



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario Mixto de Biología Molecular y  
Celular de Plantas

Análisis de la actividad de la población apical de células  
madre en condiciones de estrés salino

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de  
Plantas

AUTOR/A: Garcia Suarez, Julieta Vanessa

Tutor/a: Vera Sirera, Francisco José

Director/a Experimental: Serrano Mislata, Antonio

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

## RESUMEN

El meristemo apical del tallo (SAM, de “*shoot apical meristem*” en inglés) contiene una población de células madre pluripotentes que son el origen de hojas, flores y tallos. Los patrones de división y diferenciación celular deben estar finamente regulados en el SAM para adaptar el desarrollo de la inflorescencia de la planta a las condiciones ambientales. A pesar de su importancia estratégica, apenas se ha estudiado el impacto del estrés abiótico, en general, y de la salinidad, en particular, en la actividad del SAM. La salinidad es uno de los tipos de estrés más devastadores para los cultivos. Aproximadamente un 10% de las tierras agrícolas a nivel mundial están afectadas por la salinidad, lo que compromete seriamente la seguridad alimentaria

El objetivo principal de este TFM ha sido optimizar las condiciones experimentales para estudiar la actividad del SAM de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) bajo condiciones de estrés salino. De este modo, se analizaron bajo estrés una serie de parámetros indicativos del funcionamiento del SAM, como son la elongación del tallo de la inflorescencia o la producción de flores y frutos. La sal restringió la actividad del SAM y, por tanto, el desarrollo de la inflorescencia. El análisis de líneas testigo fluorescentes indicó que esta restricción podría ser consecuencia de un descenso en los niveles de expresión de reguladores clave de la función meristemática como CLV3, WUS y STM. Por otra parte, se optimizaron también las condiciones experimentales para llevar a cabo estudios de variación natural con los que identificar nuevos reguladores positivos del desarrollo reproductivo en condiciones de salinidad.

**Palabras Clave: Meristemo Apical del tallo (SAM), Arabidopsis, estrés salino.**

## **Abstract**

The shoot apical meristem (SAM) contains a population of pluripotent stem cells that is the origin of leaves, flowers, and stems. Cell division and differentiation patterns must be finely regulated in the SAM to adapt plant inflorescence development to environmental conditions. Despite its strategic importance, the impact of abiotic stress in general, and salinity in particular, on SAM activity has barely been studied. Salinity is one of the most devastating types of stress for crops. Approximately 10% of agricultural land worldwide is affected by salinity, which seriously compromises food security.

The main objective of this TFM was to optimize the experimental conditions to study the SAM activity of the model plant *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) under salt stress conditions. In this way, a number of parameters indicative of SAM activity was analyzed under stress, such as the elongation of the inflorescence stem or the production of flowers and fruits. Salt restricted SAM activity and thus also inflorescence development. The analysis of fluorescent control lines indicated that this restriction could be the result of a decrease in the expression levels of key regulators of meristematic function such as CLV3, WUS and STM. Furthermore, the experimental conditions were optimized for conducting natural variation studies to identify new positive regulators of reproductive development under saline conditions.

**Keywords: Shoot apical meristem, Arabidopsis, salt stress**

ODS



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de TFM el Dr. Antonio Serrano Mislata, por todo su apoyo y confianza, por tener paciencia con mis despistes.

A los compañeros de los laboratorios 2,07 y 2,08 por su ayuda y consejos durante este tiempo.

A mis compañeros del Master por su amistad.

A mis amigos Rosanna y Ángel por su apoyo incondicional.

En especial a mis padres por seguir en el camino conmigo, sin importar la distancia.

<b>INDICE</b>	<b>PAG.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SALINIDAD</b>	<b>1</b>
1.1.1 Percepción y señalización del estrés salino	2
<b>1.2. RESPUESTAS FRENTE AL ESTRÉS SALINO</b>	<b>2</b>
1.2.1. Respuestas fisiológicas	3
1.2.2. Respuestas celulares	3
1.2.3. Respuestas moleculares	3
<b>1.3. RESPUESTAS DEL MERISTEMO APICAL DEL TALLO (SAM) FRENTE AL ESTRÉS SALINO</b>	<b>4</b>
1.3.1. Función y actividad del SAM	4
<b>1.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SAM</b>	<b>5</b>
1.4.1. Sistema WUSCHEL (WUS) / CLAVATA (CLV3)	5
1.4.2. Genes KNOX ( <i>STM</i> y <i>BP</i> )	5
1.4.3. Regulación hormonal (GAs y CKs)	6
<b>1.5. RESPUESTAS GENERALES DE LAS CÉLULAS DEL SAM FRENTE A ESTRÉS ABIÓTICO</b>	<b>6</b>
<b>1.6. RESPUESTAS ESPECÍFICAS DE LAS CÉLULAS DEL SAM FRENTE A ESTRÉS SALINO</b>	<b>7</b>
<b>1.7. ENSAYO DE VARIACIÓN NATURAL (GWAS) PARA IDENTIFICAR NUEVOS REGULADORES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>10</b>
<b>3.1. MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>10</b>
<b>3.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO</b>	<b>10</b>
3.2.1. Análisis de la actividad del SAM en diferentes fondos genéticos	10
3.2.2. Análisis de variación natural en el desarrollo reproductivo	11
<b>3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL SAM.</b>	<b>11</b>
<b>3.4. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE ROSETA</b>	<b>12</b>
<b>3.5. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS</b>	<b>12</b>
<b>3.6. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS</b>	<b>13</b>
<b>3.7. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LÍNEAS TESTIGO FLUORESCENTES EN EL ÁPICE DE LA INFLORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>15</b>
<b>4.1 IMPACTO DE LA SALINIDAD EN EL DESARROLLO DE LA INFLORESCENCIA DE ARABIDOPSIS</b>	<b>15</b>
4.1.1 Optimización de la concentración de sal para llevar a cabo los ensayos	15
4.1.2. Efecto de la mutación <i>erecta</i> en la actividad del SAM bajo estrés salino	17
4.1.3. Efecto de aumentar la temperatura en la actividad del SAM bajo estrés salino	21

<b>4.2. ANÁLISIS CELULAR DE LA ACTIVIDAD DEL SAM EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO</b>	<b>22</b>
4.2.1. Descripción de los ensayos	22
4.2.2. Análisis del tamaño del SAM en condiciones de estrés salino	24
4.2.3. Análisis mediante líneas testigo fluorescentes de la red reguladora CLV3-WUS-STM	25
<b>4.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL SAM de MUTANTES <i>dellaKO</i> y <i>bp</i> EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO</b>	<b>29</b>
<b>4.4. ANÁLISIS DE VARIACIÓN NATURAL EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE ARABIDOPSIS EN RESPUESTA A SALINIDAD</b>	<b>34</b>
4.4.1. Optimización de ensayos	34
4.4.2. Ensayo de variación natural en el desarrollo reproductivo en condiciones de estrés por sal	38
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>PAG.</b>
Figura 1. Representación de las zonas del meristemo apical del tallo (SAM).	5
Figura 2. Esquema de la regulación de la actividad del SAM por los genes <i>WUS</i> , <i>CLV3</i> , <i>STM</i> , <i>BP</i> .	6
Figura 3. Representación esquemática de los diferentes parámetros analizados para estudiar la actividad en el SAM en condiciones de estrés salino.	12
Figura 4. Proyección de intensidad máxima en 3D.	14
Figura 5. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo <i>Ler</i> .	15
Figura 6. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos <i>Ler</i> y <i>Col</i> regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración.	16
Figura 7. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo <i>Ler</i> y <i>Col</i> .	17
Figura 8. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> . Regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración.	18
Figura 9. Altura de la inflorescencia principal de las plantas de los ecotipos <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> .	18
Figura 10. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> .	19
Figura 11. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> .	19
Figura 12. Cuantificación de clorofilas en hojas de roseta de plantas de los ecotipos <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> .	20
Figura 13. Cuantificación de antocianinas en hojas de roseta de plantas de los ecotipos <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> .	20
Figura 14. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos <i>Ler</i> , <i>Col</i> y <i>er-105</i> regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración.	21
Figura 15. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de las líneas testigo <i>CLV3p:GFP(-ER)</i> , <i>WUSp:GFP(-ER)</i> y <i>STMp:STM-VENUS</i> .	22
Figura 16. Altura de la inflorescencia principal de las plantas de las líneas testigo <i>CLV3p:GFP(-ER)</i> , <i>WUSp:GFP(-ER)</i> y <i>STMp:STM-VENUS</i> .	23
Figura 17. Cuantificación de clorofilas en hojas de roseta de plantas de las líneas testigo <i>CLV:p:GFP(-ER)</i> , <i>WUSp:GFP(-ER)</i> y <i>STMp:STM-VENUS</i> .	23
Figura 18. Cuantificación de antocianinas en hojas de roseta de plantas de las líneas testigo <i>CLV3p:GFP</i> , <i>WUSp:GFP</i> y <i>STMp:STM-VENUS</i> .	24
Figura 19. Área del SAM en $\mu\text{m}^2$ de plantas regadas con agua del grifo o suplementada con 200 mM de sal.	25
Figura 20. Imágenes representativas de la actividad de las línea testigo <i>CLV3p:GFP(-ER)</i> .	26
Figura 21. Imágenes representativas de la actividad de las líneas testigo <i>WUSp:GFP(-ER)</i> .	27
Figura 22. Imágenes representativas de la actividad de las líneas testigo <i>STMp:STM-VENUS</i> .	28
Figura 23. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas mutantes <i>dellaKO</i> regadas con 0, 50 y 100 mM de sal después de la floración.	29
Figura 24. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante <i>bp-1</i> regadas con 0, 50 y 100 mM de sal después de la floración.	30
Figura 25. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante <i>dellaKO</i> regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración.	31
Figura 26. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del mutante <i>dellaKO</i> .	31
Figura 27. Cuantificación de clorofilas en hojas de roseta de plantas silvestres del ecotipo <i>Ler</i> y el mutante <i>dellaKO</i> .	32
Figura 28. Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante <i>bp-1</i> regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración.	32
Figura 29. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del mutante <i>bp-1</i> .	33

Figura 30. Cuantificación de clorofilas en hojas de roseta de plantas silvestres del ecotipo <i>Ler</i> y el mutante <i>bp-1</i> .	33
Figura 31. Área de la roseta de los ecotipos estudiados al inicio de la floración.	34
Figura 32. Ratio entre el número de flores producidas en sal.	35
Figura 33. Relación entre el área de la roseta y la ratio de flores producidas en sal.	36
Figura 34. Relación entre el área de la roseta y la ratio de flores producidas en sal.	36
Figura 35. Graficas representan la relación entre la cantidad de clorofilas y la ratio de flores producidas en sal.	37
Figura 36. Graficas representan la relación entre la cantidad de clorofilas y la ratio de flores producidas en sal.	37
Figura 37. Ratio sal/control para la altura de la inflorescencia en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más <i>Ler</i> y <i>Col</i> .	39
Figura 38. Ratio sal/control para el número de estructuras reproductivas en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más <i>Ler</i> y <i>Col</i> .	39
Figura 39. Ratio sal/control para el porcentaje de yemas cerradas en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más <i>Ler</i> y <i>Col</i> .	39
Figura 40. Mapa con la distribución de los 58 ecotipos de la colección Ibérica analizados.	40
Figura 41. Mapa con la distribución de los 58 ecotipos de la colección Ibérica analizados.	40
Figura 42. Modelo propuesto sobre la regulación de la actividad del SAM bajo estrés salino.	43

**INDICE DE TABLAS****PAG.**

Tabla 1. Solución nutritiva.

**11**

Tabla 2. Parámetros Confocal.

**14**

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARR	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
AtHKT1	High-Affinity K <sup>+</sup> Transporter
BP	BREVIPEDICELLUS
CK	Citoquinina
Col	Columbia
CLV3	CLAVATA
CZ	Central Zone
DELLA	Familia de proteínas regulan crecimiento y desarrollo de las plantas
<i>dellaKO</i>	mutante proteínas DELLA
ER	ERECTA
<i>er-105</i>	mutante erecta en fondo Columbia
FT	Factores de Transcripción
GA	Giberelina
GA20ox	GA20oxidasa
GA2ox	GA2oxidasa
GFP	Green Fluorescent Protein
GWAs	Genome Wide Association studies
Ha	Hectárea
KNOX	Knotted-like
LEA	Late Embryogenesis Abundant
Ler	<i>Landsberg erecta</i>
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
OC	Organizing Center
PYL	PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE
PYR	PYRABACTIN RESISTANCE
PZ	Peripheral Zone
RCAR	Regulator of C-repeat Binding
ROS	Reactive Oxygen Species
RZ	Rib Zone
SAM	Shoot Apical Meristem
SOS	Salt Overly Sensitive

STM

Shoot Meristemless

$\mu$ m

Micra

WUS

WUSCHEL

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. SALINIDAD

Levitt (1980) define al estrés como los cambios en las condiciones del medio ambiente con un impacto negativo en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Estos cambios provocan en las plantas respuestas complejas, influyen en la supervivencia y la productividad de los cultivos y, por tanto, constituyen un problema fundamental para la agricultura. La productividad de cereales clave como maíz, trigo y arroz, que representan alrededor del 50 % del alimento de la población mundial, se ha visto seriamente afectada por la mala gestión de las tierras de cultivo y los efectos del cambio climático. Si bien se ha logrado aumentar su producción a costa de incrementar el uso de fertilizantes, se espera que para el año 2050 la producción llegue a 3300 millones de toneladas, este aumento se postula insuficiente para garantizar la seguridad alimentaria de los 10000 millones de habitantes que se espera seamos (FAO, 2021oi.org/10.4060/cb7654es; FAO, 2024 doi.org/10.4060/cd0022es).

A la fecha, más de 1100 millones de hectáreas (ha) de la superficie terrestre están afectadas por la salinidad (60% salinas, 26% sódicas y 14% salino-sódicas) (FAO,ITPS,2021. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb7247en>). De estas, aproximadamente 160 millones de ha son tierras de cultivo, cifra que aumenta anualmente a razón de 1.5 millones de ha como resultado de un manejo inadecuado de la irrigación, la aplicación de fertilizantes y la intrusión de agua salina procedente del mar a ríos o aguas subterráneas (FAO ITPS, 2021 <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb4809en>).

Niveles altos de sal modifican las propiedades fisicoquímicas del suelo. La acción de las sales solubles y la alta cantidad de iones de Na<sup>+</sup> debilitan el vínculo entre las partículas del suelo, provocando su compactación que, por un lado, reduce la circulación de agua y, por otro lado, evita la aireación. Tanto la falta de agua como las condiciones hipóxicas afectan negativamente al crecimiento de las plantas (Munns & Tester, 2008). Es posible lavar la sal acumulada en la zona de las raíces por medio de una irrigación extensiva. Sin embargo, en suelos fuertemente texturizados y poco permeables, el lavado no ayuda debido a las pobres características de infiltración que presentan los mismos (Singh & Chatrath, 2001). Otro problema causado por la acumulación de las sales de Na<sup>+</sup> disueltas en el agua de riego es la formación sobre la superficie del suelo de una corteza o costra arcillosa que impide la germinación de las semillas y dificulta la absorción de agua y nutrientes de las plántulas (Mata-Fernández *et al.*, 2014).

La salinidad afecta cada aspecto de la fisiología y el metabolismo de la planta. Conlleva otros tipos de estrés secundarios, como el estrés osmótico, hídrico, iónico y oxidativo (Chaundhry *et al.*, 2022). El estrés osmótico tiene lugar cuando la cantidad de sales disminuye el potencial hídrico del suelo, lo que a su vez disminuye el contenido relativo de agua en la planta. El estrés oxidativo es consecuencia del aumento en los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS, de "*reactive oxygen species*" en inglés). El estrés salino también rompe la homeostasis iónica de las plantas al provocar un exceso tóxico de Na<sup>+</sup> en el citoplasma y una deficiencia de iones como el K<sup>+</sup>, lo que afecta al metabolismo celular. Algunos sistemas enzimáticos,

como la glicólisis o el ciclo de Krebs, son especialmente sensibles a la salinidad, provocando una menor disponibilidad de energía y adquisición de nutrientes, inhibiendo o disminuyendo el crecimiento de la planta y la germinación de las semillas (Alcaraz-Ariza, 2012).

#### 1.1.1. Percepción y señalización del estrés salino

Las plantas perciben el estrés salino a nivel de órgano y tejido. La raíz es el primer órgano en detectar el aumento en la concentración de sales en el suelo, y envía señales a los tejidos superiores (tallos y hojas) a través del floema y xilema. La señalización en las raíces incluye la activación de la vía hormonal de ácido abscísico (ABA) y la producción de señales secundarias como las especies reactivas del oxígeno (ROS, de “*reactive oxygen species*” en inglés) (Li *et al.*, 2022; Manhaes *et al.*, 2020; Udvardi *et al.*, 2007). Los tejidos superiores (tallos, hojas y meristemos) reciben estas señales, y activan la respuesta al estrés salino, que implica cambios en la regulación génica, la activación de diferentes vías de señalización hormonal (ABA, citoquininas, etileno, auxinas, giberelinas, brasinoesteroides, etc.), la producción de compuestos osmoprotectores y, en general, la inhibición del crecimiento y el desarrollo (Munns & Tester., 2008)

A nivel celular, no se sabe bien como se percibe el exceso de sal, o si las plantas tienen un receptor o sensor de sal, aunque hay evidencias de que el exceso de Na<sup>+</sup> es rápidamente percibido por las células de la raíz de las plantas. Cuando las plantas están expuestas a altas concentraciones de sal, se interrumpe la homeostasis iónica celular y el estrés asociado es percibido por sensores de membrana que desencadenan una serie de respuestas fisiológicas y bioquímicas. Una de las respuestas inmediatas es la liberación de Ca<sup>2+</sup> vacuolar. Las altas concentraciones de sal también conducen a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que aumenta rápidamente su concentración en el citoplasma. Niveles altos de Ca<sup>2+</sup> y ROS desencadenan diferentes vías de señalización y respuestas celulares, por ejemplo, la ruta SOS para expulsar iones Na<sup>+</sup> de las células. Las proteínas SOS2 y SOS3 son claves en este proceso (Ali *et al.*, 2023). Otra vía que también es activada es la ABA-SnRK2. La percepción de ABA por los receptores PYR/PYL/RCAR, provoca un cambio conformacional en los mismos e inhiben las proteínas fosfatasa tipo 2C, que les permite interactuar con las quinasas SnRK2 que son actores clave de la cascada de señalización que regula varios genes sensibles al estrés y procesos fisiológicos (Chaudhry *et al.*, 2023)

Diferentes trabajos indican que la pared celular también juega un papel relevante en la percepción y respuesta al estrés por sal. El estrés salino puede dañar la pared celular o alterar su composición, lo que podría desencadenar mecanismos protectores del estrés. Otros orgánulos y compartimentos celulares (núcleo, cloroplastos y mitocondrias) también juegan papeles significativos en la percepción y respuesta al estrés salino.

## 1.2 RESPUESTAS FRENTE AL ESTRÉS SALINO

Las plantas tienen mecanismos para adaptarse y sobrevivir a niveles altos de sal en el suelo, aunque las respuestas al estrés son distintas según la intensidad y duración del mismo.

### 1.2.1. Respuestas fisiológicas

El estrés osmótico asociado a la salinidad afecta negativamente a la capacidad de las raíces de absorber agua. Esto limita el suministro de agua al resto de órganos y, en consecuencia, se reduce la turgencia celular, afectando al desarrollo de las hojas y, por tanto, a la tasa fotosintética. La pérdida de turgencia celular puede resultar en deshidratación y la muerte de aquellas plantas incapaces de lidiar con el estrés. En respuesta, las plantas limitan el intercambio gaseoso y reducen la pérdida de agua mediante el cierre de los estomas, el ácido abscísico (ABA) producido en las raíces es responsable de este cierre.

Niveles altos de sal dañan la clorofila y provocan el reemplazo de la carga de  $K^+$  por  $Na^+$  en los cloroplastos. De este modo, se modifica la actividad del fotosistema II (PSII), reduciendo la eficiencia fotoquímica y por tanto la tasa fotosintética. Además, la producción de ROS aumenta notablemente en los cloroplastos y las mitocondrias. En respuesta, la planta pone en marcha diferentes mecanismos enzimáticos de detoxificación. Estos incluyen la superóxido dismutasa que cataliza la transformación del radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  y  $O_2$  en el citosol. La ascorbato peroxidasa es el principal actor en la detoxificación del peróxido de hidrógeno en los cloroplastos, las mitocondrias, el citosol y el peroxisoma de la planta durante el estrés. Utiliza ácido ascórbico como donante de electrones para la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . La catalasa también reduce  $H_2O_2$  a  $H_2O$ .

### 1.2.2. Respuestas celulares

Una primera respuesta de la planta al estrés salino es la inhibición general del crecimiento, reflejado en la reducción de la altura de la inflorescencia y del tamaño de hojas, flores y raíces. Además, los tallos suelen engrosarse y se acelera la floración. Las hojas adquieren un tono verde intenso, pasando a amarillo, indicativo de que ha comenzado la senescencia. Un exceso de sal también puede ocasionar necrosis en las hojas, la cual empieza por la punta y avanza hacia la base. A nivel celular hay una disminución en el tamaño de las células y una reducción en la frecuencia y en el número de células en división (Zhu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2013). La pared celular puede volverse más gruesa debido a cambios en la composición de celulosa, hemicelulosa y pectina limitando el crecimiento de forma irreversible (Colin *et al.*, 2023). Las vacuolas aumentan de tamaño al secuestrar en su interior iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  para mantener la homeostasis iónica del citosol y evitar el daño de otros orgánulos (Mata-Fernandez *et al.*, 2014).

### 1.2.1. Respuestas moleculares

Diferentes familias de factores transcripcionales (FT) orquestan las respuestas moleculares de las plantas frente a estrés salino. Los FT bZIP tipo ABA-Responsive Element Binding (ABRE/ABF) participan en la regulación de la expresión génica asociada con sequía y salinidad y, de hecho, constituyen los principales factores de señalización dependientes del ácido abscísico (ABA). Por ejemplo, AtbZIP17 activa la tolerancia a salinidad en Arabidopsis al regular positivamente la expresión de genes de respuesta a estrés, como genes relacionados con la señalización por JA, SA y ABA (Liu *et al.*, 2008).

La familia MYB en plantas es numerosa, participan como activadores o represores transcripcionales en la regulación de procesos celulares esenciales, como son el metabolismo o la diferenciación celular. La sobreexpresión de AtMYB30 en Arabidopsis mejora la resistencia al estrés salino a través de la vía de señalización del ABA (Chen *et al.*, 2023).

La familia NAC es una de las más grandes en plantas y juegan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo, al estar involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, promoviendo su tolerancia (Chavez & Valenzuela, 2023). En concreto, la expresión de NAC5 se induce en respuesta al estrés salino para promover la producción de prolina, azúcares y proteínas LEA (de "Late Embryogenesis Abundant" en inglés) que mitigan los efectos del estrés oxidativo en Arabidopsis (Ma *et al.*, 2021).

La familia de FTs WRKY está implicada en la regulación de varios procesos biológicos y de las respuestas frente a estrés biótico y abiótico (Garrido, 2021). En Arabidopsis, las proteínas WRKY están involucradas en la ruta de señalización mediada por ABA y en diversas respuestas a estrés. La sobreexpresión de AtWRKY2 presenta un fenotipo de insensibilidad a ABA y un incremento en la tolerancia a estrés salino (Gutierrez-Hernandez, 2018).

En respuesta a estrés salino, también se producen cambios a nivel epigenético como cambios en la metilación, acetilación y ubiquitinación de las histonas que influyen en la expresión de genes de defensa. La metilación del DNA puede silenciar genes no esenciales durante el estrés, permitiendo que la planta concentre sus energías en la supervivencia. Por medio de la memoria epigenética, las plantas pueden recordar exposiciones previas al estrés, lo que les permite responder de manera más eficiente ante un nuevo evento. Por tanto, la comprensión de estos mecanismos epigenéticos es importante para el desarrollo de cultivos más tolerantes al estrés.

### **1.3. RESPUESTAS DEL MERISTEMO APICAL DEL TALLO (SAM) FRENTE AL ESTRÉS SALINO**

#### **1.3.1. Función y actividad de SAM**

En las plantas superiores, el meristemo apical del tallo (SAM, de "*shoot apical meristem*" en inglés) alberga la población apical de células madre pluripotentes que es el origen de todos los órganos aéreos de la planta, como hojas, flores, tallos y ramas (Shi & Vernoux, 2022).

En Arabidopsis el SAM tiene una estructura compleja, lo forman dos capas de células que presentan divisiones celulares anticlinales, la primera (L1) da lugar a la epidermis y la segunda (L2) a los tejidos internos y la línea germinal. Por debajo de estas capas aparece una tercera capa de células (L3), con planos de división aleatorios, que da origen a los tejidos internos del tallo y a la vasculatura (Pfeiffer *et al.*, 2024).

El SAM tiene tres zonas funcionales bien diferenciadas. La zona central (CZ) contiene la población apical de células madre. Éstas se dividen lenta y asimétricamente para, por una parte, mantener estable el tamaño del nicho de células madre y, por otra, proporcionar nuevas células para la organogénesis. La CZ está rodeada por la zona periférica (PZ) donde la progenie de las células madre se divide más rápidamente y se diferencia progresivamente hasta formar parte de los órganos laterales (primordios de hoja o flor). El

centro organizador (OC) es una región que se encuentra por debajo de la población apical de células madre y es el encargado de mantener el reservorio de estas células. En una región más profunda del meristemo, se localiza la zona de costilla (RZ), o meristemo medular, que dará lugar a los tejidos del tallo y a la vasculatura (figura 1) (Gaillochet *et al.*, 2015; Pfeiffer *et al.*, 2024).

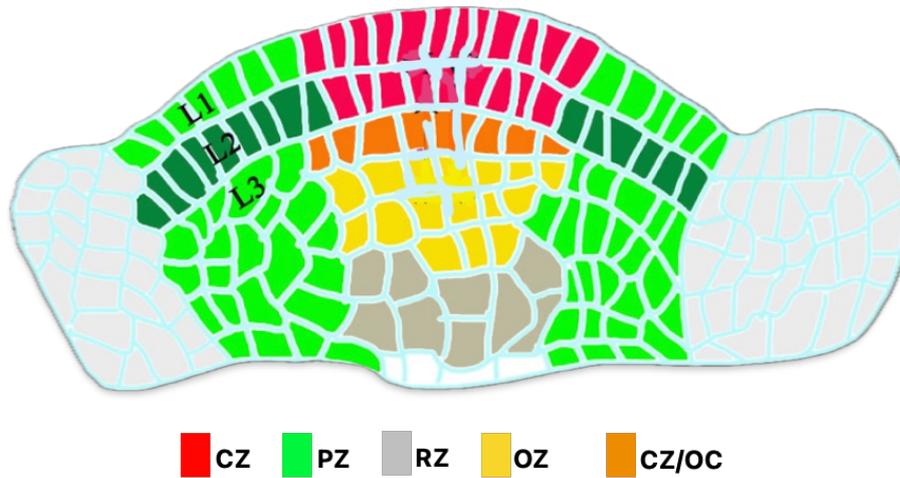


Figura 1. Representación de las zonas del meristemo apical del tallo (SAM). Zona Central (CZ), Zona Periférica (PZ), Zona Costilla (RZ), Centro Organizador (OC) y las capas celulares (L1-L3). Modificado de Zhang *et al.*, 2023.

#### 1.4. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL SAM

##### 1.4.1. Sistema WUSCHEL (WUS) / CLAVATA (CLV3)

WUSCHEL (WUS) es un factor de transcripción con homeodominio que promueve el estado indiferenciado de la población apical de células madre. El gen *WUS* se expresa en el centro organizador (OC). La proteína WUS migra a capas celulares superiores donde activa la expresión de CLAVATA (CLV3), un péptido de señalización extracelular que restringe la proliferación de las células madre en el SAM. CLV3 interactúa con los receptores CLV1 y CLV2 en capas celulares inferiores. Esta interacción activa una cascada de señalización que inhibe la expresión de *WUS* en el OC, estableciendo, de este modo, un ciclo de retroalimentación negativo que asegura un balance dinámico entre la proliferación de células madre y su diferenciación (Gaillochet *et al.*, 2015).

##### 1.4.2. Genes KNOX (*STM* Y *BP*)

Esta familia de genes codifica factores de transcripción que regulan la identidad y el mantenimiento de las células del meristemo. Los genes *KNOX* están encargados de mantener el estado indiferenciado de las células del meristemo. Para ello, tanto *STM* como *BP* controlan la expresión de genes implicados en la biosíntesis y señalización de hormonas como las citoquininas (CK) y el ácido giberélico (GA). De este modo, los genes *KNOX* mantienen un balance alto entre los niveles de CKs y GAs que favorece la función meristemática (Jasinski *et al.*, 2005). Además, *STM* interactúa con *WUS* para inducir la expresión de *CLV3* (Su *et al.*, 2020).

### 1.4.3. Regulación hormonal (GAs y CKs)

Las giberelinas (GAs) desempeñan un papel esencial en el crecimiento de la planta, regulando procesos como la germinación de las semillas, la floración, la elongación del tallo y la maduración del polen entre otros. Las proteínas KNOX controlan los niveles de GAs en el SAM mediante la represión transcripcional de los genes *GA20ox*, que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de GAs, y la activación de los genes *GA2ox*, que codifican enzimas que inactivan a las GAs (Jasinski *et al.*; 2005). Bajo condiciones de estrés, los niveles de GAs disminuyen y, en consecuencia, aumenta la estabilidad de las proteínas DELLA, que son reguladores negativos de la vía de señalización. Las DELLA actúan como represores del crecimiento y en el SAM reducen el número de divisiones celulares y la producción de órganos laterales (Serrano-Mislata *et al.*, 2017).

Las citoquininas (CKs) tienen un papel clave en el mantenimiento de la población de células madre y la proliferación celular en el SAM, actuando como reguladores positivos de la función meristemática. De hecho, la falta de percepción de las CKs puede ocasionar la interrupción del crecimiento vegetativo. WUS inhibe la transcripción de los genes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR7 (ARR7)* y *ARR15* que codifican a represores de la señalización de CK (Jasinski *et al.*, 2005). De este modo, WUS influye de manera positiva en la actividad del SAM. Asimismo, la señalización por CK aumenta los niveles de WUS, estableciendo un lazo de retroalimentación positivo (Jasinski *et al.*, 2005). Bajo estrés salino, la vía de señalización por citoquininas juega un papel esencial para mantener el equilibrio entre el crecimiento y la adaptación al estrés (Ha *et al.*, 2010)

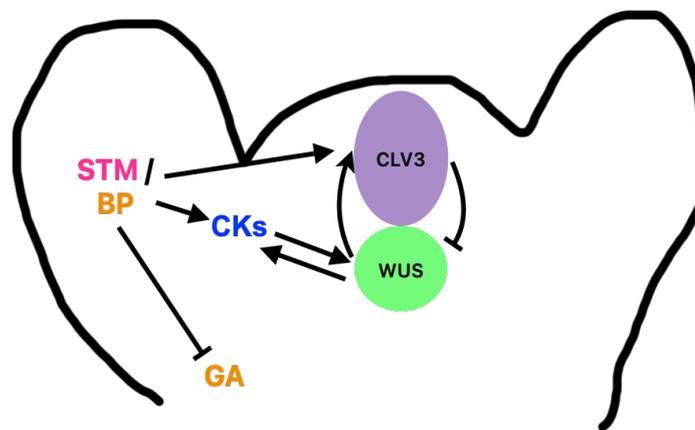


Figura 2. Esquema de la regulación de la actividad del SAM por los genes *WUS*, *CLV3*, *STM*, *BP*, y las vías de señalización hormonal de GAs y CKs. Las flechas indican interacción positiva y la línea roma indica interacción negativa.

### 1.5. RESPUESTAS GENERALES DE LAS CÉLULAS DEL SAM FRENTE A ESTRÉS ABIÓTICO

Hasta la fecha el estudio de las respuestas defensivas del SAM no ha sido tan extenso como con otras partes de la planta de más fácil acceso, como raíces y hojas. Las células del SAM son muy sensibles a diversas condiciones ambientales, por ejemplo, el frío detiene la división y diferenciación celular en el SAM, provocando el aborto del mismo (condición conocida como ceguera), sin afectar al desarrollo de

otros órganos de la inflorescencia (Pfeiffer *et al.*, 2017). Asimismo, las células del SAM son hipersensibles a drogas (como la zeocina o la bleomicina) y factores ambientales (como la exposición a rayos UV) que producen roturas en el DNA (Fulcher & Sablowski, 2011).

WUS y STM son puntos generales de entrada de la información ambiental en las células del SAM. WUS integra información del estatus energético de la planta y su nivel de expresión depende de señales ambientales como la luz y la disponibilidad de nutrientes (Pfeiffer *et al.*, 2017). La actividad de WUS es importante para proteger al SAM de ciertos tipos de estrés, como la exposición a radiación UV o las infecciones virales (Zeng *et al.*, 2024). Por otra parte, varios trabajos muestran como la actividad de los genes KNOX favorece la resistencia a determinados tipos de estrés, como la sequía o el estrés salino (Lee *et al.*, 2016).

#### **1.6. RESPUESTAS ESPECÍFICAS DE LAS CÉLULAS DEL SAM FRENTE A ESTRÉS SALINO**

Diferentes estudios revelan la importancia de entender como responden las células del SAM frente al estrés salino. Una respuesta es la reducción de la división celular, la cual es capaz de recuperarse si el estrés es eliminado (Bursens *et al.*, 2000; Jun *et al.*, 2019). En general, promover la división de las células meristemáticas favorece la tolerancia al estrés salino. La expresión de varios reguladores del ciclo celular es inducida por el tratamiento con sal (Cha *et al.*, 2022). En línea con estas observaciones, los mutantes *clv3-2*, con una proliferación masiva de células madre indiferenciadas, muestran un aumento en la tasa de supervivencia a concentraciones de sal tóxicas (Jun *et al.*, 2019; Cha *et al.*, 2022).

El trabajo de Ogawa *et al.*, 2011 también destaca la relación entre el mantenimiento de la actividad meristemática y la tolerancia a estrés por sal. La proteína RSS1 de arroz controla la transición entre las fases G1-S del ciclo celular. En condiciones de estrés salino, la actividad de RSS1 es crucial para mantener las divisiones celulares en tejidos proliferativos, como el SAM. De este modo, los mutantes *rss1* contienen un SAM mucho más pequeño y desarrollan inflorescencias enanas bajo estrés por sal.

Los genes *KNOX* han sido relacionados con el mantenimiento de la actividad del SAM y la tolerancia a estrés por sal. Respecto a plántulas silvestres, los mutantes *bp* mostraron raíces e hipocotilos más cortos y una menor tasa de supervivencia a concentraciones elevadas de sal y el fenotipo contrario se observó en plántulas que sobreexpresan BP. La proteína BP se une al promotor y activa la expresión de *XTH7*, un gen implicado en la estabilización del contenido de xiloglucano de la pared celular. De este modo, la dinámica ultraestructural de la pared celular parece jugar un papel clave en la resistencia al estrés salino (Cai *et al.*, 2023). *STM*, el otro miembro de la familia *KNOX* implicado en la regulación de la actividad meristemática, forma condensados nucleares en el SAM de plántulas bajo estrés salino. La formación de estos condensados requiere de un dominio tipo prion en el extremo N-t de *STM* que lo diferencia estructuralmente de otros *KNOX*. La eliminación de este dominio disminuye el tamaño del SAM y reduce la tasa de supervivencia de plántulas de *Arabidopsis* bajo estrés salino (Cao *et al.* 2023).

### **1.7. ENSAYOS DE VARIACIÓN NATURAL (GWAS) PARA IDENTIFICAR NUEVOS REGULADORES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS.**

Un ensayo de variación natural (GWAS, de “*genome-wide association studies*” en inglés) es una herramienta poderosa para identificar variantes genéticas asociadas con rasgos específicos en una población de individuos, mediante correlaciones entre variaciones genéticas (generalmente polimorfismos de un solo nucleótido, o SNP) y rasgos fenotípicos, como altura, susceptibilidad a enfermedades u otras características. Se utilizan modelos estadísticos para asegurar que las asociaciones encontradas no se deban al azar o a la estructura poblacional.

Este tipo de análisis ha permitido identificar nuevos reguladores del tiempo de floración (Méndez-Vigo *et al.*, 2011), del desarrollo de la vasculatura en *Arabidopsis* (Milhinhos *et al.*, 2019) y también de la tolerancia a estrés por sal (Baxter *et al.*, 2010; Katori *et al.*, 2010). En particular, el trabajo de Baxter *et al.*, 2010 analizó la acumulación de Na<sup>+</sup> en hoja en 349 ecotipos europeos de *Arabidopsis*. De este modo, observaron que uno de los factores principales que controlan la variación natural en la acumulación de Na<sup>+</sup> en hoja era la presencia de un alelo débil del gen *AtHKT1;1*, que codifica un transportador de Na<sup>+</sup>. Ecotipos con este alelo acumulan más sodio y se distribuyen en regiones cercanas al mar y/o con suelos muy salinos lo que apoya el papel de *AtHKT1;1* en la adaptación a la salinidad. Por otra parte, el trabajo de Katori *et al.*, 2010 analizó la tolerancia a sal de 350 ecotipos de *Arabidopsis*. Este trabajo confirma que existe variación natural en la respuesta a la salinidad. Ecotipos como Bu-5 y Bur-0 fueron mucho más tolerantes al estrés (días de supervivencia en 500 mM NaCl) que Col, un ecotipo susceptible al mismo. El grado de tolerancia dependía en gran medida de un periodo de aclimatación previo, es decir, de la exposición transitoria a una concentración no letal de sal. Mientras que la tolerancia a sal sin aclimatación (SA) es un rasgo poligénico, la tolerancia con aclimatación previa está regulada por una única región genómica en el cromosoma 5, donde se ubican genes como *SOS2*, que codifica una proteína quinasa relacionada con la regulación de la homeostasis intracelular de los iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (Katori *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

\*Optimizar el abordaje experimental para estudiar la actividad del meristemo apical del tallo (SAM) de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) bajo condiciones de estrés salino.

\*Caracterizar los patrones de expresión de los principales reguladores de la actividad del SAM en condiciones de estrés salino.

\*Estudiar el impacto del estrés salino en la actividad del SAM en diferentes mutantes y fondos genéticos de Arabidopsis.

\*Optimizar ensayos de variación natural (GWAs) con el objetivo futuro de identificar nuevos genes reguladores del desarrollo reproductivo de Arabidopsis bajo estrés salino.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*, del ecotipo Landsberg erecta (*Ler*) y Columbia (*Col*). Los mutantes *dellaKO* (Serrano-Mislata et al., 2017) y *bp-1* (Venglat et al., 2002) están en fondo *Ler*, mientras que el mutante *er-105* está en fondo *Col* (Tori et al., 1996). Las líneas reporteras *CLV3p:GFP* (Reddy & Meyerowitz, 2005), *WUSp:GFP* (NASC, N23897) y *STMp:STMVENUS* (Heisler et al., 2005) están todas en fondo *Ler*.

Para los ensayos de variación natural en la respuesta a estrés por sal durante el desarrollo reproductivo, se utilizaron los siguientes ecotipos naturales de la Península Ibérica (Méndez-Vigo *et al.*, 2011) : Ace0, All0, Amu0, Aru0, Bar1, Bea0, Bra0, Bus0, Cap1, Cas0, Cat0, Cem0, Cha0, Cmo3, Cot, Dar1, Fun0, Glo1, Hue3, Leg0, Lro0, Moe0, Moj0, Mon5, Mos1, Mur0, Pad0, Ped0, Pee0, Pie0, Piq0, Pra6, Pro0, Pun0, Rds0, Reg0, Rel0, Rib1, Sam0, San10, Sen0, Som0, Stp0, Tam0, Tdc0, Tor1, Trs0, Urd1, Usa0, Vad0, Vas0, Vaz0, Vdt0, Ver5, Vid1, Vim0, Viñ0, Voz0.

#### 3.2. CONDICIONES DE CRECIMIENTO

##### 3.2.1. Análisis de la actividad del SAM en diferentes fondos genéticos

En primer lugar, las semillas se esterilizaron mediante congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 24 horas para eliminar la posible presencia de thrips y otros insectos. A continuación, se estratificaron en un tubo con 4 ml de agar al 0,1% durante 5-7 días a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Las semillas se sembraron sobre discos de sustrato Jiffy-7 de 41 mm (unas 5 semillas por disco) previamente hidratados con solución nutritiva (Tabla 1) hasta obtener un peso de 30 gr. Los discos con las semillas se trasladaron a la cámara de cultivo modelo Percival SE-41AR2SW con las condiciones descritas abajo. Tras la germinación, se dejó una única plántula por Jiffy.

Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de fotoperiodo (16h luz / 8h oscuridad), intensidad lumínica ( $100 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura ( $22$  o  $24^{\circ}\text{C}$  según el ensayo).

Cada dos días, se pesaron los Jiffys, se añadió el agua de grifo necesaria para restaurar los 30 gr de peso total, lo que equivale a aproximadamente el 60% de la capacidad de campo, condiciones de riego suficiente. A partir de la floración, se suplementó el riego con diferentes concentraciones de sal (NaCl): 0 (control), 50, 100, 150 y 200 mM.

Tabla 1. Solución nutritiva.

COMPUESTO	FORMULA	CONCENTRACIÓN mg/L
Quelato de hierro	gFe (quelato)	34,95
Sulfato de zinc	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9,76
Sulfato de manganeso	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	28,95
Sulfato de cobre	Cu <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,23
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	32,55
Molibdato amónico	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,51
Nitrato cálcico	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	885
Nitrato potásico	KNO <sub>3</sub>	381
Fosfato potásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	102
Sulfato magnésico	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	367,5

pH 6,5; CE 1,6 mS.

### 3.2.2. Análisis de variación natural en el desarrollo reproductivo

Para el estudio de variación natural (GWAs), macetas de 120 mm de diámetro se llenaron con 120 gr de sustrato para *Arabidopsis* (50% turba rubia kekkila, 25% perlita, 25% vermiculita) y se regaron a saturación con solución nutritiva. Se prepararon 3 macetas por ecotipo, en cada una se sembraron 10 semillas aproximadamente (previamente esterilizadas a -80°C como se indica en el apartado anterior). Tras la siembra, las semillas se estratificaron a 4°C, en oscuridad durante una semana (ensayo preliminar) o se vernalizaron durante 2 meses (ensayo 1). A continuación, las macetas se trasladaron a cabinas de cultivo con condiciones controladas de día largo (16h luz / 8h oscuridad) y temperatura (22°C). Durante todo el ensayo se mantuvo un riego suficiente, aproximadamente 2 l de agua del grifo a la semana para cada bandeja con 12 macetas. Tras la germinación, se dejaron 5 plantas por maceta. A partir del día de la floración (cuando el botón floral era visible en la mayoría de las plantas), se separaron por tratamiento las macetas correspondientes a un mismo ecotipo. Una se continuó regando con agua del grifo (control) y las otras dos con agua suplementada con 150 o 300 mM de sal.

### 3.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL SAM

Para estudiar la actividad del SAM se consideraron dos parámetros: la tasa de producción de órganos laterales (flores) y la tasa de elongación de la inflorescencia.

El día de floración se consideró, cuando el botón floral fue evidente a simple vista. La actividad del SAM se determinó contando periódicamente el número total de flores maduras y silicuas producidas en la inflorescencia principal (conteo acumulativo). El periodo de actividad del meristemo se consideró desde el día en que se observó la primera flor abierta hasta el día en que se observó la última. (figura 3).

En el estudio de variación natural con ayuda de lupa Olympus SZ60, además de las flores abiertas (maduras) y los frutos, se contó el número de yemas florales no abiertas en el ápice de la inflorescencia.

El segundo parámetro para determinar la actividad del SAM fue medir con una regla la longitud del tallo de la inflorescencia principal a partir del día de floración, y cada 2 días hasta el final del desarrollo (figura 3).

### 3.4. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE ROSETA

Para el análisis GWAS, se tomaron fotografías de las rosetas el día de la floración como indicador del grado de desarrollo vegetativo en el momento de iniciar el estrés. El área de roseta se calculó con el programa Fiji, utilizando la herramienta ROI manager para seleccionar la región de interés y obteniendo su valor de área según una medida previamente determinada, por ejemplo, el diámetro de una moneda (figura 3).

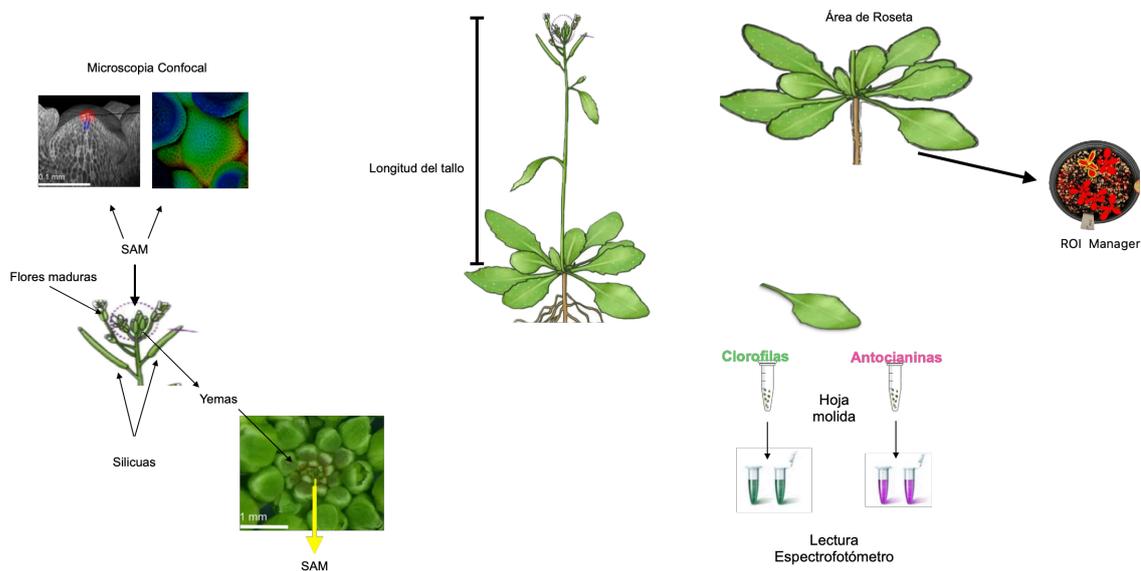


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes parámetros analizados para estudiar la actividad en el SAM en condiciones de estrés salino (modificado de Zeng *et al.*, 2024).

### 3.5. CUANTIFICACIÓN DE CLOROFILAS.

La cantidad de clorofilas se cuantificó en hojas adultas de roseta. Las hojas se recogieron en tubos de plástico de 2 ml con 4 micro-esferas de vidrio, se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido. Las muestras se conservaron congeladas a -80°C hasta su procesamiento (figura 3).

Todo el proceso de extracción de clorofilas se realizó en frío (4°C). Las muestras se pulverizaron en un molino de oscilación horizontal Retsch MM400 durante 1 minuto a 30 Hz. Se añadieron 700 µL de acetona fría al 80% por muestra. La extracción se llevó a cabo en oscuridad, a 4 °C y en agitación suave durante 30 minutos. A continuación, los tubos se centrifugaron 14 minutos a 14000 rpm. 400 µL de los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a tubos nuevos. Se determinaron los valores de absorbancia a 663 nm para la clorofila a y 645 nm para la clorofila b en un espectrofotómetro Jenway 7205. Como blanco, se utilizaron 400 µL de acetona. Para calcular la clorofila total se empleó la siguiente formula (Porra *et al.*, 1989).

$$\text{Clorofila (a + b)} = [8,02(A_{663}) + 20,20(A_{645})]V/100W$$

Donde V = Volumen del extracto, W = Peso fresco de la hoja  
Unidades expresadas en mg de clorofilas por g de peso fresco

### 3.6. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.

A partir del mismo tipo de material utilizado para cuantificar clorofilas, también se determinó la cantidad de antocianinas. Para ello, tras moler las muestras, se añadió a cada una 400  $\mu$ L de metanol acidificado con 1% de HCl frío. La extracción se llevó a cabo en oscuridad, a 4°C y en agitación suave durante toda la noche. Al día siguiente, para separar las clorofilas se añadieron por muestra 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O destilada y 400  $\mu$ L de cloroformo, ambos fríos. Tras homogeneizar bien con vórtex, se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. 400  $\mu$ L de los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a nuevos tubos. Se leyó la absorbancia a 535 nm y 650 nm en un espectrofotómetro Jenway 7205. Como blanco se utilizaron 400  $\mu$ L de metanol. El contenido de antocianinas se calculó con la siguiente fórmula (Neff & Chory 1998).

$$\text{Antocianinas} = (A_{535} - A_{650}) / \text{mg de peso fresco.}$$

Unidades arbitrarias (ua) por mg de peso fresco

La absorbancia para antocianinas se lee a 535 nm, que es donde el cromóforo Flavylium presenta un pico máximo de lectura; y la segunda lectura se toma a una longitud de onda de 650 nm, para medir clorofilas que puedan interferir con la medición de las antocianinas. De este modo, se corrige la absorción por la clorofila, obteniéndose una medida más precisa de la concentración de antocianinas (Giusti & Wrolstad, 2001; Wrolstad *et al.*, 2004).

El Flavylium es un ion positivo que se forma a partir de la unión de un anillo benzopirano con un anillo pirano. Esta estructura es lo que da a las antocianinas el color rojo, púrpura o azul dependiendo de los sustituyentes en el anillo y del pH.

### 3.7. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LÍNEAS TESTIGO FLUORESCENTES EN EL ÁPICE DE LA INFLORESCENCIA MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

En primer lugar, se eliminaron con unas pinzas los frutos y las flores grandes del ápice de la inflorescencia. A continuación, se cortó el mismo, con unos 5 mm del tallo, se colocó en una placa con agar al 1,5 % y se cubrió con agua. Bajo la lupa y con ayuda de pinzas o agujas de insulina, se eliminaron las yemas florales hasta que el SAM quedó descubierto. El ápice se tiñó con el colorante FM4-64 (tiñe membranas celulares), con una concentración de 50  $\mu$ g/ml, durante 10 minutos en oscuridad. Posteriormente se enjuagó el ápice con agua destilada y se procedió a su observación en el microscopio confocal.

Las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Stellaris Leica SP8 utilizando un objetivo HC FLUOTAR L VISIR 25x/0.95 de inmersión-agua. Se obtuvieron secciones ópticas de todo el dominio del SAM cada 0,5  $\mu$ m. Los parámetros de adquisición de imágenes se mantuvieron constantes para cada línea testigo analizada (Tabla 2), de forma que los resultados fueran comparables entre los diferentes tiempos analizados y entre condiciones control o de estrés salino. Se analizaron al menos 2 meristemas por línea testigo, tratamiento y tiempo de recogida.

**Tabla 2. Parámetros Confocal**

	Excitación	Emisión			
FM4-64	485 nm	690-789 nm			
GFP	485 nm	503-519 nm			
VENUS	505 nm	516-543 nm			
	Parámetros				
	Smart Gain	Smart Intensity	Smart Wavelength	Pinhole	Zoom
CLV3	50,1	40,24%	485 nm	1,00 AU	2,00
WUS	50,1	84,21%	485 nm	1,00 AU	2,00
STM	50,1		505 nm	1,00 AU	2,00

Las imágenes se procesaron con el programa Fiji. Para calcular el área del meristemo, primero se calibró la escala en 50  $\mu\text{m}$  con la herramienta "Scale bar". A continuación, se obtuvo la imagen del SAM utilizando la herramienta "Stacks"  $\rightarrow$  "Z Project"  $\rightarrow$  "Max Intensity". Finalmente, se delimitó el área y calculó el tamaño del SAM con la herramienta "Stacks" y "Poligon sections" (figura 4).

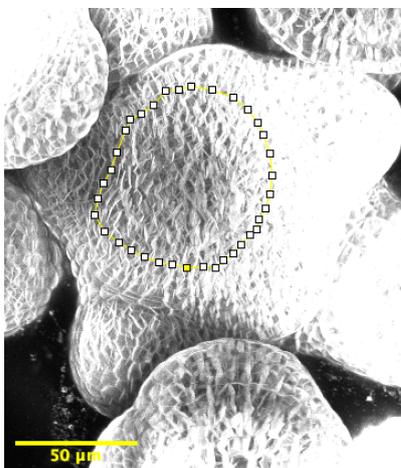


Figura 4. Proyección de intensidad máxima en 3D. Obtenida a partir de secciones ópticas para calcular el área del meristemo utilizando el programa Fiji.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. IMPACTO DE LA SALINIDAD EN EL DESARROLLO DE LA INFLORESCENCIA DE ARABIDOPSIS

#### 4.1.1 Optimización de la concentración de sal para llevar a cabo los ensayos

En un primer ensayo, regamos periódicamente plantas de *Arabidopsis*, de los ecotipos *Ler* y *Col*, con 50 y 100 mM NaCl tras la floración, tal y como se describe en la sección correspondiente de materiales y métodos. El efecto de la sal comenzó a observarse a las dos semanas después de la floración. El tamaño de las hojas de roseta disminuyó y adquirieron una tonalidad más oscura. También se redujo notablemente la altura de la inflorescencia en ambos ecotipos (figura 5A).

Respecto a la producción de flores, las concentraciones de sal ensayadas no tuvieron mucho efecto en las plantas de *Col*, observándose una ligera reducción en el periodo que el meristemo se mantuvo activo (figura 5B y D), aunque el número total de flores producidas no varió (figura 5B y C). En *Ler*, tampoco se observaron grandes cambios al regar las plantas con 50 mM de sal, aunque sí se detectó una ligera disminución, estadísticamente significativa, tanto en la producción de flores como en los días de actividad del SAM en las plantas regadas con 100 mM NaCl (figura 5B-D).

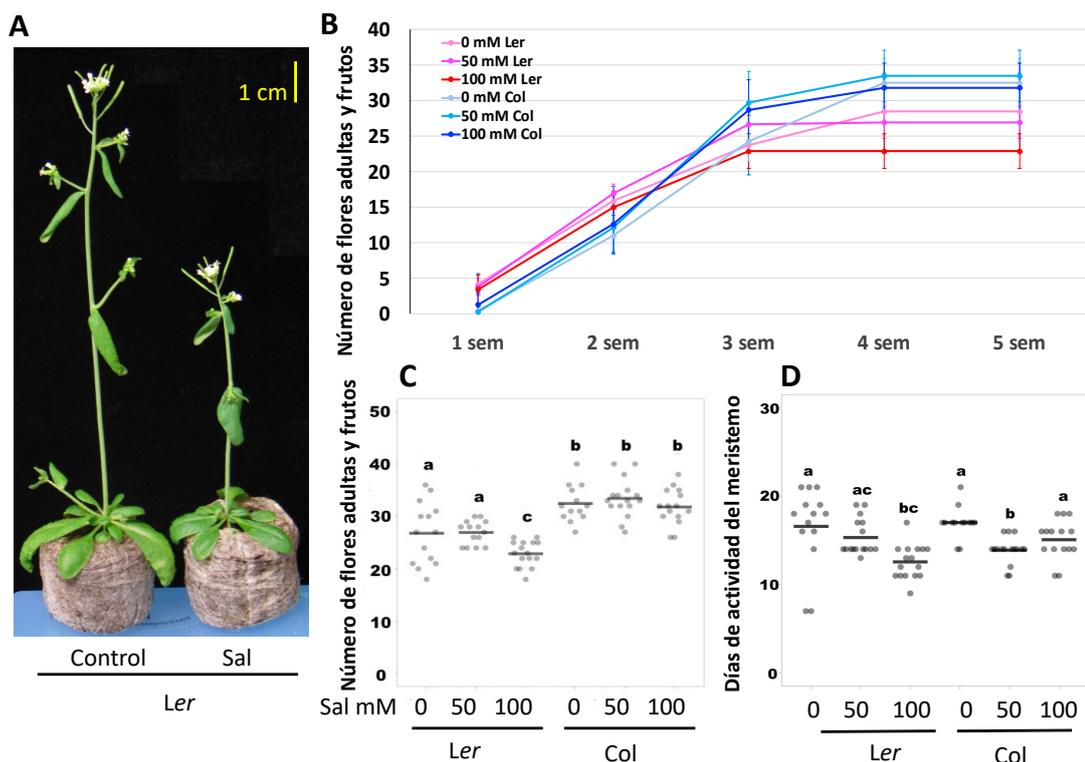


Figura 5. (A) Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo *Ler*, regadas con 0 (control, izquierda) y 100 mM sal (derecha) 10 días después de la floración. Se puede observar como la sal redujo el crecimiento de la inflorescencia de la planta. (B) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos *Ler* y *Col* regadas con 0, 50 y 100 mM de sal después de la floración. La gráfica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por ecotipo y tratamiento. sem = semanas. (C) Número total de flores en la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. (D) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. En (C-D) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

En el siguiente ensayo aumentamos la concentración de sal en el riego a 150 y 200 mM. De nuevo, las plantas de Col mostraron mayor tolerancia y la actividad del SAM apenas se vio afectada, tanto respecto al número total de flores producidas como respecto al número de días durante los cuales el meristemo permaneció activo (figura 6). Sin embargo, la altura de la inflorescencia se vio notablemente reducida (figura 7). En Ler, suplementar el riego con 150 mM de NaCl sí tuvo un efecto significativo en la actividad del SAM y este efecto aún fue más notable en las plantas regadas con 200 mM de NaCl. Además de restringir el crecimiento de la inflorescencia (figura 7), la sal redujo sensiblemente el número de flores producidas en la inflorescencia principal, así como el número de días en que el SAM permaneció activo (figura 6).

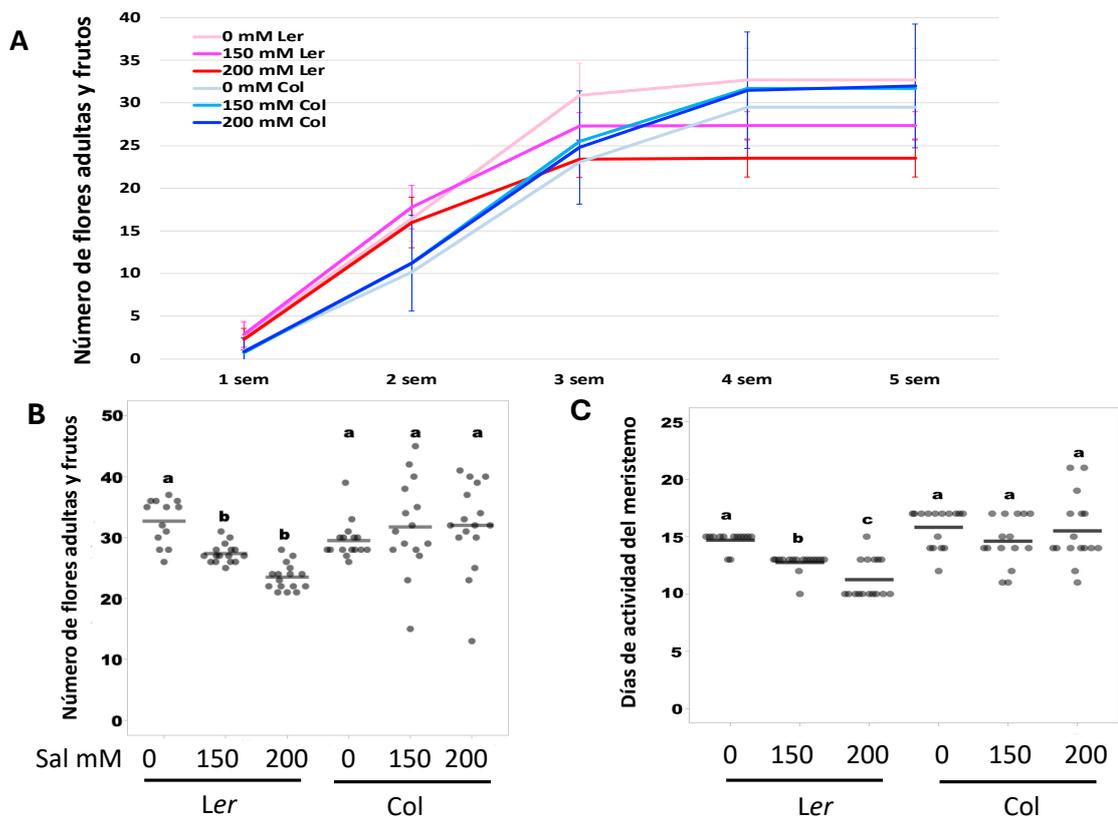


Figura 6. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos Ler y Col regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración. La gráfica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por tratamiento. sem = semanas. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

El SAM proporciona las células necesarias tanto para el desarrollo de los tejidos del tallo como para la formación de nuevos órganos laterales (flores). Sin embargo, nosotros hemos observado que la elongación del tallo es más susceptible a la salinidad. Esta observación podría indicar que la distribución de células procedentes del SAM se ve afectada por el estrés (se destinarían más células a la producción de órganos laterales) y/o que la sal interfiere en estadios posteriores del desarrollo del tallo como, por ejemplo, en la elongación de los entrenudos. Por otra parte, hemos observado que las plantas del ecotipo

*Ler* son más sensibles al tratamiento con sal respecto a *Col*. Este mayor efecto en *Ler* es contrario a lo publicado en Lee *et al.*, 2022. En este trabajo, se muestra que las plántulas de *Arabidopsis* de *Ler* crecen mejor que *Col* en medio suplementado con diferentes concentraciones de NaCl y 5 mM de nitrato. Nuestro resultado puede ser contrario quizá debido a que no hemos suplementado con nitrato el medio, es decir, el nitrato podría aumentar la susceptibilidad de las plantas a la salinidad. Otra razón podría ser que lo observado durante el desarrollo vegetativo no tiene por qué ser igual durante el desarrollo reproductivo que, en general, es más sensible al estrés abiótico.

Por lo tanto, seleccionamos regar las plantas con 200 mM de sal para futuros ensayos, debido al impacto claro en el desarrollo reproductivo de la planta sin ocasionarle la muerte.

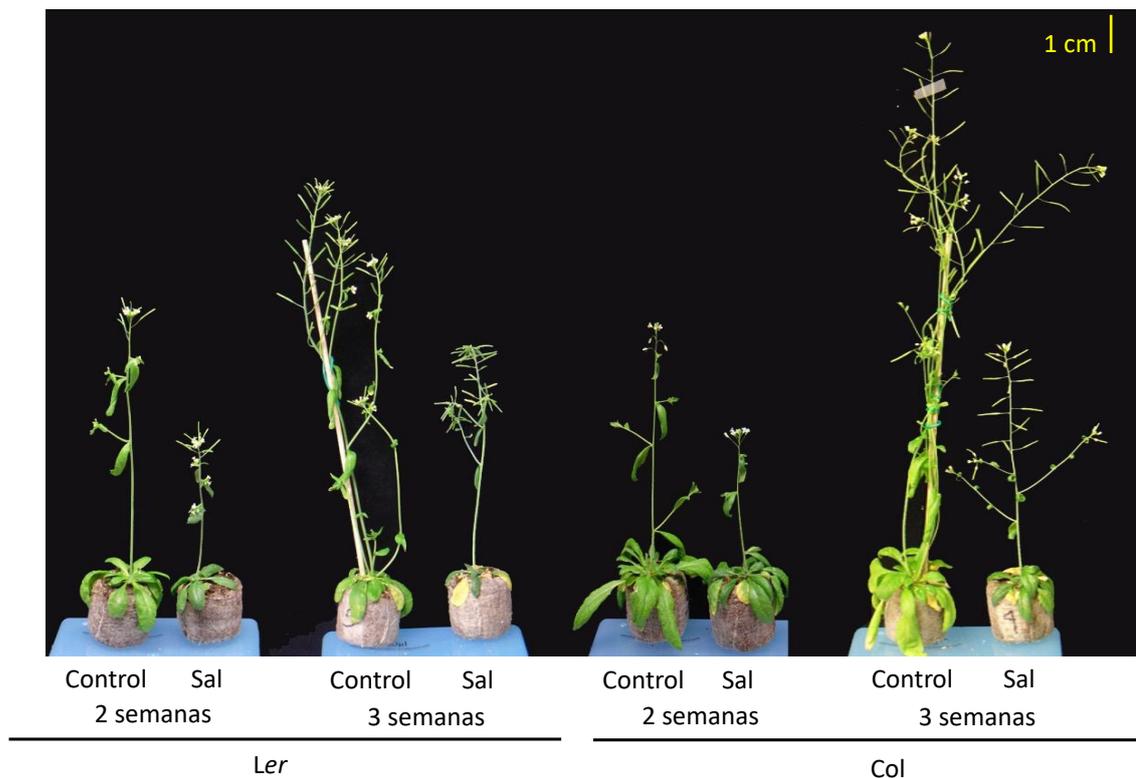


Figura 7. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo *Ler* y *Col*, regadas con 0 (izquierda) y 200 mM sal (derecha), a las 2 y 3 semanas después de la floración. El efecto de la sal se manifestó en una reducción de la altura de la planta, de la superficie foliar y del número de flores y frutos.

#### 4.1.2. Efecto de la mutación *erecta* en la actividad del SAM bajo estrés salino

En el ensayo previo detectamos que las plantas del ecotipo *Ler* eran más sensibles al riego con sal que *Col*. En el siguiente ensayo nos preguntamos si esta diferencia pudiera estar relacionada con la presencia de la mutación *erecta*, ya que en trabajos previos han relacionado al gen *ERECTA* con la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Shanmugam *et al.*, 2020; Nanda *et al.*, 2019). Para evaluar esta idea, añadimos al análisis al mutante *er-105*, con la mutación en *erecta* en un fondo genético *Col*.

La actividad del SAM del mutante *er-105* se vio afectada desde el inicio de los tratamientos. Una semana después de la floración, la tasa de producción de flores disminuyó drásticamente respecto a la de las plantas control (figura 8A). También se redujo muy notablemente la elongación de la inflorescencia (figura 9 - 11). Por tanto, la actividad del SAM de *er-105* parece ser hipersensible al estrés salino. La diferencia en la respuesta entre *Ler* y *Col*, y entre *Col* y *er-105* lleva a pensar que ERECTA estaría relacionado con el mantenimiento y la actividad meristemática en condiciones de estrés salino. El fuerte impacto que la salinidad tiene en el desarrollo de los mutantes *er-105* está de acuerdo con lo mostrado en trabajos previos (Mandel *et al.*, 2014).

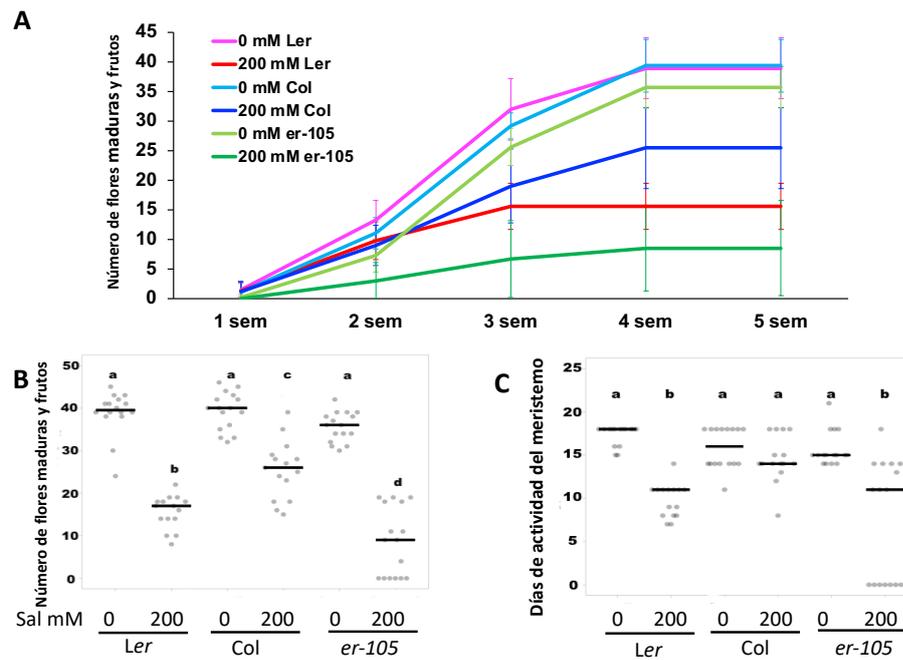


Figura 8. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos *Ler*, *Col* y *er-105* regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración. En (A) la gráfica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por tratamiento. sem = semanas. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por ecotipo y por tratamiento. En (C-D) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

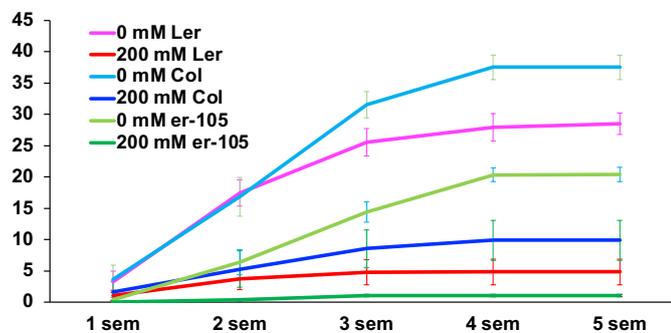


Figura 9. Altura de la inflorescencia principal de las plantas de los ecotipos *Ler*, *Col* y *er-105*. La gráfica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por tratamiento. sem = semanas.



Figura 10. (A) Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo *Ler*, *Col* y *er-105*, regadas con 0 (izquierda) y 200 mM sal (derecha), a las 2 semanas después de la floración. La inflorescencia de los mutantes *er-105* apenas elongó de la roseta en las plantas tratadas con sal.

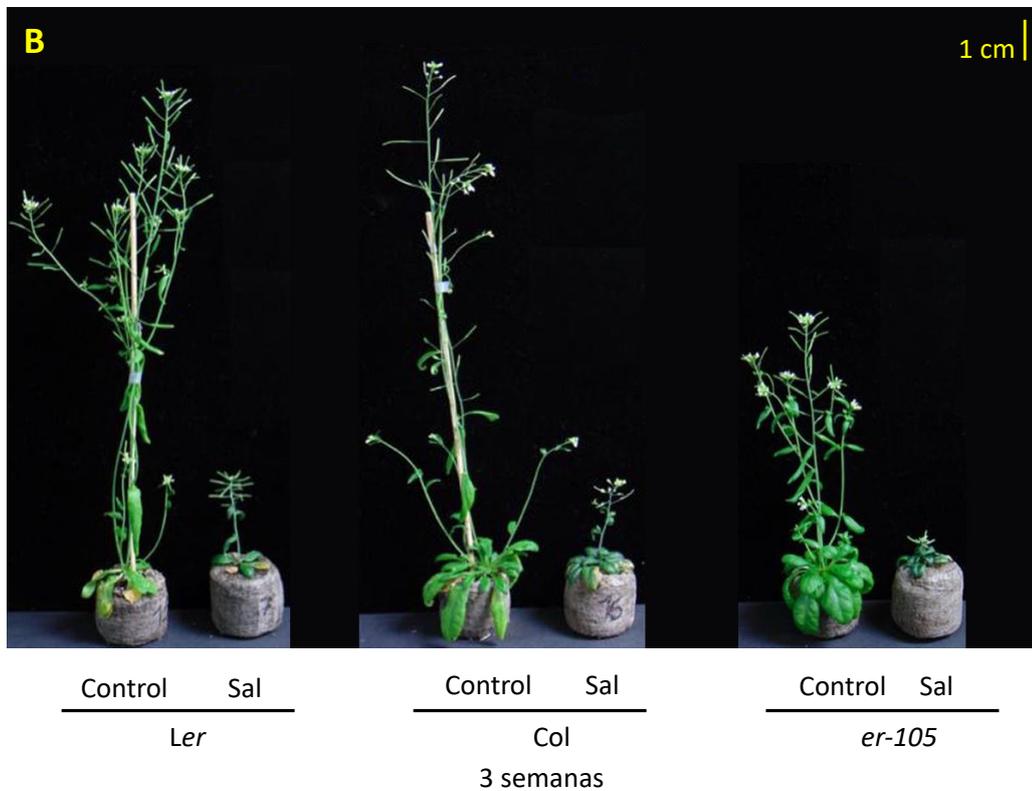


Figura 11. (B) Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del ecotipo *Ler*, *Col* y *er-105*, regadas con 0 (izquierda) y 200 mM sal (derecha), a las 3 semanas después de la floración.

También se cuantificó el contenido de clorofilas (indicador de crecimiento, capacidad fotosintética, etc.) y antocianinas (indicador de la respuesta a estrés) en hojas de roseta como métodos sencillos para evaluar posibles diferencias en el grado de estrés experimentado por las plantas durante el ensayo. Los niveles de clorofilas no presentaron cambios significativos entre ecotipos o como resultado del tratamiento (figura 12). Curiosamente, los niveles de clorofila bajaron notablemente en todos los casos a las dos semanas después de la floración, una observación para la que no tenemos una explicación fácil.

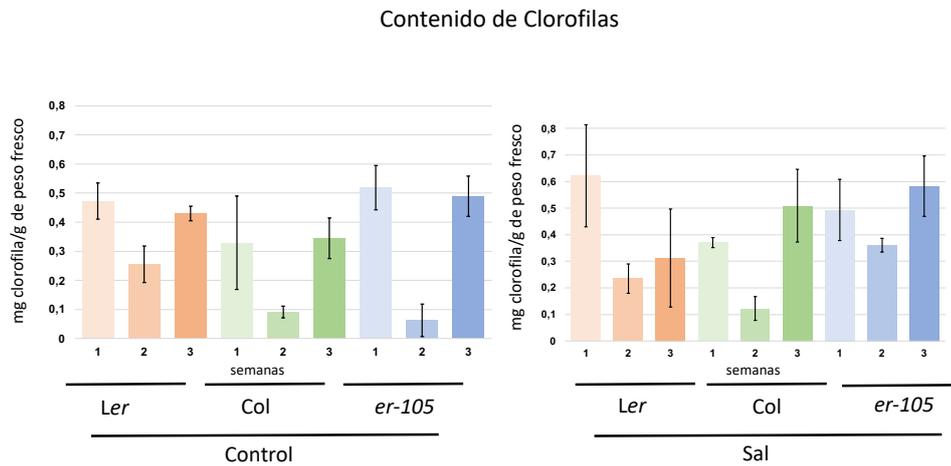


Figura 12. Cuantificación de clorofilas (mg de clorofilas/g de peso fresco) en hojas de roseta de plantas de los ecotipos *Ler*, *Col* y *er-105*, a las 3 semanas después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, riego con agua del grifo suplementada con 200 mM de sal. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo y tratamiento.

Los niveles de antocianinas fueron muy bajos, prácticamente indetectables, en todos los ecotipos en condiciones control. En las plantas regadas con sal, solo se detectó un aumento significativo en los niveles de antocianinas en las hojas de los mutantes *er-105* a las 3 semanas después de la floración. Los niveles más altos de antocianinas en *er-105* apoyarían una mayor susceptibilidad de estas plantas al estrés salino, lo que está de acuerdo con otros trabajos previos (Nanda *et al.*, 2020) (figura 13).

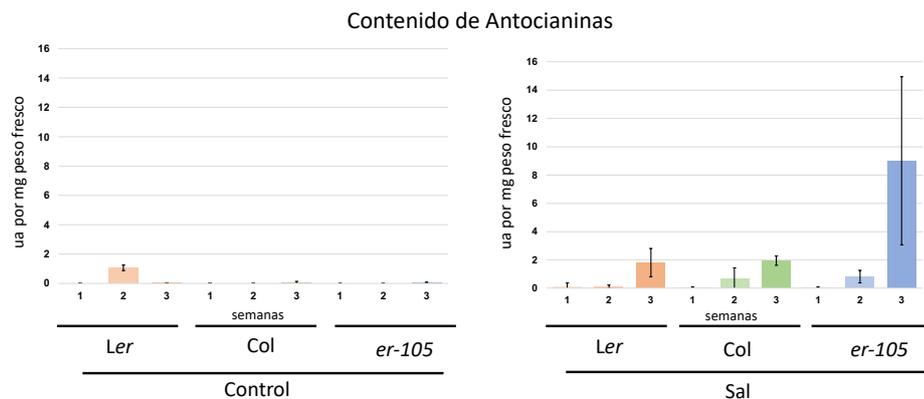


Figura 13. Cuantificación de antocianinas (ua\* por mg de peso fresco) en hojas de roseta de plantas de los ecotipos *Ler*, *Col* y *er-105*, a las 3 semanas después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, riego con agua del grifo suplementada con 200 mM de sal. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento. \*ua=unidades arbitrarias.

En resumen, nuestro análisis está de acuerdo con trabajos previos que muestran que los mutantes *er-105* son hipersensibles a diferentes tipos de estrés abiótico, como salinidad o calor (Shen *et al.*, 2015; Nanda *et al.*, 2020; Shanmugam *et al.*, 2020). Con el objetivo de entender mejor el papel de *erecta* en la tolerancia al estrés por sal durante el desarrollo reproductivo, en futuros ensayos se incluirán plantas que sobreexpresen *ERECTA*, así como el ecotipo Landsberg (sin la mutación *erecta*) de *Arabidopsis*.

#### 4.1.3. Efecto de aumentar la temperatura en la actividad del SAM bajo estrés salino.

Nuestra siguiente pregunta fue: ¿Se puede aumentar la absorción de sal por la planta al subir la temperatura y de esta forma aumentar la transpiración? Esto podría aumentar el impacto de la salinidad en el desarrollo reproductivo.

En este ensayo, el desarrollo de la inflorescencia de plantas *er-105* y Col fue más similar (figura 14), es decir, el impacto de la mutación *erecta* fue menor que a 22 °C (figura 9). De hecho, la mayor reducción en la actividad del SAM bajo estrés salino se observó en *Ler*, tanto considerando la producción total de flores como el periodo de actividad del meristemo. Respecto a la altura de la inflorescencia, esta se redujo de forma similar en los 3 ecotipos en comparación con las plantas control (figura 14B). Los niveles de clorofilas, determinados a las 2 semanas tras la floración, disminuyeron significativamente en *Ler* y *er-105* y apenas cambiaron en Col tras el tratamiento con sal, lo que podría estar relacionado con su mayor tolerancia al estrés (mayor crecimiento y producción de frutos).

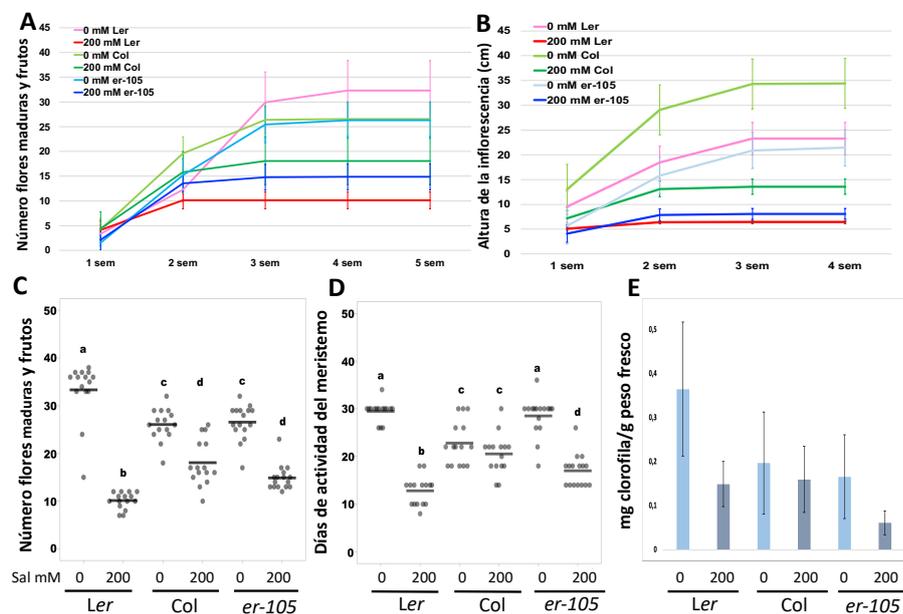


Figura 14. A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de los ecotipos *Ler*, Col y *er-105* regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración. (B) Altura de la inflorescencia principal de las plantas de los ecotipos *Ler*, Col y *er-105*. En (A-B) las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por tratamiento. sem = semanas. (C) Número total de flores por ecotipo y por tratamiento. (D) Días de actividad del meristemo por ecotipo y por tratamiento. En (C-D) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ) ANOVA. (E) Cuantificación de clorofila (mg clorofila/g de peso fresco) en hojas de roseta de plantas de los ecotipos *Ler*, Col y *er-105* a las 2 semanas de la floración. La grafica representa el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo y tratamiento.

En general, subir la temperatura 22°C ( 22 a 24 °C) tuvo un impacto negativo notable en el desarrollo de la inflorescencia de las plantas bajo estrés salino, observándose ápices secos y frutos abortados que pueden alterar la interpretación de los resultados obtenidos. Por tanto, no consideramos de interés utilizar esta temperatura en nuestros ensayos.

## 4.2 ANÁLISIS CELULAR DE LA ACTIVIDAD DEL SAM EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

### 4.2.1. Descripción de los ensayos

Se analizó el desarrollo de la inflorescencia y la actividad en el ápice de líneas testigo fluorescentes para los principales reguladores de la actividad del SAM: el pequeño péptido señalizador CLV3 [*CLV3p:GFP(-ER)*] y los factores transcripcionales WUS [*WUSp:GFP(-ER)*] y STM (*STMp:STM-VENUS*). Con el objetivo de monitorizar el grado de estrés en estas líneas, se cuantificaron clorofilas y antocianinas a las 1, 2 y 3 semanas tras la floración. El ensayo se llevó a cabo en condiciones de 0 y 200 mM de sal en riego, bajo fotoperiodo de 16 h luz / 8 h oscuridad a 22°C.

En primer lugar, se analizó el desarrollo de la inflorescencia en condiciones control y salinidad, observando que las tres líneas mostraron fenotipos muy similares entre sí y respecto a las plantas silvestres Ler, como cabía esperar. El número de flores y el periodo de actividad del meristemo también fueron similares entre las líneas testigo y Ler, tanto en condiciones control como de estrés salino (figura 15). La inflorescencia principal también mantuvo patrones de crecimiento similar en todos los casos (figura 16).

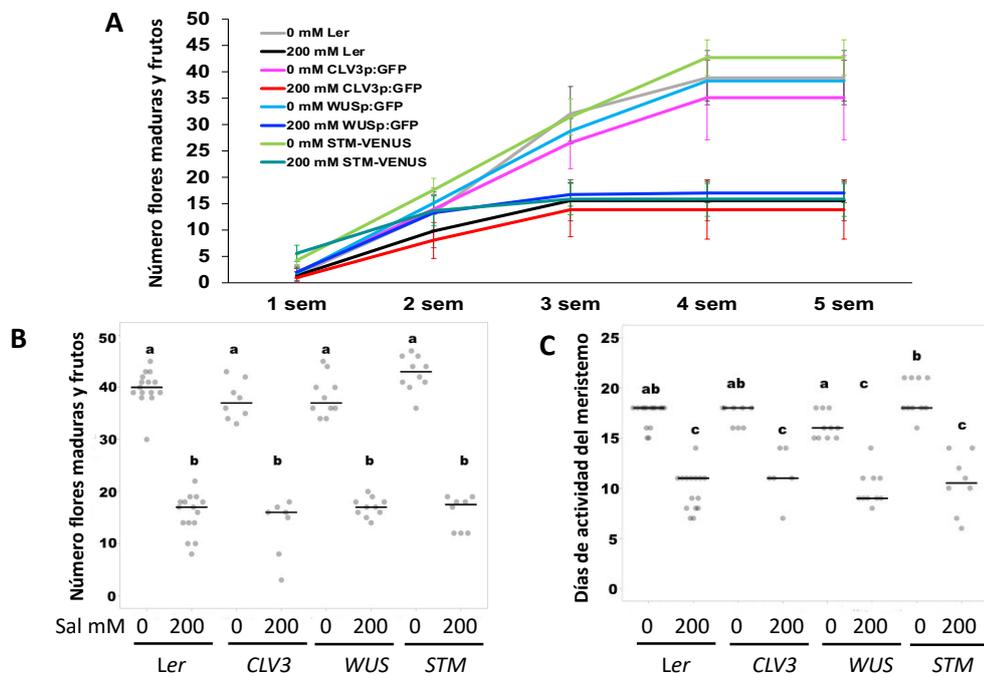


Figura 15. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de las líneas testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, *WUSp:GFP(-ER)* y *STMp:STM-VENUS* regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

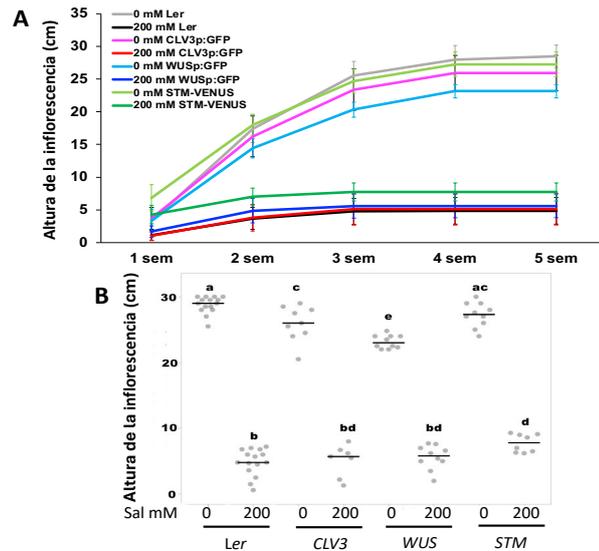


Figura 16. (A) Altura de la inflorescencia principal de las plantas de las líneas testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, *WUSp:GFP(-ER)* y *STMp:STM-VENUS*, regadas con 0 y 200 mM de sal después de la floración. En (A) la gráfica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por tratamiento. sem = semanas. (B) Altura de la inflorescencia principal de las líneas testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, *WUSp:GFP(-ER)* y *STMp:STM-VENUS* por tratamiento. En (B) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

A continuación, analizamos el contenido de clorofilas en las líneas testigo y observamos un patrón similar en todos los casos, en condiciones control y en sal, obteniéndose, en general, lecturas más bajas en la segunda semana tras la floración, al igual que habíamos observado en ensayos previos (figura 17).

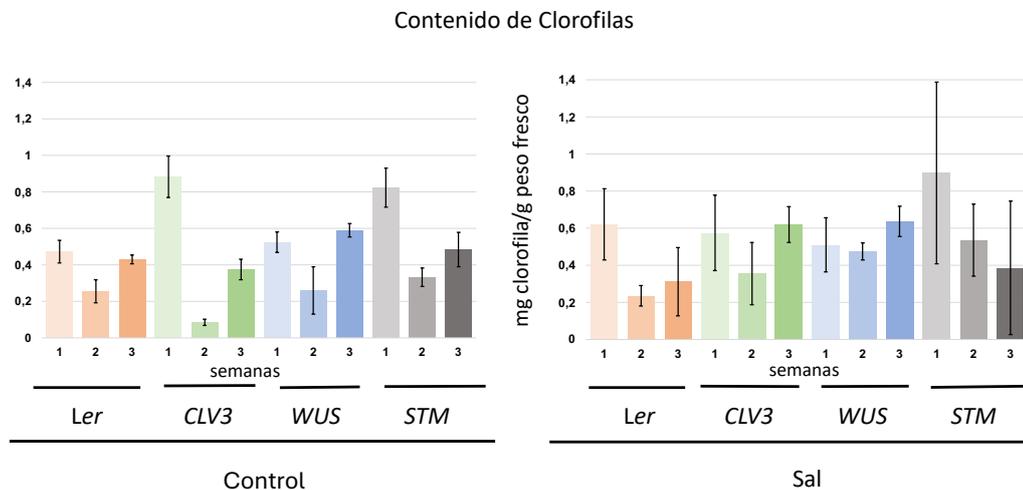


Figura 17. Cuantificación de clorofilas (mg de clorofila/g de peso fresco) en hojas de roseta de plantas de las líneas testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, *WUSp:GFP(-ER)* y *STMp:STM-VENUS* a las 1, 2 y 3 semanas después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, riego con agua del grifo suplementada con 200 mM de sal. La grafica representa el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento.

Respecto a antocianinas, los valores fueron muy bajos, prácticamente indetectables en las plantas tratadas con sal a la 1 y 2 semana tras la floración. Sí se observó un incremento notable a las 3 semanas en todas las líneas y de forma similar al parental silvestre *Ler*, lo que se relacionaría con un aumento en la intensidad del estrés (figura 18).

En resumen, el comportamiento de las líneas testigo fue muy similar al del parental silvestre en todos los parámetros de crecimiento y estrés analizados. Por tanto, estas líneas son una herramienta valiosa para analizar los posibles cambios en los patrones de expresión de *CLV3*, *WUS* y *STM* en plantas del ecotipo *Ler* sometidas a estrés salino.

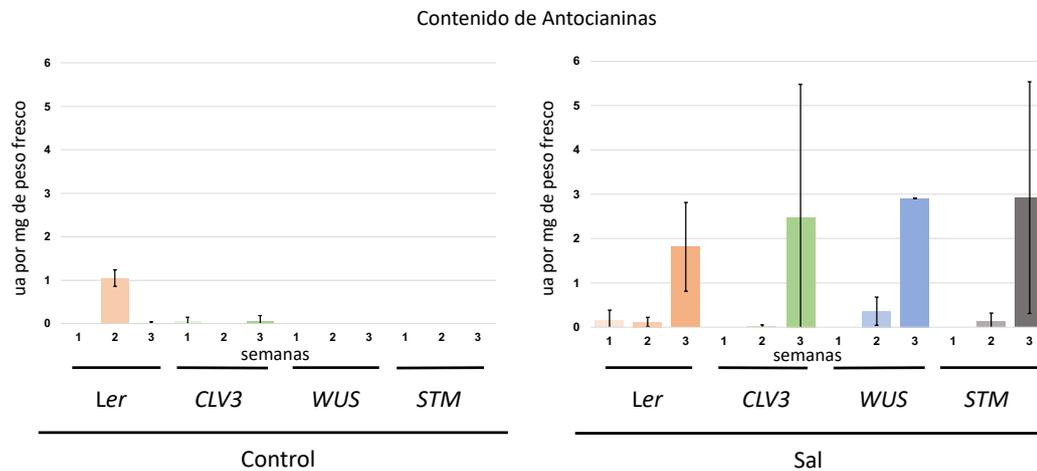


Figura 18. Cuantificación de antocianinas (ua\* por mg de peso fresco) en hojas de roseta de plantas de las líneas testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, *WUSp:GFP(-ER)* y *STMp:STM-VENUS*, a la 1, 2 y 3 semanas después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, riego con agua del grifo suplementada con 200 mM de sal. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo y tratamiento. \*ua=unidades arbitrarias.

#### 4.2.2 Análisis del tamaño del SAM en condiciones de estrés salino

Para estimar posibles variaciones en el tamaño del SAM como resultado de la exposición a estrés, se recogieron ápices inflorescentes a la 1, 2 y 3 semanas tras la floración, es decir desde el inicio del tratamiento. Las áreas se obtuvieron con el programa de análisis de imagen Fiji a partir de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

En condiciones control, el SAM disminuyó su tamaño progresivamente tras la floración, pasando de 6013  $\mu\text{m}^2$  en la primera semana a 1361  $\mu\text{m}^2$  en la tercera semana (reducción del 77%). Este efecto ya había sido descrito previamente: el meristemo va disminuyendo su tamaño conforme la planta va envejeciendo (Balanza *et al.*, 2018). Una posibilidad sería que el SAM vaya perdiendo células durante el desarrollo de la planta, es decir, que el balance entre las células que se incorporan a órganos laterales y las producidas por las células madre sea negativo. En condiciones de salinidad, el SAM era más pequeño (4351  $\mu\text{m}^2$ ) respecto al control una semana tras la floración. Durante las siguientes dos semanas su tamaño también se redujo progresivamente, pero en menor medida que en las plantas control, y se mantuvo más o menos constante entre la segunda (2858  $\mu\text{m}^2$ ) y la tercera semana (2414  $\mu\text{m}^2$ ). Como resultado, el SAM de las plantas bajo estrés salino era más grande que el de las plantas control a las 3 semanas después de la floración (figura 19). En resumen, nuestro análisis indica que hay una relación entre la actividad del SAM (producción de flores) y su tamaño. De este modo, SAMs más activos (en condiciones control) disminuyen

progresivamente de tamaño más rápido que en condiciones de salinidad, donde la producción de flores está restringida.

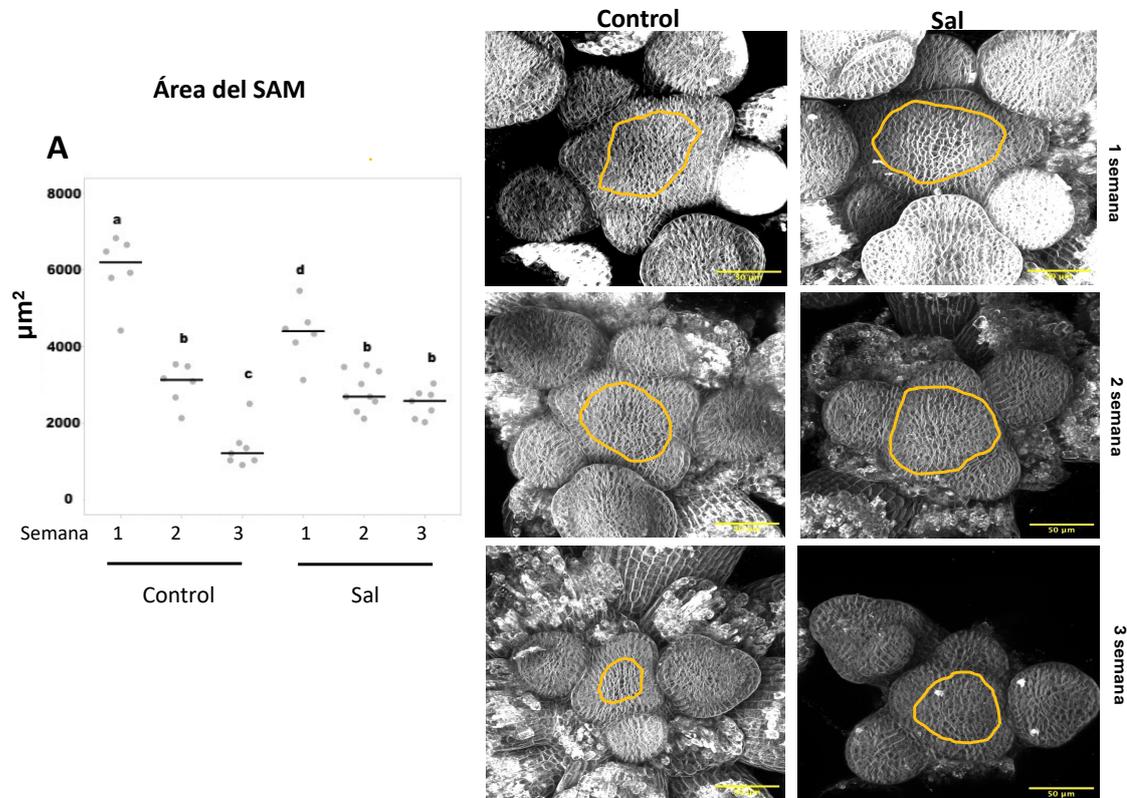


Figura 19. (A) Área del SAM en  $\mu\text{m}^2$  de plantas regadas con agua del grifo (izquierda) o agua del grifo suplementada con 200 mM de sal (derecha), durante 1, 2 y 3 semanas tras la floración. Los puntos representan observaciones independientes ( $n=16$ ) y las líneas horizontales la mediana. Las letras representan grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ). (B) Imágenes representativas del SAM de plantas regadas con agua del grifo (control) o agua del grifo suplementada con 200 mM NaCl (sal) durante 1, 2 y 3 semanas tras la floración. Los trazos amarillos delimitan el SAM. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.3. Análisis mediante líneas testigo fluorescentes de la red reguladora CLV3-WUS-STM

Como se ha descrito en la introducción, la red genética establecida por CLV3, un pequeño péptido señalizador y los factores transcripcionales WUS y STM tiene un papel central en la regulación de la actividad del SAM. Además, varios trabajos previos muestran como WUS y STM son puntos de entrada de información ambiental en las células del SAM (Pfeiffer *et al.*, 2017).

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal muestran que el dominio de expresión de *CLV3p:GFP(-ER)* se redujo progresivamente después de la floración en las plantas control, en línea con la disminución en el área del SAM observada. En las plantas regadas con sal, el dominio de expresión de *CLV3p:GFP(-ER)* era sensiblemente más pequeño respecto a las plantas control una semana después de la floración. Sin embargo, este dominio ya no se redujo más a las 2 y 3 semanas, en contraste con lo observado en los ápices control. Es decir, la variación en los dominios de expresión de *CLV3p:GFP(-ER)*, y

por tanto en el tamaño de la población apical de células madre, reflejaba los cambios en el tamaño del SAM, tanto en condiciones control como en sal (figura 20).

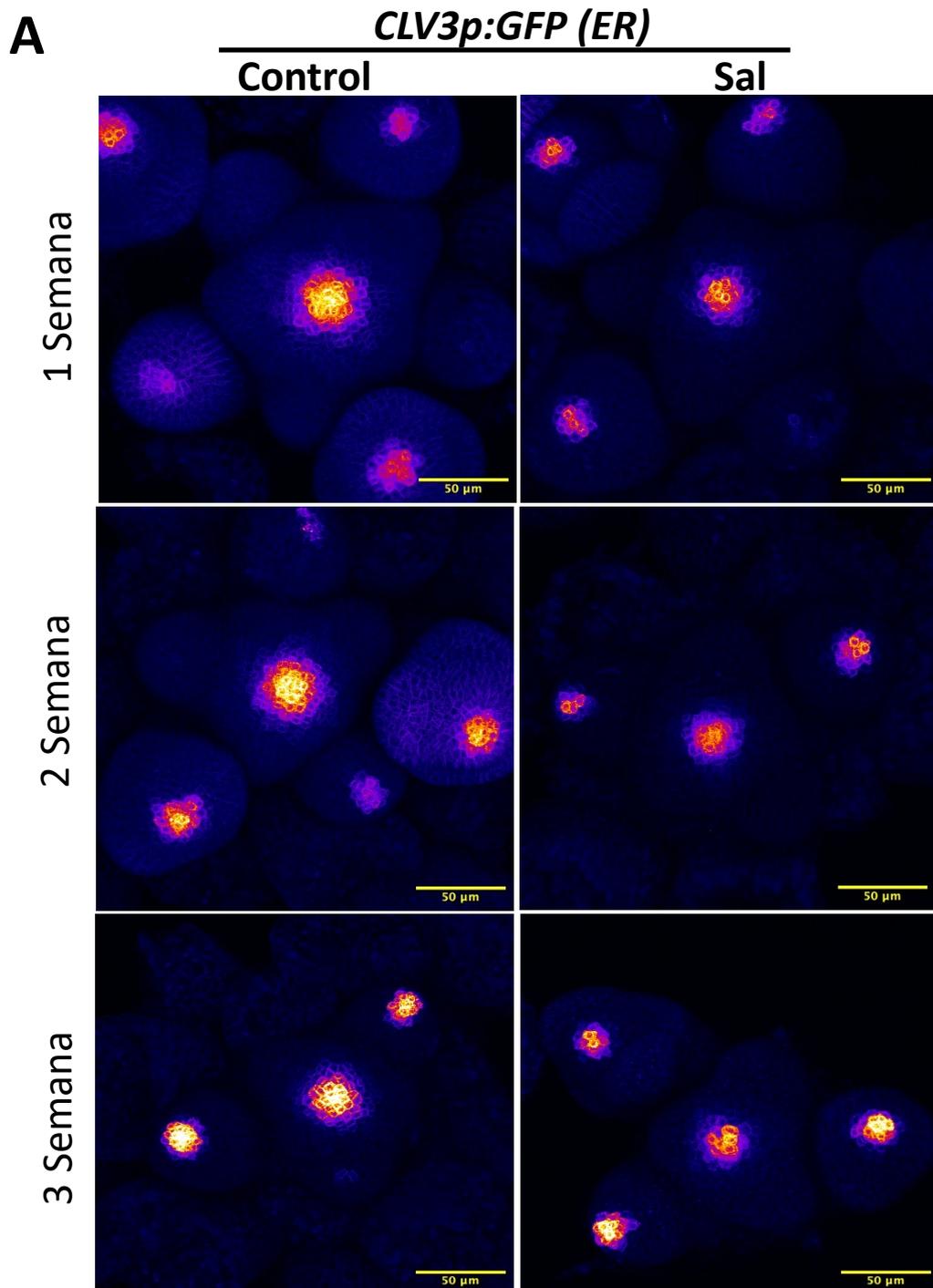


Figura 20. Imágenes representativas de la actividad de las línea testigo *CLV3p:GFP(-ER)*, a las 1, 2 y 3 semanas después de la floración en el ápice de la inflorescencia principal de plantas regadas con agua del grifo (control) y agua del grifo suplementada con 200 mM de NaCl (sal). Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

La actividad de la línea testigo *WUSp:GFP(-ER)* también se correlacionó con los cambios observados en el tamaño del SAM. Como se ha descrito (Balanza *et al.*, 2018), el área de expresión en las plantas control disminuyó con el tiempo, siendo prácticamente indetectable en el centro del SAM a la tercera semana

tras la floración. Bajo condiciones de salinidad, el dominio de expresión era menor respecto al control una semana tras la floración. Sin embargo, y de forma similar a lo observado en el testigo para CLV3, la reducción progresiva del área de expresión a las 2 y 3 semanas tras la floración fue menor respecto a las plantas control. Por lo tanto, después de 3 semanas de la floración, los niveles y el dominio de expresión de *WUSp:GFP(-ER)* fueron más altos en salinidad que en condiciones control (figura 21)-

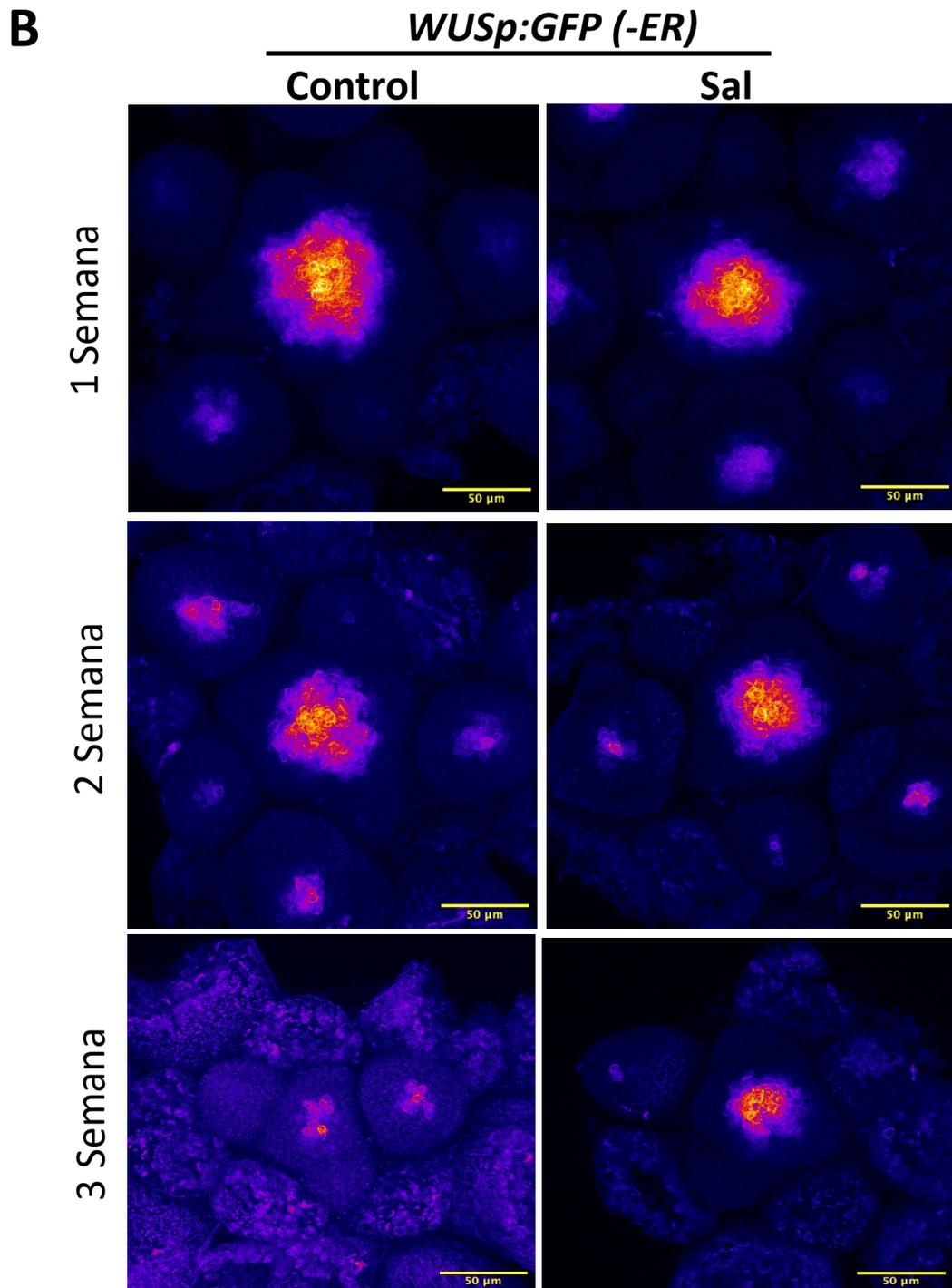


Figura 21. Imágenes representativas de la actividad de las líneas testigo *WUSp:GFP(-ER)*, a las 1, 2 y 3 semanas después de la floración en el ápice de la inflorescencia de plantas regadas con agua del grifo (control) y agua del grifo suplementada con 200 mM de NaCl (sal). Barras de escala, 50 µm.

La línea testigo *STMp:STM-VENUS* mostró un comportamiento completamente diferente. En condiciones control, sus niveles de actividad se mantuvieron constantes tras la floración, mientras que en condiciones salinas se observó una disminución muy drástica de su actividad, siendo prácticamente indetectable en el ápice a partir de la segunda semana después de la floración (figura 22). Es de destacar que estos cambios se observaron tanto en el SAM como en los meristemos florales, lo que sugiere una respuesta común frente al estrés.

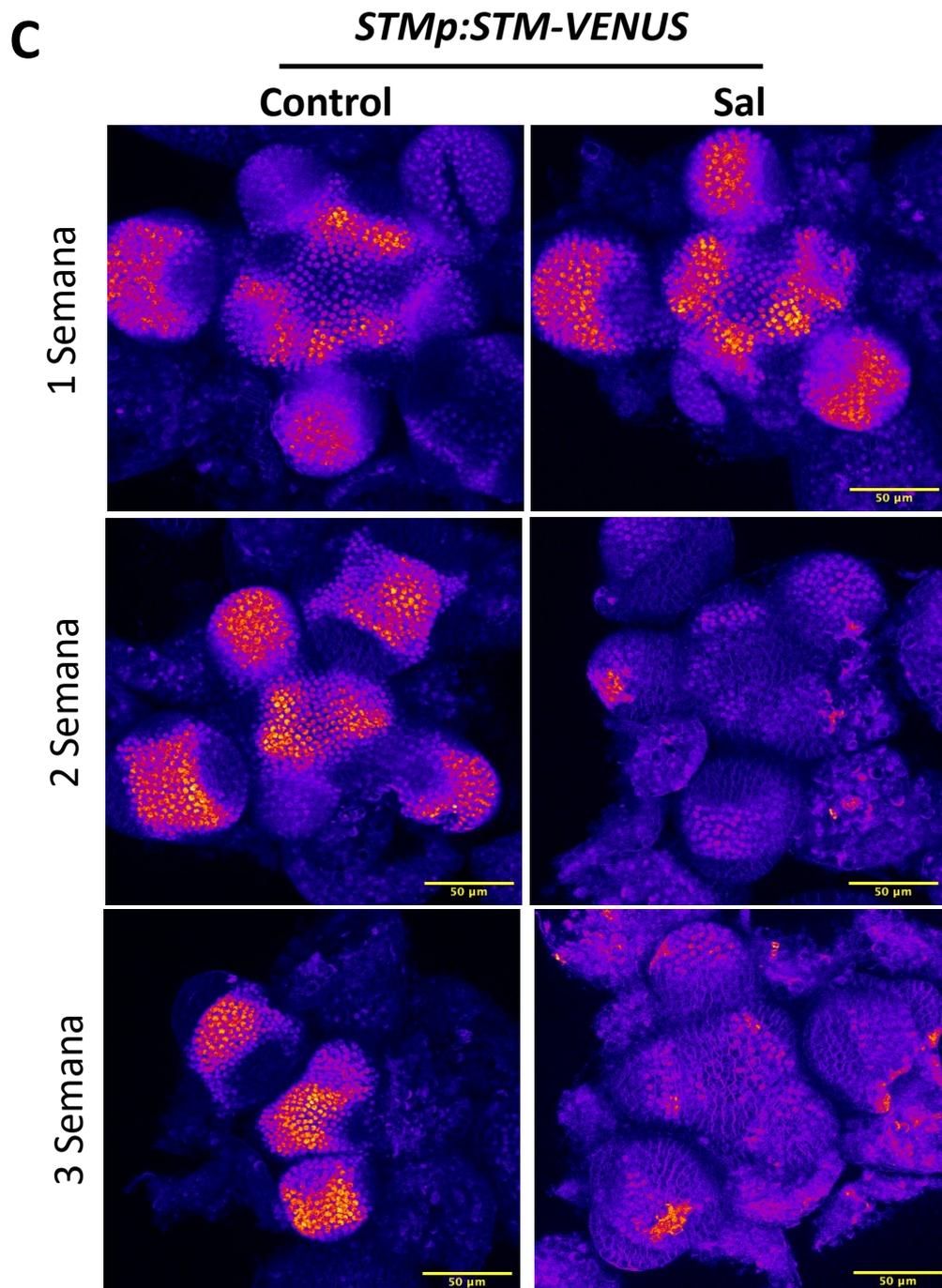


Figura 22. Imágenes representativas de la actividad de las líneas testigo *STMp:STM-VENUS*, a las 1, 2 y 3 semanas después de la floración en el ápice de la inflorescencia de plantas regadas con agua del grifo (control) y agua del grifo suplementada con 200 mM de NaCl (sal). Barras de escala, 50 µm.

### 4.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DEL SAM DE MUTANTES *dellaKO* y *bp* EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO

Una vez puestos a punto los ensayos de salinidad, nos pareció interesante estudiar cómo se comporta el SAM de los mutantes *dellaKO* y *bp* frente al estrés salino. *dellaKO* es un mutante de pérdida de función en las 5 proteínas DELLA de Arabidopsis (Achard *et al.*, 2006; Achard *et al.*, 2008) que, como se ha comentado en la introducción son reguladoras de las respuestas defensivas de la planta. En condiciones control, los mutantes *dellaKO* presentan un SAM más grande que produce más flores que el silvestre (Serrano-Mislata *et al.*, 2017). Por otra parte, se ha descrito que los mutantes de pérdida de función en *bp*, un gen *KNOX*, muestran mayor susceptibilidad al estrés (Cai *et al.*, 2023) y que, en general, la actividad de los genes *KNOX* favorece la tolerancia a sal (Cai *et al.*, 2023; Cao *et al.*, 2023). Pero, ¿de qué forma se ve la actividad del SAM alterada por el estrés?

En un primer ensayo, se regaron las plantas con concentraciones bajas de sal (50 y 100 mM de NaCl), que apenas tenían impacto en la actividad del SAM de plantas silvestres (figura 5).

En el mutante *dellaKO*, observamos que con 50 mM de sal hubo una ligera reducción en el número total de flores producidas respecto a las plantas control, pero no significativa. Esta reducción sí fue significativa en las plantas regadas con 100 mM de sal, estando la producción de flores en el rango de las producidas por las plantas silvestres *Ler* sin estrés. Del mismo modo, el periodo de actividad del meristemo de las plantas *dellaKO* se redujo significativamente en las plantas regadas con 100 mM NaCl (figura 23).

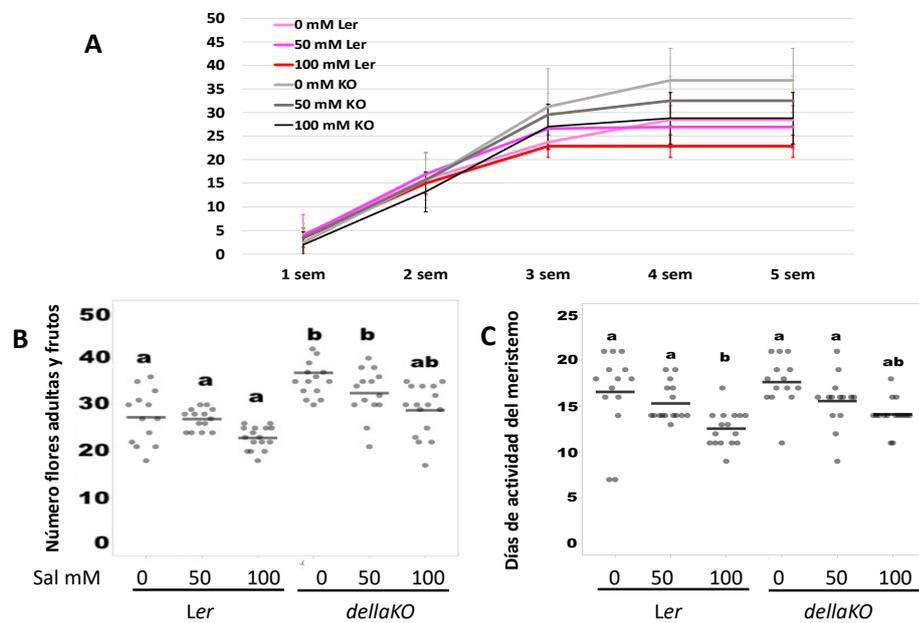


Figura 23. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas mutantes *dellaKO* regadas con 0, 50 y 100 mM de sal después de la floración. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ ).

El comportamiento del mutante *bp-1* fue completamente diferente: ni el número de total de flores producidas ni el periodo de actividad del SAM se vieron afectados por el riego con sal. En condiciones control, *bp-1* produjo menos flores que el parental silvestre, lo que está de acuerdo con el papel de los genes KNOX en promover la función meristemática (figura 24).

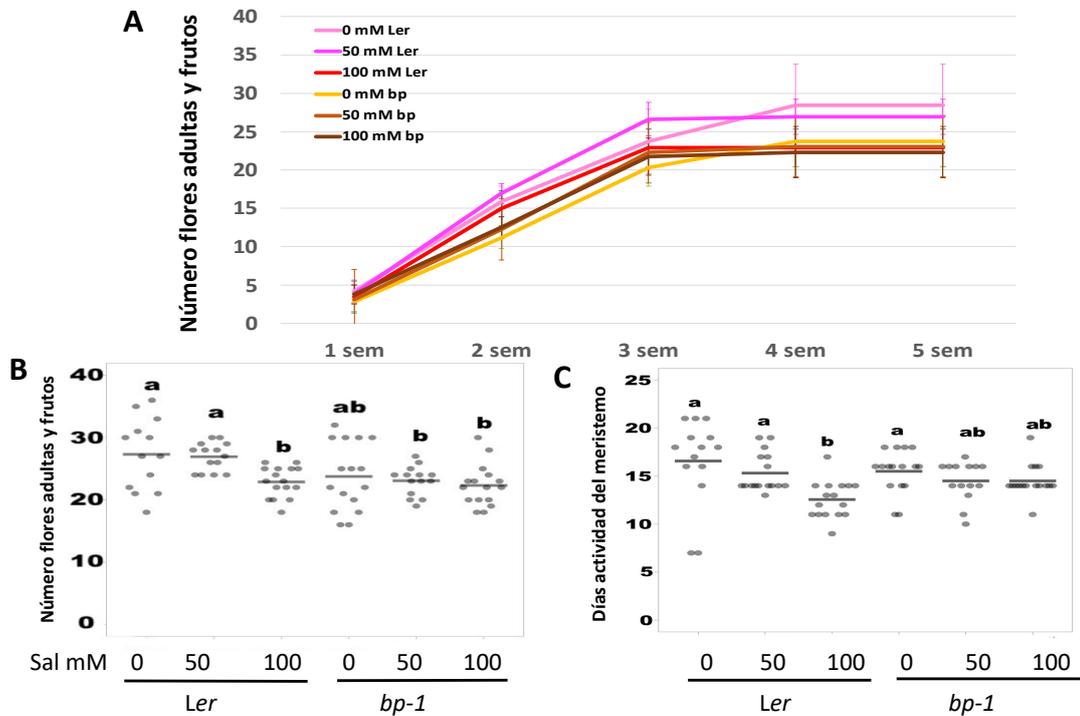


Figura 24. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante *bp-1* regadas con 0, 50 y 100 mM de sal después de la floración. (B) Número total de flores por línea y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo por línea y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes ( $n=16$ ) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0,05$ ).

A continuación, probamos aumentar la concentración de sal a 150 y 200 mM de NaCl, manteniendo constantes el resto de condiciones de crecimiento. Se tomaron muestras a las 2 y 3 semanas después de la floración para cuantificar clorofilas.

El mutante *dellaKO* presentó una disminución significativa en el número de flores producidas en ambos tratamientos respecto a las condiciones control. Asimismo, el periodo de actividad también se vio notablemente reducido, incluso a 150 mM de sal, condiciones que tienen un efecto más moderado en el parental *Ler* (figura 25 y 26). En resumen, el análisis realizado indica que la actividad del SAM de los mutantes *dellaKO* es más sensible a la salinidad que la del parental silvestre.

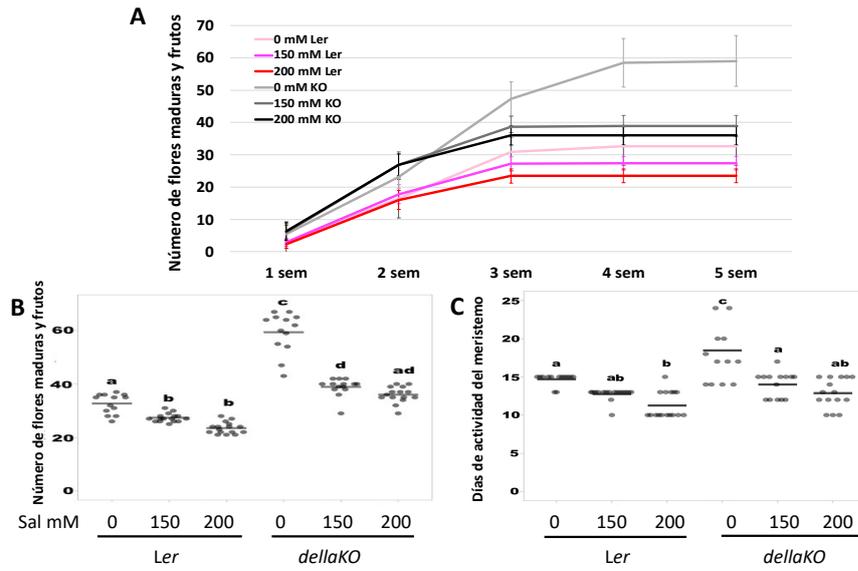


Figura 25. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante *dellaKO* regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0,05$ ).



Figura 26. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del mutante *dellaKO*, regadas con 0 (izquierda) y 200 mM de sal (derecha), a las 2 semanas y a las 3 semanas después de la floración. La sal redujo la altura de la planta, la superficie foliar y el número de flores y frutos.

En general, los niveles de clorofilas fueron un poco más bajos en *dellaKO* en comparación con el parental silvestre, tanto en salinidad como en condiciones control, lo que está de acuerdo con el papel descrito

para las proteínas DELLA en la biosíntesis de clorofilas (Cheminant *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014). En todo caso, las diferencias fueron pequeñas y no parece ser una razón de peso que explique la hipersensibilidad del SAM de las plantas *dellaKO* frente a la salinidad (figura 27).

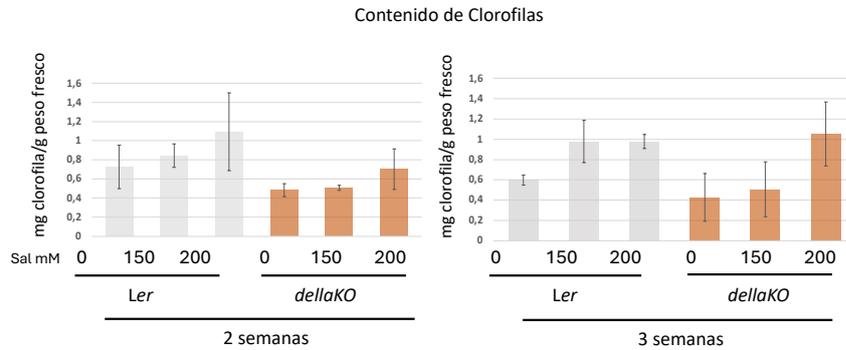


Figura 27. Cuantificación de clorofilas (mg de clorofilas/g de peso fresco) en hojas de roseta de plantas silvestres del ecotipo Ler y el mutante *dellaKO*, en la 2 y 3 semana después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, riego con agua del grifo suplementada con 200 mM de sal. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo y tratamiento.

Mientras que 150 mM de sal tenía un impacto en la actividad del SAM de las plantas silvestres, el SAM de los mutantes *bp-1* solo se vio afectado (tanto si se considera la producción de flores como el periodo de actividad) cuando la concentración de sal en el riego se subió a 200 mM. Por tanto, el SAM de *bp* se mostró hiposensible a la salinidad (figura 28 y 29)

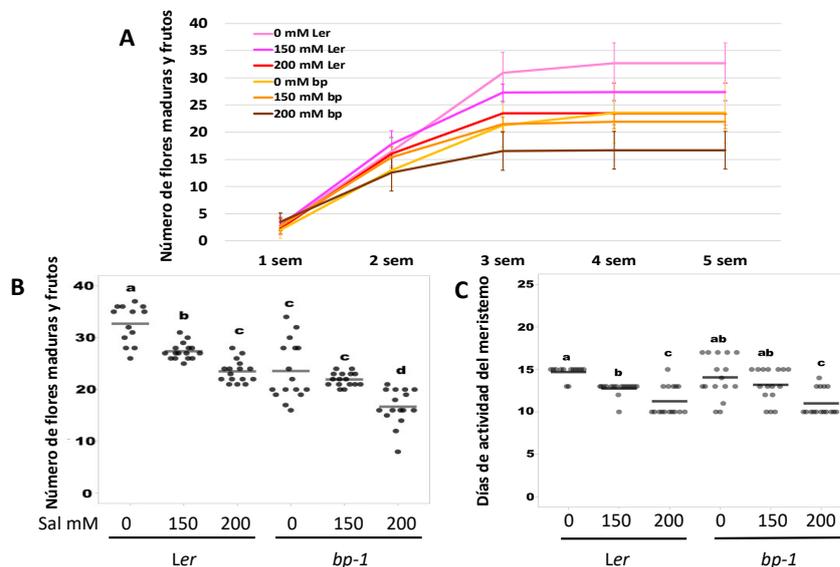


Figura 28. (A) Número acumulado de flores y frutos en la inflorescencia principal de plantas de la línea mutante *bp-1* regadas con 0, 150 y 200 mM de sal después de la floración. La grafica representa el promedio y la desviación estándar de 16 plantas por línea y tratamiento. sem=semanas. (B) Número total de flores en la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. (C) Días de actividad del meristemo de la inflorescencia principal por línea y por tratamiento. En (B-C) los puntos representan observaciones independientes (n=16) y las líneas horizontales negras indican la mediana. Las letras indican grupos estadísticos obtenidos mediante ANOVA unidireccional ( $p < 0.05$ )

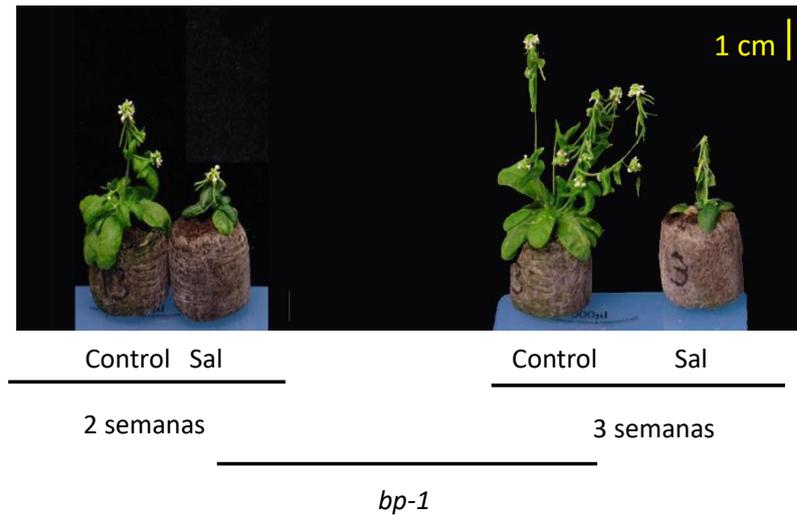


Figura 29. Imágenes representativas de la inflorescencia de plantas del mutante *bp-1*, regadas con 0 (izquierda) y 200 mM de sal, a las 2 semanas y a las 3 semanas después de la floración. El efecto de la sal se manifestó en una disminución evidente en la altura de la planta, reducción de la superficie foliar y reducción del número de flores y frutos.

El contenido de clorofilas en el mutante *bp-1* no presentó diferencias significativas entre la segunda y tercera semana ni respecto a plantas silvestres *Ler* (figura 30).

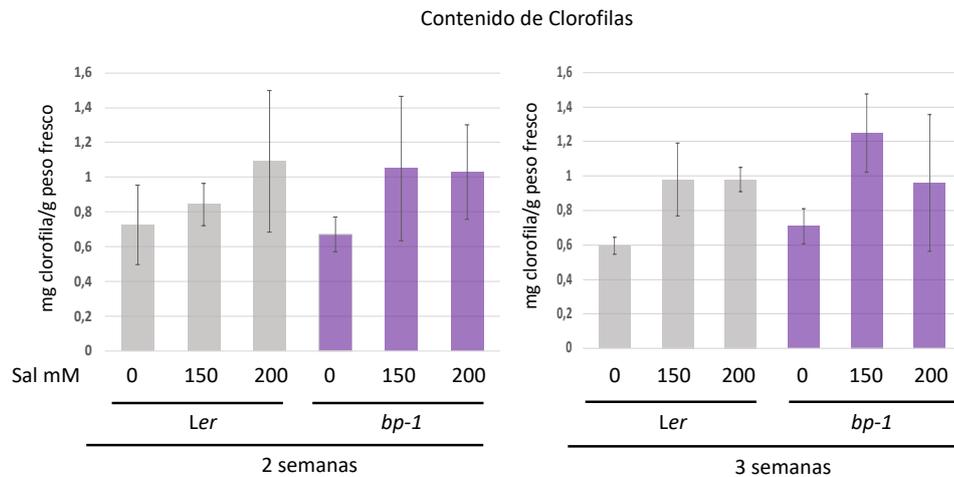


Figura 30. Cuantificación de clorofilas (mg de clorofilas/g de peso fresco) en hojas de roseta de plantas silvestres del ecotipo *Ler* y el mutante *bp-1*, en la 2 y 3 semana después de la floración. Control, riego con agua del grifo. Sal, agua del grifo suplementada con 200 mM sal. Las gráficas representan el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo y tratamiento.

#### 4.4. ANÁLISIS DE VARIACIÓN NATURAL EN EL DESARROLLO REPRODUCTIVO DE ARABIDOPSIS EN RESPUESTA A SALINIDAD.

El objetivo de este ensayo fue explorar la variación natural de *Arabidopsis* con el objetivo de identificar nuevos reguladores del desarrollo reproductivo en condiciones de salinidad.

##### 4.4.1. Optimización de ensayos

Se analizaron 18 ecotipos de la colección Ibérica elegidos al azar y sin requerimiento teórico de vernalización (Mendez-Vigo et al., 2011), más *Ler* y *Col*, que se cultivaron en las cabinas de uso común del invernadero. A partir de la floración el riego se realizó con agua del grifo (control), o suplementada con 150 o 300 mM de NaCl. Se contó el número de flores a las 2 y 3 semanas tras el inicio de los tratamientos.

Una concentración de 150 mM de sal fue suficiente para observar variabilidad en el número de flores producidas entre los diferentes ecotipos (figura 31). Por otro lado, observamos que la concentración de 300 mM de sal era excesiva, ya que la mayoría de los ecotipos no llegaron a producir flores antes de senescer. *Ler* y *Col* nos sirvieron como control al ser ecotipos descritos como tolerantes a la sal (Zhu, 2000).

Un primer parámetro que se midió fue el área de roseta en el momento de la floración. El objetivo era determinar si existía una relación entre el número de flores producidas y la biomasa vegetativa en el momento de la transición floral. Por ejemplo, plantas con más biomasa foliar podrían ser más tolerantes y producir más flores. Se detectó variación entre los 20 ecotipos, *Ler* presentó la menor área ( $352,7 \text{ mm}^2$ ) y *Cha0* la mayor área ( $1288 \text{ mm}^2$ ) (figura 31).

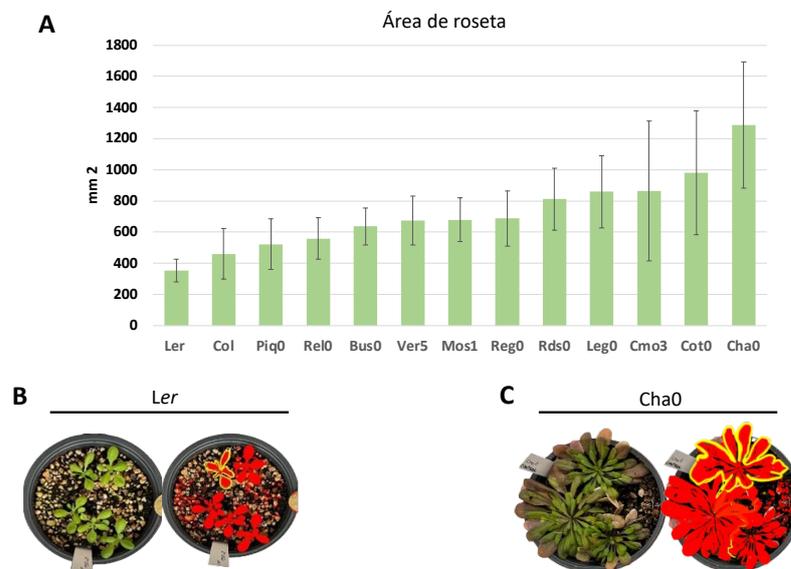


Figura 31. (A) Área de la roseta de los ecotipos estudiados al inicio de la floración. La grafica representa el promedio y la desviación estándar de 5 muestras por ecotipo. (B) Determinación del área roseta con Fiji. Se muestran ejemplos para los ecotipos *Ler* (con la roseta más pequeña) y *Cha0* (con la roseta más grande).

Por otra parte, también observamos variación entre los ecotipos al calcular la ratio entre el número de flores producidas en salinidad respecto a condiciones control (figura 32). A continuación, determinamos si existía una posible relación entre el área de roseta y la ratio de flores producidas (figura 33 y 34).

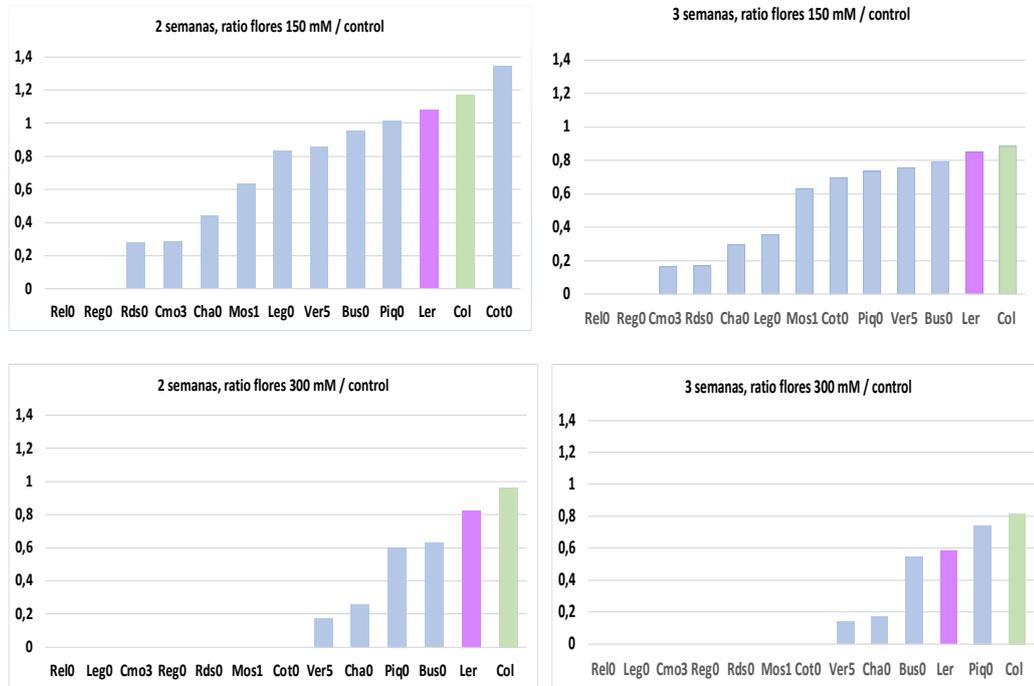


Figura 32. Ratio entre el número de flores producidas en sal (150 o 300 mM NaCl) y el número de flores producidas en condiciones control para los diferentes ecotipos bajo estudio a las 2 y 3 semanas tras la floración. 5 plantas por ecotipo y tratamiento fueron analizadas.

No observamos una correlación positiva entre el área de roseta en la floración y la ratio de flores producidas en salinidad respecto a control. Es decir, había ecotipos con rosetas pequeñas que produjeron muchas flores o viceversa (figura 33 y 34).

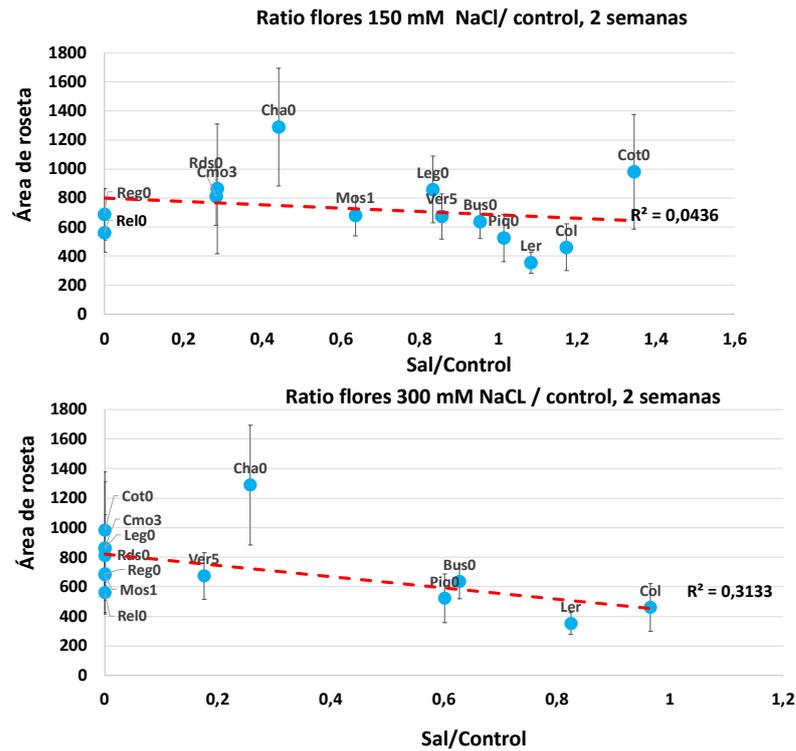


Figura 33. Relación entre el área de la roseta y la ratio de flores producidas en sal, 150 mM (arriba) y 300 mM NaCl (abajo) a la 2 semana después de la floración. Los puntos azules representan cada ecotipo (promedio) y las barras la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento. La línea roja muestra la regresión a través de los datos, indicándose el valor de  $R^2$  a la derecha.

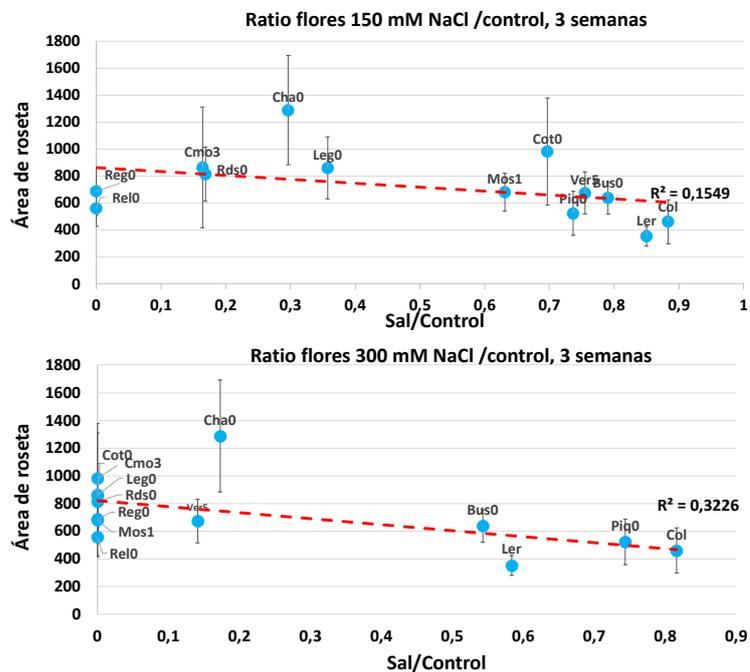


Figura 34. Relación entre el área de la roseta y la ratio de flores producidas en sal, 150 mM (arriba) y 300 mM NaCl (abajo) a la 3 semana después de la floración. Los puntos azules representan cada ecotipo (promedio) y las barras la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento. La línea roja muestra la regresión a través de los datos, indicándose el valor de  $R^2$  a la derecha.

Asimismo, medimos la cantidad de clorofilas en hojas de roseta a las 2 y 3 semanas tras el inicio del tratamiento que relacionamos con la ratio (sal/control) de flores producidas. No sorprendentemente, observamos ciertas correlaciones positiva entre la cantidad de clorofilas y la producción de flores en sal.

Esta correlación fue más fuerte al aumentar la extensión (de 2 a 3 semanas) y la intensidad del tratamiento (de 150 a 300 mM de sal) (figura 35 y 36).

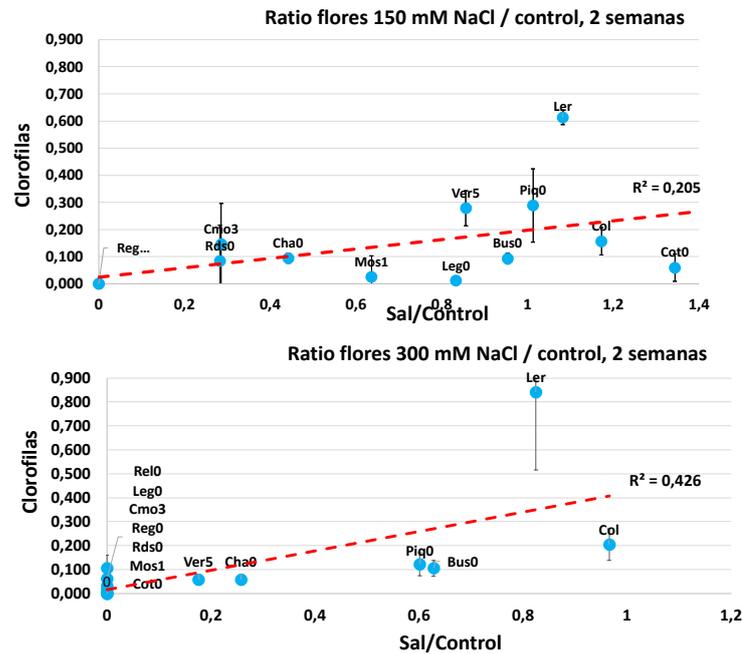


Figura 35. Graficas representan la relación entre la cantidad de clorofilas y la ratio de flores producidas en sal, 150 mM (arriba) y 300 mM NaCl(abajo) respecto al control en las 18 líneas Ibéricas, más Ler y Col, a la 2 semana después de la floración. Los puntos representan cada ecotipo (promedio) y las barras la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento. La línea roja muestra la regresión a través de los datos, indicándose el valor de  $R^2$  a la derecha.

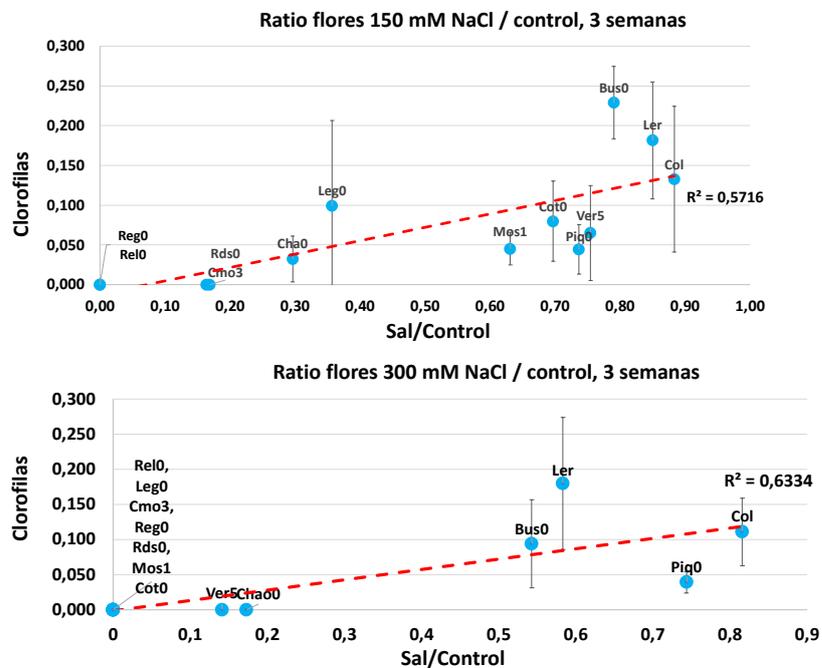


Figura 36. Graficas representan la relación entre la cantidad de clorofilas y la ratio de flores producidas en sal, 150 mM (arriba) y 300 mM NaCl (abajo) respecto al control en las 18 líneas Ibéricas, más Ler y Col, a la 3 semana después de la floración. Los puntos representan cada ecotipo (promedio) y las barras la desviación estándar de 5 muestras por tratamiento. La línea roja muestra la regresión a través de los datos, indicándose el valor de  $R^2$  a la derecha.

La producción de flores sí guardó cierta relación con la condición de la planta: ecotipos más sanos (con más clorofila), produjeron más flores. Sin embargo, los niveles de clorofilas no explicaban toda la variabilidad observada y, de hecho, un porcentaje importante de la misma debía proceder de otros factores adicionales. También es importante considerar que la variabilidad obtenida en las mediciones fue muy grande. En general, las plantas no crecieron bien durante este ensayo, con fuentes de estrés adicionales como, por ejemplo, una presencia masiva de pulgón en el invernadero.

En resumen, descartamos la concentración de 300 mM de sal para los próximos ensayos ya que el estrés fue demasiado intenso y muchos ecotipos no llegaron a formar flores. Seleccionamos 150 mM de sal en riego tras la floración durante 3 semanas para realizar el análisis GWAs. Además, vernalizamos todos los ecotipos a analizar durante 2 meses a 4°C para inducir y homogeneizar la floración.

#### 4.4.2. Ensayo de variación natural en el desarrollo reproductivo en condiciones de estrés por sal

Durante este TFM solo dio lugar a realizar un primer ensayo con 58 ecotipos de la población Ibérica, y los ecotipos Landsberg *erecta* (*Ler*) y Columbia (*Col*) como controles. En este caso, las plantas se cultivaron en fitotron, por tanto, con condiciones más controladas. Como se ha comentado, las plantas se vernalizaron 2 meses a 4°C para inducir y sincronizar la floración de los ecotipos. Tras la floración el riego se realizó una vez por semana con 0 y 150 mM de sal. A las 3 semanas se contó el número total de estructuras reproductivas (yemas florales, flores adultas y frutos) en la inflorescencia principal. Se determinó qué porcentaje del total de estructuras reproductivas correspondía a yemas cerradas que no habían progresado a la fase adulta. Un trabajo reciente muestra que la acumulación de ABA (hormona señalizadora de estrés) en el ápice de la inflorescencia provoca el arresto del desarrollo floral (Sanchez-Gerschon *et al.*, 2024). También se midió la altura de la inflorescencia principal y se determinó el peso de la inflorescencia sin la roseta (este dato no arrojó grandes diferencias y no se ha incluido en el análisis).

En todos los casos se consideró la ratio sal/control, por lo tanto, si esta ratio era: >1 más crecimiento en sal, =1 igual crecimiento en sal, < 1 menor crecimiento en sal.

Los 3 caracteres analizados (altura, número de estructuras reproductivas y porcentaje de yemas cerradas) mostraron variación natural entre los 60 ecotipos analizados. El carácter con más impacto de la sal fue la altura de la inflorescencia, lo que está de acuerdo con nuestro análisis previo, y el que menos la producción de flores (figura 37—39)

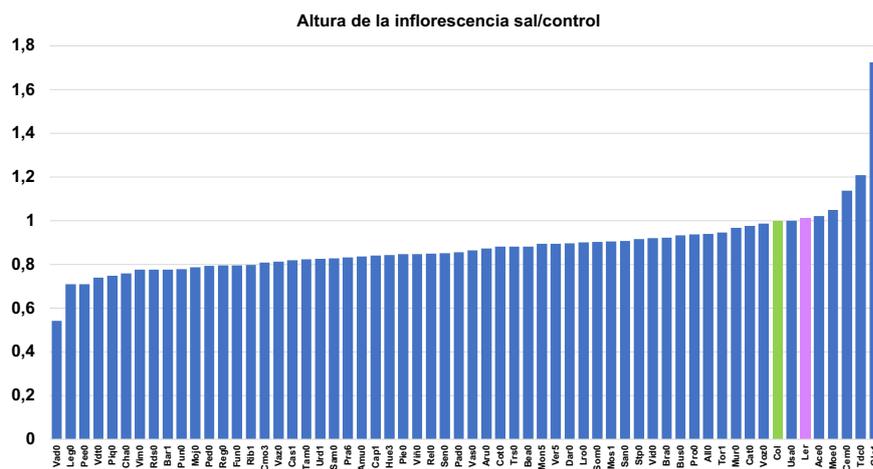


Figura 37. Ratio sal/control para la altura de la inflorescencia en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más Ler y Col. Las plantas se regaron con agua del grifo (control) o 150 mM NaCl (sal) durante 3 semanas después de la floración. Los valores para obtener las ratios se obtuvieron a partir de 5 plantas por ecotipo.

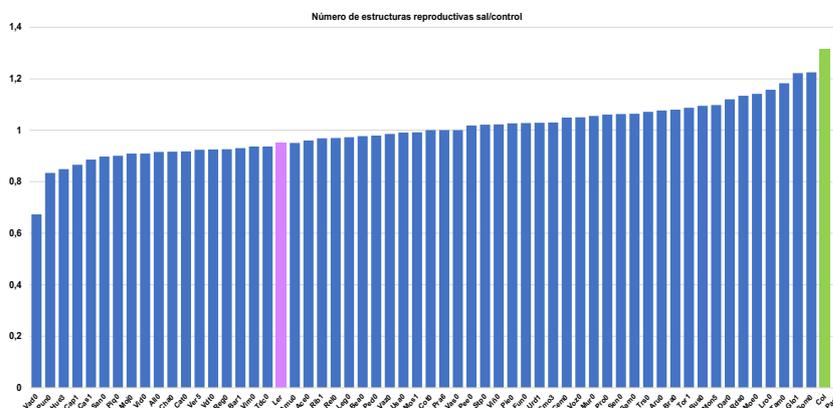


Figura 38. Ratio sal/control para el número de estructuras reproductivas en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más Ler y Col. Las plantas se regaron con agua del grifo (control) o 150 mM NaCl (sal) durante 3 semanas después de la floración. Los valores para obtener las ratios se obtuvieron a partir de 5 plantas por ecotipo.

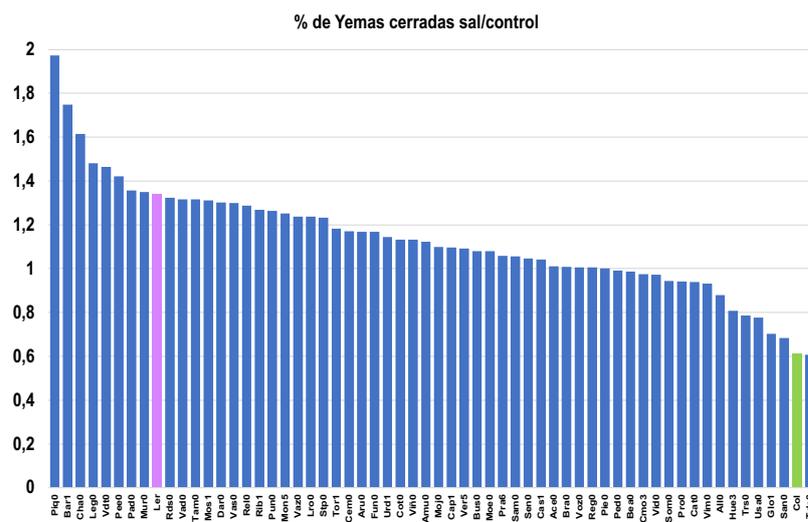


Figura 39. Ratio sal/control para el porcentaje de yemas cerradas en 58 ecotipos de la colección Ibérica, más Ler y Col. Las plantas se regaron con agua del grifo (control) o 150 mM NaCl (sal) durante 3 semanas después de la floración. Los valores para obtener las ratios se obtuvieron a partir de 5 plantas por ecotipo.

Considerando los 3 caracteres juntos, encontramos ecotipos con mayor tolerancia a la salinidad (más estructuras reproductivas, altura y menor porcentaje de yemas cerradas) como Col, Glo1 y Som0 y ecotipos con mayor susceptibilidad a la salinidad, como Vad0, Pun0 y Piq0 (menos estructuras reproductivas, altura y mayor porcentaje de yemas cerradas). Se localizó su posición geográfica, pero no fue posible determinar algún patrón relacionado con la tolerancia y su ubicación (figura 40 y 41).

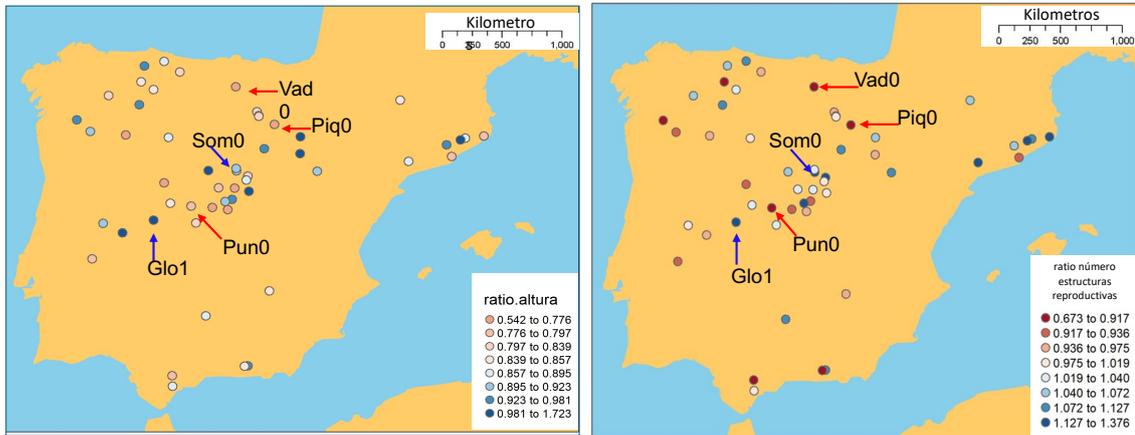


Figura 40 Mapa con la distribución de los 58 ecotipos de la colección Ibérica analizados, coloreados según la ratio altura (sal/control) (izquierda), y según la ratio número estructuras reproductivas (sal/control) derecha. Glo1 y Som0 (mayor tolerancia a la sal), Vad0, Piq0 y Pun0 (mayor susceptibilidad a la sal).

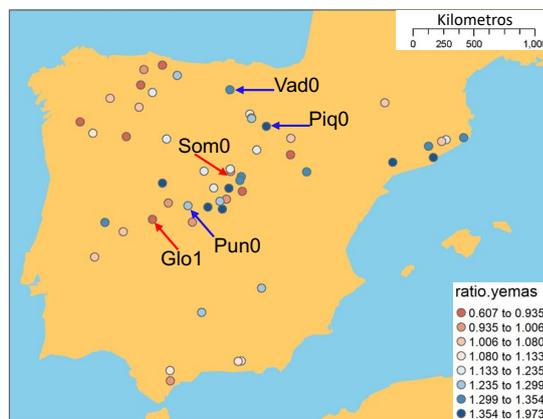


Figura 41. Mapa con la distribución de los 58 ecotipos de la colección Ibérica analizados, coloreados según la ratio % de yemas cerradas (sal/control). Glo1 y Som0 (menor susceptibilidad a la sal), Vad0, Piq0 y Pun0 (mayor susceptibilidad a la sal).

## 5. DISCUSIÓN

La salinidad del suelo es uno de los principales factores limitantes para la producción de cultivos de interés agronómico. En la actualidad, cerca del 10% de las tierras de cultivo están salinizadas (FAO, GlobalmapSAS., 2024) como consecuencia de malas estrategias de cultivo, mala calidad del agua o de la introducción de agua salobre dentro del agua de riego. En respuesta, las plantas han desarrollado mecanismos para protegerse, tolerar o adaptarse al daño causado por el exceso de sal. Si bien un número importante de trabajos han estudiado el impacto de la salinidad en caracteres como el desarrollo de la raíz (Lee *et al.*, 2022) o la germinación (Nanda *et al.*, 2020), apenas se sabe cómo la salinidad afecta a la actividad del SAM y, por tanto, a la producción de frutos y semillas. Por tanto, nuestro objetivo fue optimizar las condiciones experimentales para analizar la actividad del SAM en plantas de *Arabidopsis* sometidas a estrés salino.

Una primera observación fue que, en los dos ecotipos de *Arabidopsis* más populares en investigación (Col y Ler), concentraciones de 50 o 100 mM de sal en riego apenas afectaron a la producción de flores. Sin embargo, la longitud de la inflorescencia disminuyó considerablemente, mostrando ser un carácter más sensible a la salinidad. Quizá bajo estrés se limite más la distribución de las células hacia los tejidos del tallo que hacia la producción de flores, la cual garantizaría el establecimiento de la siguiente generación. Otra posibilidad sería que etapas posteriores del desarrollo del tallo se vean afectadas. Concentraciones de sal más altas, 200 mM NaCl, sí restringieron a la producción de flores. Este efecto fue menor en las plantas del ecotipo Col, cuyo SAM parece tolerar mejor el estrés. Este resultado difiere de trabajos previos que indica que las plantas del ecotipo Ler muestran mejor tolerancia a la sal durante el desarrollo vegetativo (Lee *et al.*, 2022). Esto remarca la importancia de analizar las respuestas frente a estrés específicamente en el órgano y estadio de desarrollo de interés.

En general, los cambios detectados en la tasa de producción de flores mostraron relación con la dinámica de crecimiento (tamaño del SAM) y la actividad de reguladores clave del mismo, como el sistema CLV3-WUS-STM. En respuesta a salinidad, la producción de flores disminuyó primero para parar completamente si el estrés persistía. Esto se relacionaba con una disminución inicial del tamaño del SAM, que ya apenas varió con la parada. En contraste, el SAM disminuía progresivamente de tamaño con el tiempo en las plantas control, como se ha descrito (Balanza *et al.*, 2018).

El análisis de líneas testigo fluorescentes sugiere que la disminución inicial en la producción de flores en respuesta a la salinidad podría ser consecuencia de la bajada en los niveles de expresión de *CLV3* y *WUS*. Es decir, en una primera fase de la respuesta se producen menos flores, el SAM reduce su tamaño y el sistema CLV3-WUS aparece ligeramente reprimido. Si el estrés persiste, la actividad del SAM se para completamente y éste no disminuye más de tamaño. Esta parada total podría estar relacionada con una bajada brusca en los niveles de STM, como apoya el análisis de líneas testigo. Trabajos previos ya han relacionado a STM con la integración de señales de estrés en el SAM (Pfeiffer *et al.*, 2017), aunque como los niveles de STM se relacionan con cambios en la actividad del SAM no se había descrito. En el momento

de la parada, los niveles de *WUS* y *CLV3* se mantuvieron constantes, sin bajar más. Una posibilidad es que los niveles de *WUS* no varíen porque no hay nueva producción de frutos. Trabajos previos (Balanza *et al.*, 2018) apoyan la existencia de una señal procedente de los frutos o semillas que regula negativamente los niveles de *WUS*. Es decir, los niveles de *WUS* podrían responder tanto a la señal por sal en inflorescencias jóvenes como, posteriormente, a la señal procedente de frutos o semillas. En el caso de *STM*, la respuesta principal parece ser al estrés. En Balanza *et al.*, 2018 se muestra como los niveles de *STM* no varían con la edad o producción de frutos por la planta. En resumen, nuestro análisis indica la existencia de dos fases en la respuesta del SAM a la salinidad:

- Una fase inicial donde disminuye la tasa de producción de flores, el SAM reduce su tamaño y bajan los niveles de expresión de *WUS* y *CLV3*.
- Una segunda fase donde la actividad del SAM se para por completo y no varía de tamaño, entra en una especie de estado de quiescencia. Este estado está relacionado con el mantenimiento de niveles constantes de expresión de *WUS* y *CLV3*, mientras *STM* baja dramáticamente. Destacar que estos cambios se observaron tanto en el SAM como en los meristemas florales, lo que apoya una regulación común en la respuesta frente al estrés.

Trabajos previos muestran que ER controla la actividad del SAM a través de restringir la expresión de *WUS* y *CLV3* (Nanda *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Por tanto, ER podría ser un candidato a regular la actividad del SAM en condiciones de estrés, al menos durante la exposición inicial al mismo, caracterizada por la bajada en la expresión de *WUS* y *CLV3*. Es decir, la señal de estrés podría transmitirse a las células del SAM a través de ER (figura 42). De hecho, la actividad de ER favorece la tolerancia a estrés abiótico. Por ejemplo, la expresión de una versión truncada de la proteína *ERECTA* mejora la tasa de germinación, la formación de biomasa y la homeostasis iónica en soja (Shanmugam *et al.*, 2020). De acuerdo con trabajos previos (Nanda *et al.*, 2020), nosotros observamos que la actividad del SAM de los mutantes *er-105* era hipersensible al estrés por sal. Este efecto bien podría deberse al papel de ER en el SAM o a la regulación de otras respuestas defensivas de la planta ya que los niveles de antocianinas eran más altos en las hojas de los mutantes *er-105* tratados con sal, lo que podría indicar un mayor grado de estrés en la planta. En resumen, nuestro trabajo apoya que ER tiene una función en el control de la actividad del SAM bajo estrés, pero aún debemos realizar otros experimentos para determinar y poder entender cuál es esta función.

En base al análisis de líneas testigo fluorescentes realizado, proponemos el siguiente modelo de regulación de la actividad del SAM bajo estrés salino:

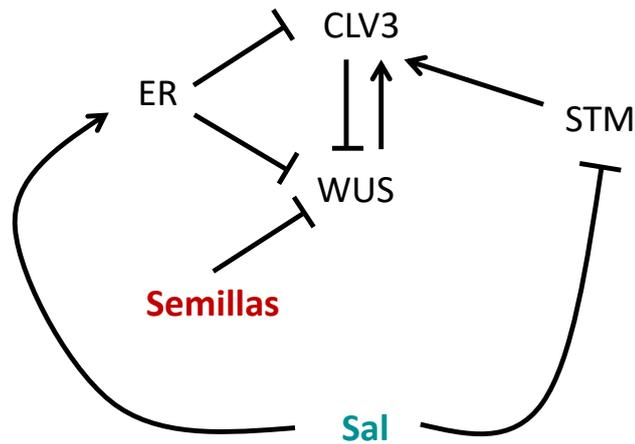


Figura .42 Modelo propuesto sobre la regulación de la actividad del SAM bajo estrés salino. Flechas representan interacciones positivas, barras interacciones negativas.

Por otra parte, se ha analizado el comportamiento bajo estrés salino de mutantes de pérdida de función en reguladores clásicos de la actividad del SAM como *dellaKO* y *bp* (Douglas *et al.*, 2002; Serrano-Mislata *et al.*, 2017). El comportamiento del SAM de las plantas *dellaKO* fue hipersensible al estrés, ya que se observó un efecto a 100 mM de NaCl, condiciones que no tuvieron un impacto en el desarrollo del SAM de las plantas silvestres. Al contrario, la actividad del SAM de los mutantes *bp* solo se vio ligeramente afectada, respecto a las condiciones control, por concentraciones muy altas de sal, 200 mM NaCl.

Las DELLA reducen el crecimiento y activan mecanismos de defensa, como la detoxificación de ROS, en respuesta al estrés (Achard *et al.*, 2008). Una posibilidad sería que estos niveles de ROS sean más altos en el SAM de *dellaKO* bajo estrés y por eso el SAM de estas plantas es más sensible al mismo. De hecho, trabajos previos indican que los niveles de ROS controlan la actividad del SAM y, por ejemplo, niveles altos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restringen la expresión de WUS y la organogénesis (Zeng *et al.*, 2017). En el caso de *bp*, como se ha comentado, la actividad del SAM ya era mucho más baja en condiciones control, es decir, ya es un SAM que funciona mal, con pocas divisiones celulares y poca producción de flores sin estrés. En resumen, el impacto de la salinidad fue mayor en aquellos meristemas inicialmente más activos (*dellaKO*).

Finalmente, se ha iniciado en este TFM un análisis de variación natural en la respuesta del desarrollo reproductivo frente a salinidad. Con los ecotipos analizados hasta la fecha, se detecta la existencia de variación natural en los tres caracteres evaluados en condiciones de estrés por sal: altura de la inflorescencia, producción de flores y porcentaje de yemas florales cerradas. También se ha determinado la posición geográfica de estos ecotipos, aunque no ha sido posible identificar ningún patrón que relacione su localización y la tolerancia o sensibilidad a la salinidad del desarrollo reproductivo.

## 6. CONCLUSIONES

1. Se han optimizado ensayos para analizar la actividad del SAM de Arabidopsis en condiciones de estrés salino.
2. La elongación del tallo de la inflorescencia es un carácter más sensible al efecto de la salinidad que la producción de nuevas flores.
3. El desarrollo de la inflorescencia de las plantas del ecotipo *Ler* es más sensible a la salinidad que la de las plantas del ecotipo *Col*, quizá debido a la presencia de la mutación *erecta*.
4. La respuesta del SAM de Arabidopsis a salinidad sucede en dos etapas. En una primera etapa, el tamaño del SAM disminuye y produce menos flores, lo que va asociado a una reducción en la actividad de líneas testigo fluorescentes para WUS y CLV3. En una segunda etapa, el SAM mantiene su tamaño y para completamente la producción de nuevas flores, lo que va asociado a una caída brusca en la actividad de una línea testigo fluorescente para STM.
5. El SAM de los mutantes *dellaKO*, que producen muchas flores, se ve afectado por concentraciones bajas de sal (50-100 mM NaCl) que no alteran al desarrollo del SAM de las plantas silvestres. Al contrario, el SAM de los mutantes *bp*, que produce pocas flores, solo se ve afectado por concentraciones de sal muy altas (200 mM NaCl).
6. Hay variación natural en el desarrollo reproductivo de diferentes ecotipos de Arabidopsis en condiciones de estrés por sal.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Renou JP., Berthome, R., Harberd, N.P., Genschik P. (2008). Plant DELLA restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology* 18, 656-660.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., Harberd, P. (2006). Integration of plant responses to environmentally active phytohormonal signals. *Science* 311, 91.
- Alcaraz-Ariza. (2012). Salinidad y vegetación. Geobotánica Tema 18. Universidad de Murcia España.
- Ali, A., Petrov, V., Yun, D. J., & Gechev, T. (2023). Revisiting plant salt tolerance: novel components of the SOS pathway. *Trends in plant science*, 28(9), 1060–1069.
- Balanza, V., Martínez-Fernández, C., Sato, S., Yanofsky, M.F., Kaufmann, K., Angenent, C., Bemer, M., Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in Arabidopsis by a *FRUITFULL.APETALA2* pathway. *Nature Communications*. 9:565.
- Baxter, I., Brazelton, J.N., Yu, D., Huang, Y.S., Lahner, B. et al. (2010) A Costal Cline in Sodium Accumulation in *Arabidopsis thaliana* is Driven by Natural Variation of the Sodium Transporter AtHKT1;1. *PLoS Genet* 6 (11): e 1001193.
- BursSENS, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beekman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., & Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in Arabidopsis thaliana. *Planta*, 211(5), 632–640.
- Cai, H., Xu, Y., Yan, K., Zhang, S., Yang, G., Wu, C., Zheng, C., & Huang, J. (2023). BREVIPEDICELLUS Positively Regulates Salt-Stress Tolerance in Arabidopsis thaliana. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1054.
- Cao, X., Du, Q., Guo, Y., Wang, Y., & Jiao, Y. (2023). Condensation of STM is critical for shoot meristem maintenance and salt tolerance in Arabidopsis. *Molecular Plant* 16.
- Cha, O.-K.; Yang, S.; Lee, H. (2022). Transcriptomics Using the Enriched Arabidopsis Shoot Apex Reveals Developmental Priming Genes Involved in Plastic Plant Growth under Salt Stress Conditions. *Plants*. 11, 2546.
- Chao, D-Y., Dilkes, B., Luo, H., Douglas, A., Yakubova, E., Lahner, B., Salt, D.E. (2013). Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in Arabidopsis, *Science*, 341, 658.
- Chaudhry, Usman & Neslihan, Zahide & Gökçe, Öztürk & Gokce, Ali. (2023). Salt Stress and Plant Molecular Responses. 10.5772/intechopen.101513.
- Chavez, DI., & Valenzuela, S. (2023) Análisis de expresión de cuatro factores de transcripción NAC asociados a respuesta ante aclimatación al frío en Eucalyptus globulus. <http://repositorio.udec.cl/jspui/handle/11594/11447>
- Chen, N., Pan, L., Yang, Z., Su, M., Xu, J., Jiang, X., Yin, X., Wang, T., Wan, F., & Chi, X. (2023). A MYB-related transcription factor from peanut, AhMYB30, improves freezing and salt stress tolerance in transgenic Arabidopsis through both DREB/CBF and ABA-signaling pathways. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, JP., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P., Achard, P. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, Vol. 23: 1849-1860.
- Colin, L., Ruhnow, F., Zhu, J-K., Zhao, C., Zhao, Y., Persson, S. (2023). The cell biology of primary cell walls during salt stress. *The Plant Cell*. 35: 201-217.
- Douglas, S.J., Chuck, G., Dengler, R.E., Pelecanada, L., Riggs, C.D. (2002). *KNAT1* y *ERECTA* regulan la arquitectura de la inflorescencia en Arabidopsis, *The Plant Cell*, Volumen 14, Número 3.
- FAO. 2021. Omuto CT, Vargas RR, El Mobarak, AM, Mohamed N, Viatkin K, Yigini Y. 2020. Mapping of salt-affected soils: Technical manual. Rome, FAO <https://doi.org/10.4060/ca9215en>
- FAO. 2021. *El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura-Sistemas al límite. Informe de síntesis 2021*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb7654es>
- FAO, ITPS. 2021. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb7247en>.
- FAO, ITPS. 2021. <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cb4809en>.
- FAO. 2024. *Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. Informe mundial trianual*, no 1, marzo de 2024. Roma. <https://doi.org/10.4060/cd0022es>
- Fulcher, N. & Sablowski, R. (2011) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proceedings of the National Academy of Ciencias*. Vol. 106, No. 49.
- Gaillochot, C., Daum, G., & Lohmann, J. U. (2015). O cell, where art thou? The mechanisms of shoot meristem patterning. *Current*

opinion in plant biology, 23, 91-97.

-Garrido, J.L. (2021). Identificación de las familias de transcripción WRKY y proteínas vq en fresa y caracterización del papel fawrky1 en la respuesta de defensa del fruto frente a colletotrichum acutatum. Universidad de Cordoba.

-Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13.

-Gutierrez-Hernandez, F. (2018). Caracterización de la sobreexpresión del gen WRKY2 de Arabidopsis thaliana en respuesta al estres abiótico. Repositorio IPICYT. <https://repositorio.ipicyt.edu.mx///handle/11627/3157>.

-Ha, C. M., Jun, J. H., & Fletcher, J. C. (2010). Shoot apical meristem form and function. *Current topics in developmental biology*, 91, 103-140.

-Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., Meyerowitz, E.M. (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Curr Biol. Nov 8;15(21):1899-911*. doi: 10.1016/j.cub.2005.09.052.

-Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., ... & Tsiantis, M. (2005). KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology*, 15(17), 1560-1565.

-Jun, Y.S., Cha, O-K., Kim, J.H., Lee, H. (2019). Shoot activity is involved in salt tolerance on Arabidopsis shoot growth. *Journal Plant. Biology*. 62:410-418.

-Katori, T., Ikeda, A., Iuchi, S., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Maehashi, K., Sakata, Y., Tanaka, S., Taji, T. (2010). Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of Arabidopsis thaliana accessions. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 61, 4 pp. 1125-1138.

-Lee, S., Choi, J. H., Truong, H. A., Lee, Y. J., & Lee, H. (2022). Enhanced nitrate reductase activity offers Arabidopsis ecotype Landsberg erecta better salt stress resistance than Col-0. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 24(5), 854–862.

-Lee, H.G., Choi, Y-R., Seo, P.J. (2016). Increased STM expresión is associated with drought tolerance in Arabidopsis. *Journal of Plant Physiology*. 201, 79-84.

-Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stress. New York: Academic, 2<sup>nd</sup> Ed.

Li, X., Zhang, J., Shi, H., Li, B., & Li, J. (2022). Rapid responses: receptor-like kinases directly regulate the functions of membrane transport proteins in plants. *Journal of integrative plant biology*.

-Liu, J., Srivastava, R., & Howell, S. (2008). Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in Arabidopsis. *Plant, cell & environment*, 31 12, 1735-43.

-Ma, J., Wang, LY., Dai, JX., Wang, Y., Lin, D. (2021). The NAC-type transcription factor CaNAC46 regulates the salt and drought tolerance of transgenic Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biology*. 21:1-11.

-Manhaes, A., Ortiz-Morea, F., He, P., & Shan, L. (2020). Plant plasma membrane-resident receptors: surveillance for infections and coordination for growth and development. *Journal of integrative plant biology*.

-Mandel, T., Moreau, F., Kutsher, Y., Fletcher, J.C., Cristel, C.C., Williams, L.E. (2014). The ERECTA receptor kinase regulates Arabidopsis shoot apical meristem size, phyllotaxy and floral meristem identity. *The Company of Biologists*. 141, 830-841.

-Mata-Fernandez, I., Rodríguez-Gamiño, ML., López-Blanco, J., Vela-Correa, G. (2014). Dinámica de la salinidad en los suelos. *Revista Digital El hombre y su Ambiente*, Vol. I (5) 26-35.

-Milhinhos, Ana & Vera-Sierra, Francisco & Blanco-Touriñán, Noel & Mari-Carmona, Cristina & Carrió-Seguí, Angela & Forment, javier & Champion, Clément & Thamm, Anna & Urbez, Cristina & Helen, Prescott & Agustí, Javier. (2019). SOBIR1/EVR prevents precocious initiation of fiber differentiation during wood development through a mechanism involving BP and ERECTA.

-Méndez -Vigo, B., Pico, F.X., Ramiro, M., Martínez-Zapater, J.M., Alonso-Blanco, C. ( 2011). Altitudinal and Climatic Adaptation is Mediated by Flowwring Traits and FRI, FLC, and PHYC genes in Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 157, pp.1942-1955.

-Munns R, Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual. Review of Plant Biology* 59, 651–681.

-Nanda, A.K., Habti, A.E., Hocart, C.H., Masle, J. (2019). ERECTA receptor-kinases play a key role in the appropriate timing of seed germination under changingsalinity. *Journal of Experimental Botany*, Vol, 70, No.21 pp. 6417-6435.

-Neff M.M., Chory J. (1998). Genetic interactionsbetween phytochrome A, phytochrome B, and cryp-tochrome 1 during Arabidopsis development. *PlantPhysiology*, 118, 27–35.

-Ogawa, D., Abe, K., Miyao, A., Kojima, M., Sakakibara, H., Mizutani, M., Morita, H., Toda, Y., Hobo, T., Sato, Y., Hattori, T., Hirochika,

- H., & Takeda, S. (2011). RSS1 regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature communications*, 2, 278.
- Pfeiffer, A., Wenzl, C., & Lohmann, J. U. (2017). Beyond flexibility: controlling stem cells in an ever-changing environment. *Current opinion in plant biology*, 35, 117–123.
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta -Bioenergetics*, 975, 384–394
- Reddy, G.V., Meyerowitz, E.M. (2005). Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the Arabidopsis shoot apex. *Science*. Oct 28;310(5748):663-7. doi: 10.1126/science.1116261.
- Sanchez-Gerschon,V.,Martínez-Fernández, I., González-Bermúdez, M.R., de la Hoz-Rodríguez,S., González, F.V., Lozano-Juste, J., Ferrándiz, C., Balanzá, V. (2024). Transcription factors HB21/40/53 trigger inflorescence arrest through abscisic acid accumulation at the end of flowering. *Plant Physiology*, 00, 1-14.
- Schramm, F., Larkindale, J., Kiehlmann, E., Ganguli, A., Englich, G., Vierling, E., & von Koskull-Döring, P. (2008). A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 53(2), 264–274.
- Serrano-Mislata, A., Bencivenga, S., Bush, M., Schiessl, K., Boden, S., & Sablowski, R. (2017). DELLA genes restrict inflorescence meristem function independently of plant height. *Nature Plants*, 3(9), 749-754.
- Shanmugam S, Zhao, S, Nandy, S., Srivastava, V., Khodakovskaya, M. (2020). Modification of soybean growth and abiotic stresstolerance by expression of truncated ERECTA protein from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 15(5): e0233383
- Shi, B., & Vernoux, T. (2022). Hormonal control of cell identity and growth in the shoot apical meristem. *Current opinion in plant biology*, 65, 102111.
- Singh, K.N., & Chatrath, R. (2001). Salinity Chapter. En: Reynolds, M.P., J.I. Ortiz- Monasterio, and A. McNab (eds.). 2001. Application of Physiology in Wheat Breeding. México, D.F.: CIMMYT.
- Su, YH., Zhou, C., Li, YJ., Yu, Y., Tang, LP., Zhang, WJ., Yao, WJ., Huang, R., Laux, T., Zhang, XS. (2020). Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the Arabidopsis shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 117, 22561–22571.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R.F., Komeda, Y. (1996). The Arabidopsis *ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *The Plant Cell*, Vol. 8, 735-746.
- Uchida, N. & Tasaka, M. (2013). Regulation of plant vascular stem cells by endodermis-derived EPFL-family peptide hormones and phloem-expressed ERECTA-family receptor kinases. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 17, pp. 5335-5343.
- Udvardi, M., Kakar, K., Wandrey, M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja, A., Zhang, J., Benedito, V., Hofer, J., Chueng, F., & Town, C. (2007). Legume Transcription Factors: Global Regulators of Plant Development and Response to the Environment1[W]. *Plant Physiology*, 144, 538 - 549.
- Venglat, S. P., Dumonceaux, T., Rozwadowski, K., Parnell, L., Babic, V., Keller, W., & Datla, R. (2002). The homeobox gene BREVIPEDICELLUS is a key regulator of inflorescence architecture in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(7), 4730-4735.
- Wang, Q., Guo, C., Li, Z., Sun, J., Deng, Z., Wen, L., Li, X., & Guo, Y. (2021). Potato NAC Transcription Factor StNAC053 Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22052568>.
- Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends un Food Science & Technology* 16 , 423-428.
- Zeng, J., Geng, X., Zhao, Z., & Zhou, W. (2024). Tipping the balance: The dynamics of stem cell maintenance and stress responses in plant meristems. *Current opinion in plant biology*, 78, 102510.
- Zhang, L., De Genaro, D., Lin, G., Chai, J., Shpak, E.D. (2023). ERECTA family signaling constrains CLAVATA· and WUSCHEL to. The centewr of the shoot apical meristem. *The Company Biologists*, 148.
- Zhu Jian-Kang. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiology*, Vol. 124, pp 941-948.
- Zhu, J.K. (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*. Oct 6;167(2):313-324. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.029