemente *SVP* interactúe con la señal derivada de las semillas a nivel de meristemo.

Como hemos comentado, nuestros datos apuntan a que *SVP* regula el final de la floración a nivel del SAM y lo hace a través de la represión de los *miR172a* y *d* y *FT*.

Recientemente se ha descrito que el módulo regulador formado por *miR172/AP2* controla el tamaño del meristemo inflorescente durante la transición floral (Sang et al., 2022). De acuerdo con el mecanismo propuesto, el *miR172* controla los niveles de *AP2* para controlar el tamaño del meristemo durante la transición floral, asegurando que adquiera unas dimensiones adecuadas para sustentar el desarrollo de los nuevos órganos. Mutantes afectados en los genes que codifican el *miR172* o alelos de *AP2* resistentes al *miR172*, desarrollan meristemos mucho más grandes que los observados en plantas silvestres y que producen más flores (Sang et al., 2022). Además, también se ha descrito que *SVP* ejerce un papel represor sobre algunos *miR172* durante la transición floral (Cho et al., 2012).

Nuestros resultados indican que estos mecanismos descritos durante la transición floral también actúan durante el desarrollo de la inflorescencia y, además, controlan el final de la floración. En meristemos de 2 semanas confirmamos que, en ausencia de *SVP*, la expresión de dos de los *miR172* (*miR172a* y *miR172d*) se veía incrementada, apoyando esta idea. La expresión de *FT* también fue más alta en ausencia de *SVP*, tal y como se esperaba. No obstante, no se observaron cambios en los niveles de *AP2* y *FUL*. Ante la subida de los niveles de los *miR172* deberíamos esperar un efecto en los niveles de *AP2*, aunque no necesariamente a nivel transcriptómico. Ya que el *miR172* puede regular a sus dianas mediante distintos mecanismos de regulación postranscripcional (Aukerman y Sakai, 2003; Chen, 2004) podríamos tener una menor acumulación de proteína. De hecho, en nuestros meristemos se observa una tendencia al alza de los niveles de *AP2* (no significativa) que podría relacionarse a una menor acumulación de *AP2* ya que es capaz de auto reprimirse (Yant et al., 2010). Además, la represión que ejercen los *miR172*, también se puede estar produciendo sobre otros miembros de la familia de *AP2*, sobre los que se ha descrito que también actúa (Jung et al., 2011; Wang et al., 2009; Wu et al., 2009) y que también participan en el final de la floración (Balanzà et al., 2018). De una forma similar, también esperábamos un incremento en los niveles de expresión de *FUL*, debido a la subida observada en *FT*. De nuevo, nuestros datos reflejan cierta tendencia al alza de los niveles de *FUL* en el mutante *svp* (de nuevo no significativa) sugiriendo una respuesta al incremento en *FT*. Una posible explicación para los datos que hemos observado, podría ser que hubiésemos anticipado en exceso el momento de la toma de muestras, capturando un momento previo al inicio del final de la floración. En esta línea, sería interesante repetir estos análisis en una serie temporal que comprendiera todo el proceso, por ejemplo, muestreando a semana 2, semana 2,5 y semana 3. Por último, *FT* además es capaz de activar de manera indirecta la expresión de los *miR172* (Mathieu et al., 2009; Song et al., 2013).

Como conclusión, podemos proponer un modelo que integraría la función de *SVP* en el control del final de la floración con la ruta *FUL-AP2*. *SVP* estaría modulando los niveles de esta ruta central a través de la regulación del *miR172*, que modula a *AP2*, y *FT*, que modularía a *FUL*. De este modo, en ausencia de *SVP*, se produciría una desregulación de los *miR172* y *FT*, que aumentarían sus niveles reprimiendo la expresión de *AP2* y aumentando la de *FUL*, acelerando el momento de la parada del meristemo.

Debido a las limitaciones de tiempo en este trabajo, no se pudieron analizar las líneas transgénicas editadas de *SVP* mediante CRISPR/Cas9. Estas líneas, que proporcionarían la combinación genética de un mutante nulo de *svp* con diferentes combinaciones de mutantes en el *miR172* (desde dobles a héxuples mutantes), nos permitirán comprobar si parte de las hipótesis propuestas en este trabajo son ciertas, analizando la dependencia existente entre *SVP* y los diferentes *miR172*.

7. Referencias Bibliográficas

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., ... y Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309(5737), 1052-1056. <https://doi.org/10.1126/science.1115983>
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301: 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>
- Amasino, R. M., y Michaels, S. D. (2010). The timing of flowering. *Plant Physiology*, 154(2), 516-520. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161653>
- Andrés, F., Porri, A., Torti, S., Mateos, J., Romera-Branchat, M., García-Martínez, J. L., ... y Coupland, G. (2014). SHORT VEGETATIVE PHASE reduces gibberellin biosynthesis at the Arabidopsis shoot apex to regulate the floral transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(26), E2760-E2769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409567111>
- Aukerman, M. J., y Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, 15(11), 2730-2741. <https://doi.org/10.1105/tpc.016238>
- Balanzà, V., Ballester, P., Colombo, M., Fourquin, C., Martínez-Fernández, I., y Ferrándiz, C. (2014). Genetic and phenotypic analyses of carpel development in *Arabidopsis*. *Flower Development*, 231-249. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9408-9_11
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kaufmann, K., Angenent, G. C., ... y Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nature communications*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03067-5>
- Bielenberg, D. G., Wang, Y. E., Li, Z., Zhebentyayeva, T., Fan, S., Reighard, G. L., ... y Abbott, A. G. (2008). Sequencing and annotation of the evergrowing locus in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] reveals a cluster of six MADS-box transcription factors as candidate genes for regulation of terminal bud formation. *Tree Genetics & Genomes*, 4(3), 495-507. <https://doi.org/10.1007/s11295-007-0126-9>
- Blázquez, M. A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M. R., y Weigel, D. (1998). Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *The Plant Cell*, 10(5), 791-800. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.5.791>
- Blázquez, M., Koornneef, M., y Putterill, J. (2001). Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO reports*, 2(12), 1078-1082. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve254>
- Capovilla, G., Schmid, M., y Posé, D. (2015). Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*, 66(1), 59-69. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru416>
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, 303(5666), 2022-2025. <https://doi.org/10.1126/science.1088060>
- Cho, H. J., Kim, J. J., Lee, J. H., Kim, W., Jung, J. H., Park, C. M., & Ahn, J. H. (2012). SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 586(16), 2332-2337. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.035>
- Conti, L. (2017). Hormonal control of the floral transition: can one catch them all? *Developmental Biology*, 430(2), 288-301. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.024>
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... y Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316(5827), 1030-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1141752>

- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., ... y Périlleux, C. (2011).** Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant Journal*, 65(6), 972-979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04482.x>
- Demotes-Mainard, S., Péron, T., Corot, A., Bertheloot, J., Le Gourrierec, J., Pelleschi-Travier, S., ... y Sakr, S. (2016).** Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 4-21. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
- Eskins, K. (1992).** Light-quality effects on *Arabidopsis* development. Red, blue and far-red regulation of flowering and morphology. *Physiologia Plantarum*, 86(3), 439-444. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb01341.x>
- Goetz, M., Rabinovich, M., y Smith, H. M. (2021).** The role of auxin and sugar signaling in dominance inhibition of inflorescence growth by fruit load. *Plant Physiology*, 187(3), 1189-1201. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab237>
- González-Suárez, P., Walker, C. H., y Bennett, T. (2020).** Bloom and bust: understanding the nature and regulation of the end of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, 57, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.05.009>
- Gregis, V., Sessa, A., Dorca-Fornell, C., y Kater, M. M. (2009).** The *Arabidopsis* floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. *The Plant Journal*, 60(4), 626-637. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03985.x>
- Hartmann, U., Höhmann, S., Nettesheim, K., Wisman, E., Saedler, H., y Huijser, P. (2000).** Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 21(4), 351-360. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00682.x>
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A., y Bleecker, A. B. (1994).** The fate of inflorescence meristems is controlled by developing fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 106(3), 863-876. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.863>
- Huang, Z., Shi, T., Zheng, B., Yumul, R. E., Liu, X., You, C., ... y Chen, X. (2017).** APETALA 2 antagonizes the transcriptional activity of AGAMOUS in regulating floral stem cells in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 215(3), 1197-1209. <https://doi.org/10.1111/nph.14151>
- Jang, S., Torti, S., y Coupland, G. (2009).** Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 60(4), 614-625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03986.x>
- Jung, J. H., Seo, P. J., Kang, S. K., y Park, C. M. (2011).** miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, 76(1-2), 35-45. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9759-z>
- Kasai, A., Kanehira, A., y Harada, T. (2010).** miR172 can move long distances in *Nicotiana benthamiana*. *The Open Plant Science Journal*, 4(1).
- Kaur, C., Lim, Y. P., y Lee, G. J. (2022).** Co-ordinated responses to endogenous and environmental triggers allow a well-timed floral transition in plants. *Plant Biotechnology Reports*, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00731-z>
- Kelly, M. O., Davies, P. J., y Woolhouse, H. W. (1988).** The control of whole plant senescence. *Critical reviews in plant sciences*, 7(2), 139-173. <https://doi.org/10.1080/07352688809382262>
- Kiefer, C., Bergonzi, S., Brand, L., Wötzel, S., y Koch, M. A. (2018).** Contrasting Life History Traits in Monocarpic Versus Polycarpic Plants from a Molecular-Evolutionary Point of View. *Annual Plant Reviews online*, 479-504. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0695>
- Kim, D. H., Doyle, M. R., Sung, S., y Amasino, R. M. (2009).** Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 277-299. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113411>
- Kitagawa, M., y Jackson, D. (2019).** Control of meristem size. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 269-291. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040549>

- Koornneef, M., Hanhart, C. J., y Van der Veen, J. H. (1991).** A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 229(1), 57-66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., ... y Shinozaki, K. (2010).** ABC transporter *AtABCG25* is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), 2361-2366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912516107>
- Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Park, O. K., Lee, J., y Ahn, J. H. (2006).** Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of *Constans 1*. *Physiologia Plantarum*, 126, 475–483. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00619.x>
- Leopold, AC. (1961)** Senescence in plant development. *Science*, 134: 1727-1732. <https://doi.org/10.1126/science.134.3492.1727>
- Li, C., Gu, L., Gao, L., Chen, C., Wei, C. Q., Qiu, Q., ... y Cui, Y. (2016).** Concerted genomic targeting of H3K27 demethylase REF6 and chromatin-remodeling ATPase BRM in *Arabidopsis*. *Nature genetics*, 48(6), 687-693. <https://doi.org/10.1038/ng.3555>
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., ... y Yu, H. (2008).** A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental cell*, 15(1), 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.002>
- Lian, H., Wang, L., Ma, N., Zhou, C. M., Han, L., Zhang, T. Q., & Wang, J. W. (2021).** Redundant and specific roles of individual *MIR172* genes in plant development. *PLoS Biology*, 19(2), e3001044. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001044>
- Martínez-Fernández, I., Menezes de Moura, S., Alves-Ferreira, M., Ferrándiz, C., y Balanzà, V. (2020).** Identification of Players Controlling Meristem Arrest downstream of the *FRUITFULL-APETALA2* pathway. *Plant Physiology*, 184(2), 945-959. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00800>
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., y Schmid, M. (2009).** Repression of flowering by the *miR172* target SMZ. *PLoS biology*, 7(7), e1000148. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000148>
- Merelo, P., González-Cuadra, I., y Ferrándiz, C. (2022).** A cellular analysis of meristem activity at the end of flowering points to cytokinin as a major regulator of proliferative arrest in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 32(4), 749-762. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.069>
- Michaels, S. D., y Amasino, R. M. (2001).** Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant Cell*, 13(4), 935-941. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.4.935>
- Moghaddam, M. R. B., y Ende, W. V. D. (2013).** Sugars, the clock and transition to flowering. *Frontiers in Plant Science*, 4, 22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00022>
- Molisch, H. (1938).** The Longevity of Plants. Authorized English Edition by E. Fulling. *The Science Press Printing Company*, Lancaster, PA
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., ... y Lee, I. (2003).** The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 35(5), 613-623. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01833.x>
- Noodén, L. D., Guiamét, J. J., y John, I. (2004).** Whole plant senescence. In *Plant cell death processes* (pp. 227-244). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012520915-1/50018-7>
- Ó'Maoiléidigh, D. S., van Driel, A. D., Singh, A., Sang, Q., Le Bec, N., Vincent, C., ... y Coupland, G. (2021).** Systematic analyses of the *MIR172* family members of *Arabidopsis* define their distinct roles in regulation of *APETALA2* during floral transition. *PLoS Biology*, 19(2), e3001043. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001043>
- Ohto, M. A., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., y Nakamura, K. (2001).** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127(1), 252-261. <https://doi.org/10.1104/pp.127.1.252>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (s.f.).** Desafíos Globales: Población. Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/global->

[issues/population#:~:text=Se%20estima%20que%20la%20poblaci3n,millones%20para%20media dos%20de%202080.](#)

- Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Alimentaci3n y la Agricultura (FAO). (s.f.).** Cambio Clim3tico y Seguridad Alimentaria. Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/climatechange/16615-05a3a6593f26eaf91b35b0f0a320cc22e.pdf>
- Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Alimentaci3n y la Agricultura (FAO). (2015).** FAO - Noticias: Los suelos est3n en peligro, pero la degradaci3n puede revertirse. Home | Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/news/story/es/item/357165/icode/>
- Organizaci3n de las Naciones Unidas para la Alimentaci3n y la Agricultura (FAO). (2017).** El Futuro de la Alimentaci3n y la Agricultura. Tendencias y Desaf3os (Informe de la FAO I6881ES/1/02.17). <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- Rold3n, M., G3mez-Mena, C., Ruiz-Garc3a, L., Salinas, J., y Mart3nez-Zapater, J. M. (1999).** Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Journal*, 20(5), 581-590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00632.x>
- Rolland, F., Moore, B., y Sheen, J. (2002).** Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14(suppl_1), S185-S205. <https://doi.org/10.1105/tpc.010455>
- S3nchez Matilla, J. M. (2022).** Caracterizaci3n de FLOWERING LOCUS T (FT) y otros integradores de la transici3n floral como elementos reguladores del final de la floraci3n.
- Sang, Q., Vayssi3res, A., 3'Maoil3idigh, D. S., Yang, X., Vincent, C., Bertran Garcia de Olalla, E., ... y Coupland, G. (2022).** MicroRNA172 controls inflorescence meristem size through regulation of APETALA2 in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.18111>
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kr3ber, S., ... y Coupland, G. (2006).** The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 20(7), 898-912. <https://doi.org/10.1101/gad.373506>
- Seo, P. J., Ryu, J., Kang, S. K., y Park, C. M. (2011).** Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 65(3), 418-429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04432.x>
- Serrano-Mislata, A., Bencivenga, S., Bush, M., Schiessl, K., Boden, S., y Sablowski, R. (2017).** DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height. *Nature plants*, 3(9), 749-754. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0003-y>
- Song, Y. H., Ito, S., y Imaizumi, T. (2013).** Flowering time regulation: photoperiod-and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science*, 18(10), 575-583. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.003>
- Susila, H., Nasim, Z., y Ahn, J. H. (2018).** Ambient temperature-responsive mechanisms coordinate regulation of flowering time. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3196. <https://doi.org/10.3390/ijms19103196>
- Teper-Bamnlker, P., y Samach, A. (2005).** The flowering integrator FT regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Cell*, 17(10), 2661-2675. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035766>
- Tsai, A. Y. L., y Gazzarrini, S. (2012).** *AKIN10* and *FUSCA3* interact to control lateral organ development and phase transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(5), 809-821. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04832.x>
- Tylewicz, S., Tsuji, H., Miskolczi, P., Petterle, A., Azeez, A., Jonsson, K., ... y Bhalerao, R. P. (2015).** Dual role of tree florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(10), 3140-3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423440112>
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., ... y Schmid, M. (2013).** Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339(6120), 704-707. <https://doi.org/10.1126/science.1230406>

- Walker, C. H., y Bennett, T. (2018).** Forbidden fruit: dominance relationships and the control of shoot architecture. *Annual Plant Reviews*. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0640>
- Wang, J. W., Czech, B., y Weigel, D. (2009).** *miR156*-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138(4), 738-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>
- Wang, Y., Shirakawa, M., y Ito, T. (2022).** Arrest, Senescence, and Death of Shoot Apical Stem Cells in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac155>
- Wang, Z. P., Xing, H. L., Dong, L., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Wang, X. C., y Chen, Q. J. (2015).** Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome biology*, 16(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>
- Wang, Z., Wang, F., Hong, Y., Yao, J., Ren, Z., Shi, H., y Zhu, J. K. (2018).** The flowering repressor SVP confers drought resistance in *Arabidopsis* by regulating abscisic acid catabolism. *Molecular Plant*, 11(9), 1184-1197. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.06.009>
- Ware, A., Walker, C. H., Šimura, J., González-Suárez, P., Ljung, K., Bishopp, A., ... y Bennett, T. (2020).** Auxin export from proximal fruits drives arrest in temporally competent inflorescences. *Nature Plants*, 6(6), 699-707. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0661-z>
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J. W., Weigel, D., y Poethig, R. S. (2009).** The sequential action of *miR156* and *miR172* regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138(4), 750-759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>
- Wu, R., Tomes, S., Karunairetnam, S., Tustin, S. D., Hellens, R. P., Allan, A. C., ... y Varkonyi-Gasic, E. (2017).** SVP-like MADS box genes control dormancy and budbreak in apple. *Frontiers in Plant Science*, 8, 477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00477>
- Wuest, S. E., Philipp, M. A., Guthörl, D., Schmid, B., y Grossniklaus, U. (2016).** Seed production affects maternal growth and senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 171(1), 392-404. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01995>
- Würschum, T., Groß-Hardt, R., y Laux, T. (2006).** *APETALA2* regulates the stem cell niche in the *Arabidopsis* shoot meristem. *The Plant Cell*, 18(2), 295-307. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038398>
- Yamaguchi, A., Wu, M. F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R. S., y Wagner, D. (2009).** The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor SPL3 is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Developmental Cell*, 17(2), 268-278. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.007>
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., ... y Schmid, M. (2010).** Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *The Plant Cell*, 22(7), 2156-2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., ... & Ahn, J. H. (2005).** *CONSTANS* activates suppressor of overexpression of *constans 1* through *Flowering Locus T* to promote flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139(2), 770-778. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066928>
- Yu, S., Galvão, V. C., Zhang, Y. C., Horrer, D., Zhang, T. Q., Hao, Y. H., ... y Wang, J. W. (2012).** Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through *miR156*-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *The Plant Cell*, 24(8), 3320-3332. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.101014>
- Zeng, J., Li, X., Ge, Q., Dong, Z., Luo, L., Tian, Z., & Zhao, Z. (2021).** Endogenous stress-related signal directs shoot stem cell fate in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Plants*, 7(9), 1276-1287. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00985-z>
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T., y Chen, X. (2007).** *miR172* regulates stem cell fate and defines the inner boundary of *APETALA3* and *PISTILLATA* expression domain in *Arabidopsis* floral meristems. *The Plant Journal*, 51(5), 840-849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03181.x>

Anexo 1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				✓
ODS 2. Hambre cero.	✓			
ODS 3. Salud y bienestar.				✓
ODS 4. Educación de calidad.				✓
ODS 5. Igualdad de género.				✓
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				✓
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				✓
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				✓
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				✓
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				✓
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				✓
ODS 12. Producción y consumo responsables.		✓		
ODS 13. Acción por el clima.	✓			✓
ODS 14. Vida submarina.				✓
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				✓
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				✓
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				✓