



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

PAPEL DE LAS ESTRIGOLACTONAS EN EL DESARROLLO VASCULAR DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

MÁSTER: BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS

AUTOR: ASIER MOTA ELVIRA

TUTOR ACADÉMICO: FRANCISCO JOSÉ VERA SIRERA

DIRECTOR: JAVIER AGUSTÍ FELIU

DIRECTOR SECUNDARIO: FRANCISCO JOSÉ VERA SIRERA

FECHA DE ENTREGA: 10-01-2020

LOCALIDAD: VALENCIA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA,
Camino de Vera, s/n, 46022 Valencia



PAPEL DE LAS ESTRIGOLACTONAS EN EL DESARROLLO VASCULAR DE *ARABIDOPSIS THALIANA*

RESUMEN

El sistema vascular de las plantas se trata de una compleja red de tejidos que permite el transporte de agua y moléculas a los órganos donde se necesitan. Por ello, el desarrollo de la vasculatura es necesario para permitir el transporte de nutrientes y con ello promover el correcto desarrollo de la planta. Uno de los factores que intervienen en el correcto desarrollo vascular son las fitohormonas. En concreto, las estrigolactonas (SLs) son una familia de hormonas vegetales que recientemente se han visto implicadas en el desarrollo vascular. Hasta ahora, se sabe que las SLs están implicadas en la regulación de la proliferación celular promovida por el cámbium. Sin embargo, se desconoce si las SLs tienen algún efecto en el establecimiento del patrón de desarrollo de la vasculatura. En este trabajo, se pretende caracterizar de un modo preciso cuales son los efectos a nivel de vasculatura que produce la ausencia de una correcta señalización de SLs en *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*)

PALABRAS CLAVE: Vasculatura, *Arabidopsis thaliana*, fitohormonas, estrigolactonas, D14.

ROLE OF STRIGOLACTONES IN THE VASCULAR DEVELOPMENT OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

ABSTRACT

The plants vascular system consists of a complex network of different types of transport tissue that allows the movement of water and molecules to the organs that are required. For that reason, the vascular development is important to allow the transport of nutrients and so enable the proper plant growth. Phytohormones are one of the factors that take part in the proper vascular development. Strigolactones (SLs) are a group of phytohormones which have been recently involved in the vascular development. Hitherto, it is known that SLs are involved in the regulation of the cellular proliferation. However, it is unknown whether SLs have any effect in the establishment of the vascular pattern. In this work, we pretend to characterize the vascular effects which are induced due to the absence of a proper SLs signaling in *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*)

KEYWORDS: Vasculature, *Arabidopsis thaliana*, phytohormones, strigolactones, D14.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
Crecimiento en <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
Desarrollo vascular durante el crecimiento primario	1
Desarrollo vascular durante el crecimiento secundario	2
Figura 1. Esquema de las fases de crecimiento vascular primario y secundario.	3
Control genético del desarrollo vascular	3
Control hormonal del desarrollo vascular.....	5
Las estrigolactonas.....	6
Funciones de las estrigolactonas	6
Síntesis de SLs	6
Figura 2. Ruta metabólica de síntesis de SLs.....	7
Proceso de señalización de SLs:	7
Figura 3. Ruta de reconocimiento y transducción de señal por parte de las SLs	8
OBJETIVOS	9
RESULTADOS.....	10
La mutación del gen D14 produce alteraciones en el patrón de desarrollo de la vasculatura secundaria.....	10
Figura 4: Fotografías orientativas del fenotipo de planta d14 y Col-0.....	10
Figura 5: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina	11
Figura 6: cuantificación de vasos y fibras	12
Las alteraciones fenotípicas vasculares en d14 aparecen en distintos estados de desarrollo.	14
Figura 7: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina	14
Las plantas d14 presentan regiones de xilema ectópico y una región extensa de tejido con identidad de cambium.	15
Figura 8: Cortes de hipocótilo en fresco sumergidos en yoduro de etidio para su visualización	15
Figura 9: Cortes histológicos de hipocótilos tratados con tinción GUS y teñidos con eosina.	16
Figura 10: Esquema general orientativo de las comparaciones realizadas a través de los análisis bioinformáticos.....	17
Figura 11: Heatmap	18
Figura 12: Análisis de ontología génica.....	19
Figura 13: Diagramas de Venn	20
Figura 14: Resultados esquemáticos de los análisis GO	22
El tratamiento con giberelinas revierte los efectos fenotípicos producidos por la ausencia de D14. ...	23
Figura 15: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina.	23
La expresión de <i>D14</i> bajo promotores específicos de tejido vascular revierte los efectos fenotípicos vasculares observados.	24
Figura 16: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina	25

Figura 17: Muestras de hipocótilos cortadas en fresco tratadas con Clearsee observadas al microscopio confocal.....	26
DISCUSIÓN.....	27
<i>Figura 18: esquema de la ruta hipotética de señalización en ausencia de SLs.</i>	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
Esterilización de las semillas	31
Estratificación de las semillas.....	31
Genotipado de las muestras	31
Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados para los genotipados y la realización de qRT-PCRs	32
Recogida de hipocótilos para la realización de cortes en parafina	33
Eliminación de la parafina	33
Tinción de las muestras con azul de toluidina	33
Montaje de las muestras.....	33
Visualización de las muestras.....	34
Recogida del material vegetal para la extracción de ARN	34
Extracción de RNA.....	34
Cuantificación del RNA extraído	34
Análisis de la calidad de las muestras con Bioanalyzer	34
Obtención de cDNA.....	34
Realización de la qRT-PCR	35
Cruces genéticos	35
Tabla 2: Líneas marcadoras utilizadas para los diversos cruces genéticos realizados.....	35
Tabla 3: Cruces genéticos obtenidos mediante cruzamientos.	35
Obtención de hipocótilos para cortes en fresco para la visualización al microscopio confocal	36
Obtención de hipocótilos para tratamiento con Clearsee	36
Ensayos GUS.....	36
Diseño de construcciones de plásmidos	36
Electroporación de las cepas bacterianas	36
Extracción de plásmidos.....	37
Cuantificación de la cantidad de plásmido extraído	37
Transformación de <i>A.thaliana</i>	37
Tratamiento de plantas en tierra con giberelinas y paclobutrazol	37
Tratamiento bioinformático de las muestras analizadas por RNA-seq.....	38
REFERENCIAS.....	39

INTRODUCCIÓN

El sistema vascular de las plantas cumple dos funciones esenciales. Por una parte, permite el transporte de agua, nutrientes, fotoasimilados y otras moléculas, entre ellas las hormonas vegetales, para el correcto desarrollo de la planta. Y, por otra parte, funciona como soporte mecánico actuando como esqueleto para sostener la planta.

El sistema vascular está constituido por tres tipos de tejidos: el xilema, el floema y el cambium. El xilema se encarga principalmente del transporte de sales minerales y agua desde la raíz hasta la parte superior de las plantas. El floema transporta fundamentalmente nutrientes y moléculas señalizadoras hacia las regiones donde son requeridas, tanto acropetalmente como basipetalmente. El cambium es un conjunto de células madre a partir del cual se generan nuevas células de xilema y floema durante la vida de la planta.

La abundancia relativa de los distintos tejidos que conforman la vasculatura, así como su organización, varía entre diferentes especies e incluso entre diferentes órganos dentro de una misma planta.

Crecimiento en *Arabidopsis thaliana*

En la mayoría de dicotiledóneas y gimnospermas, se distinguen dos tipos de crecimiento: el crecimiento en longitud promovido por los meristemos apicales del tallo (SAM) y la raíz (RAM) conocido como crecimiento primario, y el crecimiento en grosor, que está mediado por el cambium y se conoce como crecimiento secundario. El desarrollo vascular difiere en ambos tipos de crecimiento.

Desarrollo vascular durante el crecimiento primario

En *Arabidopsis thaliana*, la planta utilizada como modelo en este trabajo, el desarrollo vascular comienza ya desde la embriogénesis. Es en este momento cuando se empiezan a formar las células no diferenciadas del procambium. El promeristemo de la raíz ya queda completamente formado durante el estado embrionario de torpedo temprano (Scheres *et al.*, 1995). Es entonces, a partir de divisiones asimétricas del primordio vascular, cuando se forman los inicios del sistema vascular radicular.

En la raíz, se forma una estructura cilíndrica que se rodea radialmente de tejidos vasculares, periciclo, endodermis, córtex y epidermis. El xilema se desarrolla en el centro del cilindro vascular. Aunque los precursores del desarrollo del xilema están establecidos en el meristemo de la raíz, su diferenciación no empieza hasta que se produce la elongación de la raíz y se desarrollan los pelos radiculares.

Los precursores de los vasos xilemáticos que se encuentran en la periferia del xilema se diferencian antes que los que se encuentran en las capas interiores. Los precursores situados en la periferia se diferencian en protoxilema y vasos xilemáticos con pared secundaria dispuesta en forma de espiral. Por otra parte, los precursores de los vasos xilemáticos localizados en las capas más interiores se diferencian en metaxilema con pared secundaria dispuesta en forma reticular.

El desarrollo del floema en el meristemo de la raíz empieza con divisiones asimétricas de las células precursoras floemáticas, las cuales forman los elementos cribosos del floema y las células acompañantes.

Desde el final de la embriogénesis hasta el inicio de la floración es el periodo de crecimiento que se conoce como crecimiento vegetativo. Durante este periodo, se produce el desarrollo de la vasculatura de las hojas, raíz e hipocótilo.

Posteriormente a esta diferenciación de crecimiento vegetativo, se produce la transición al crecimiento reproductivo. En esta fase se produce el crecimiento del tallo, también conocido como vástago de inflorescencia, de las rosetas de *A.thaliana* (Ye *et al.*, 2002).

La vasculatura del tallo se desarrolla en forma de haces, siguiendo el mismo patrón que la mayoría de plantas vasculares (Ye *et al.*, 2002). El desarrollo vascular primario muestra un patrón radial ya establecido durante la embriogénesis por diversos factores genéticos (Emery *et al.*, 2003; McConnell *et al.*, 2001). Este patrón consiste en la formación de floema abaxial y xilema adaxial, entre los cuales se intercala el procambium, quedando una disposición final en forma de eustela (Figura 1).

Por otro lado, en la raíz, una vez diferenciado el protofloema y posteriormente el protoxilema, se forma un cilindro vascular que contiene el metaxilema, localizado en la zona central del eje de la raíz y el floema primario, localizado en dos polos flanqueando al xilema (Figura 1).

Desarrollo vascular durante el crecimiento secundario

En un momento determinado de la vida de la planta, esta puede necesitar mejorar sus necesidades de transporte y/o soporte. Para ello se activa un proceso conocido como crecimiento secundario que consiste en la formación y acumulación de vasculatura de forma radial promovida principalmente por el cambium vascular, lo cual resulta en un engrosamiento del tallo.

En *A.thaliana*, el crecimiento secundario del tallo queda marcado por la formación de un cilindro vascular de células del cambium localizado en la región fascicular e intrafascicular. A partir de divisiones del cambium hacia el interior se origina el xilema secundario y hacia el exterior se origina el floema secundario (Figura 1) (Altamura *et al.*, 2001; Dharmawardhana *et al.*, 1992).

En cuanto al crecimiento secundario de la raíz e hipocótilo, primeramente, se produce el desarrollo del cambium vascular en forma de anillo continuo a partir de las células del periciclo y de las células procambiales (Dolan et al, 1993). A partir del cambium se genera el xilema secundario y el floema secundario en la raíz (Figura 1). El hipocótilo de *A.thaliana* se considera órgano modelo para el estudio del crecimiento secundario dada la similitud anatómica que presenta con el tallo secundario de los árboles (Chaffey et al., 2002). En este órgano, el inicio del crecimiento secundario está coordinado con la floración mediante una señalización que, como se explica más adelante, está controlada por las giberelinas (Ragni et al., 2011).

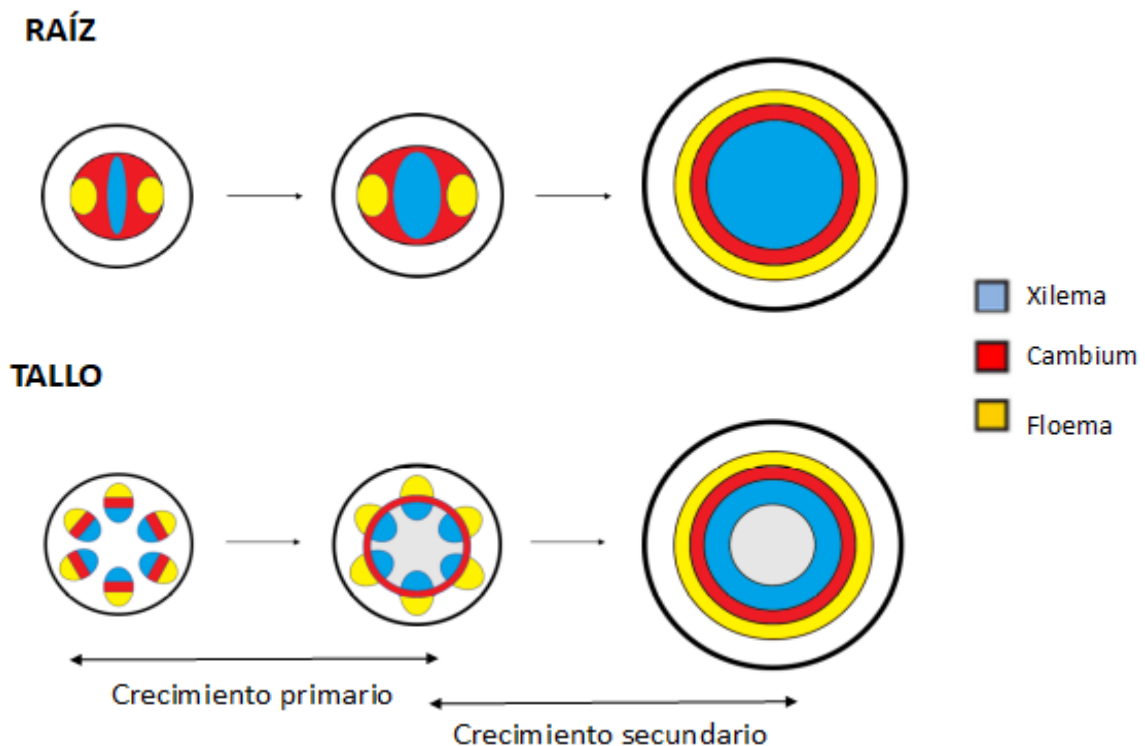


Figura 1. Esquema de las fases de crecimiento vascular primario y secundario. Organización de los tejidos vasculares durante el crecimiento de la raíz. Organización de los tejidos vasculares durante el crecimiento del tallo.

Control genético del desarrollo vascular

Los factores de transcripción de clase III con dominio de cremallera de leucinas HDZIPIII juegan un papel fundamental en el establecimiento del patrón de organización de los tejidos vasculares (Emery et al., 2003; Zhong y Ye, 2004; Itoh et al., 2008). Estudios sobre mutantes de los genes *INTERFASCICULAR FIBERLESS/REVOLUTA*, *ATHB14 ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX GENE14/PHABULOSA*, *ATHB9/PHAVOLUTA*, *AHTB15/CORONA* y *AHTB8*, codificantes de proteínas HD-ZIPIII, han demostrado su importancia a nivel de establecimiento del patrón de los haces vasculares, al regular el patrón de las células xilemáticas en la raíz, así como regular el desarrollo vascular en meristemos y hojas (Emery et al., 2003; Zhong y Ye, 2004; Itoh et al., 2008).

ATHB8, perteneciente también a la familia de los HDZIPIII, está involucrado en el crecimiento celular de las células procambiales en respuesta a auxinas (Donner et al., 2009). Este factor de transcripción a su vez regula al gen *ACL5*, el cual se expresa en células del cambium. *ACL5* está involucrado en la diferenciación celular al ser un enzima clave en la producción de termoespermina (Knott et al., 2007).

La termoespermina de importancia a nivel de regulación de la vasculatura. Esta molécula interviene en la ruta de señalización de SAC51-LIKESACL y LONESOME HIGHWAY/LHW. La termoespermina regula negativamente la unión de LHW con TARGET OF MONOPTEROS5/TMO5 al promover la síntesis de SACL, competidor de LHW. SACL se une a TMO5 evitando que se una a LHW actuando como freno para las divisiones periclinales del cambium, las cuales son fundamentales para el crecimiento secundario (Vera-Sirera et al., 2015).

Otra familia de factores de transcripción de dominio GRAS, es también relevante en el desarrollo vascular. En este grupo tenemos a *SHORT ROOT/SHR* y *SCARECROW/SCR*. Estos genes regulan el patrón celular xilemático de la raíz activando el miR165/166 (Calsbecker et al., 2010). Este microRNA se une específicamente al dominio START presente en los mRNAs de los HDZIPIII previamente descritos, marcándolos para su degradación (Kim et al., 2005; Zhong y Ye., 2007). Esto afirma que el sistema HDZIPII/microRNA es importante para la regulación transcripcional de la regulación vascular.

Por otra parte, genes como *PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM/PXY*, así como *CLAVATA3/ESR LIKE 41 CLE41*, gen que codifica una proteína la cual se une a PXY, están involucrados en diversas rutas de regulación y orientación de la división celular en el cámbium (Fisher y Turner, 2007). Los genes *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4/WOX4* y *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX14/WOX14*, que actúan bajo la regulación de PXY, también se sabe que están involucrados en promover dicha división celular (Etchells et al., 2013).

Los receptores de kinasas *REDUCED IN LATERAL GROWTH1/RUL1* y *MORE LATERAL GROWTH1/MOL1* tienen efecto sobre la actividad cambial mostrando una actividad antagónica puesto a que *RUL1* actúa como activador de la actividad cambial, mientras que *MOL1* actúa como represor (Agustí et al., 2011B).

Finalmente, los genes pertenecientes al grupo de los *SUPPRESSOR OF MAX2 1-LIKE/SMXL* juegan un papel fundamental en el correcto desarrollo de la vasculatura. Dentro de este grupo, *SMXL3/4/5*, que actúan de forma autónoma, son reguladores clave de la formación del floema (Wallner et al., 2017). En especial *SMXL5* juega un papel más dominante en la formación del floema secundario (Wallner et al., 2020)

Adicionalmente, otros genes involucrados en la diferenciación de los distintos tejidos vasculares, son transcripción de la familia *NAC*. Estos, están implicados en la formación de los tipos celulares principales del xilema (vasos y fibras). Así, los genes *VND6* (VASCULAR-RELATED *NAC*-DOMAIN 6) y *VND7*, pertenecientes a dicha familia, son reguladores maestros de la diferenciación de los vasos xilemáticos (Demura y Fukuda, 2007; Kubo *et al.*, 2005).

Otros factores de transcripción de transcripción tipo *NAC*, como *NST1* (*NAC* SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1) y *NST3* son reguladores de la formación de fibras xilemáticas (Mitsuda *et al.*, 2007).

Control hormonal del desarrollo vascular

Las hormonas vegetales o fitohormonas se definen como un grupo de pequeñas moléculas orgánicas sintetizadas por las plantas, capaces de influir en el crecimiento y desarrollo de la planta desde la embriogénesis, así como intervenir en reacciones de respuesta a diferentes estreses. Las hormonas son producidas en concentraciones muy bajas y son capaces de actuar sobre otros organismos cercanos.

Dentro del amplio espectro de funciones de cada tipo de hormonas, es de interés remarcar los efectos a nivel de vasculatura que produce cada una de ellas. Por una parte, las auxinas son hormonas que regulan la iniciación y diferenciación de las células del procambium en tejidos vasculares (Baima *et al.*, 2001), la maduración de células de los vasos (Ye *et al.*, 2002) y la inducción de la formación de haces vasculares continuos (Sachs, 1991).

Las citoquininas, por su parte, son clave en el control de la actividad cambial promoviendo la división celular (Loomis y Torrey 1964; Nieminen *et al.*, 2008). Además, se sabe que las citoquininas actúan en conjunto con las auxinas para mantener la actividad de las células del cámbium. Las citoquininas regulan negativamente la diferenciación del protoxilema, manteniendo la identidad de células madre de las células cambiales. Sin embargo, las auxinas inhiben la señalización de las citoquininas a través de la síntesis de AHP6. Este balance permite el control de la diferenciación de las células del cámbium (Bishopp *et al.*, 2011; Mahonen *et al.*, 2006).

En cuanto a los brasinoesteroides, estos son necesarios para la diferenciación normal de las células del xilema, así como para la elongación de las células vasculares (Choe *et al.*, 1999). Durante la formación de la vasculatura, estos tres tipos de hormonas actúan como moléculas de señalización que permiten la coordinación entre los diferentes tipos celulares (Lucas *et al.*, 2013).

Finalmente, en cuanto a las giberelinas, actualmente se conoce que involucradas en la expansión del xilema, así como en la diferenciación de las fibras xilemáticas (Aloni, 2013; Eriksson *et al.*, 2000; Mauriat and Moritz, 2009; Ragni *et al.*, 2011). La regulación de la diferenciación de las fibras xilemáticas ocurre mediante la interacción de las mismas con la proteína DELLA-KNAT1 (Felipo-Benavent *et al.*, 2018). Esta proteína pertenece a la familia DELLA, una familia que cumple múltiples funciones dentro de la planta.

Las estrigolactonas

Las estrigolactonas (SLs) son hormonas vegetales pertenecientes al grupo de las lactonas terpénicas, y son sintetizadas a través de la ruta de metabólica de los carotenoides. Al igual que el resto de hormonas vegetales, las SLs son compuestos capaces de actuar a bajas concentraciones (Gómez-Roldan *et al.*, 2008), así como de ser transportadas a través de la planta (Turnbull *et al.*, 2002).

Funciones de las estrigolactonas

Los primeros efectos conocidos de las SLs estaban relacionados con la comunicación de la planta con la rizosfera. Las SLs se sabe que son moléculas encargadas de promover la formación de hifas en las micorrizas arbusculares (Akiyama *et al.*, 2005) y también actúan como factores estimulantes de la germinación de los géneros de plantas parásitas *Striga*, *Orobancha* y *Phelipanche spp* (Cardoso *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que las SLs juegan un papel fundamental en el control del desarrollo de la arquitectura de la planta (Zwanenburg *et al.*, 2016), capaces de inhibir la ramificación de los brotes e inhibir el sobrecrecimiento de las yemas laterales del tallo (Gómez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Las SLs también están involucradas en la represión de la formación de raíces laterales, así como estimulación de la elongación de la raíz en conjunción con la auxina (Kapulnik *et al.*, 2011), (Kapulnik *et al.*, 2011b), e incluso están involucradas, junto con la citoquinina, en la supresión de la formación de raíces adventicias a partir de tejidos no radiculares (Gomez-Roldan *et al.*, 2008), (Rasmussen *et al.*, 2012).

Desde hace unos años, las SLs se han visto implicadas en el crecimiento secundario. Se ha demostrado que la señalización por SLs en el cambium vascular inducen su estimulación desencadenando un aumento del grosor del tallo (Agustí *et al.*, 2011A). Se han descrito también otros efectos de las SLs como moléculas inductoras del crecimiento secundario radicular (Wang *et al.*, 2015).

Síntesis de SLs

Como se ha mencionado anteriormente, las SLs son productos derivados de la ruta biosintética de los carotenoides. En angiospermas, existen tres proteínas plastidiales fundamentales para la síntesis de SLs: La primera es la isomerasa de carotenoide DWARF27 caracterizada en *A.thaliana* (Waters *et al.*, 2012a). Esta proteína se encarga de convertir los *trans*- β -carotenos en 9-*cis*- β -caroteno (Alder *et al.*, 2012). Estos, son a su vez sustrato de CCD7, también conocido como MAX3 (MORE AXILLARY BRANCHING3), que convierte el 9-*cis*- β -caroteno en 9-*cis*- β -apo-10'-carotenal. Finalmente, CCD8, también conocido como MAX4 produce carlactona, la molécula precursora de las SLs (Figura 2).

Los genes *MAX3* y *MAX4* codifican enzimas pertenecientes a la familia de las digoxigenasas de corte de carotenoides. Además, se sabe que *MAX3* es capaz de actuar sobre diferentes carotenoides, tanto con estructura cíclica como lineal (Hayward *et al.*, 2009).

La carlactona es posteriormente convertida en SLs a través de un proceso aún desconocido que involucra al citocromo de clase III, P450 (CYP450), sintetizado por el gen *MAX1* (Booker *et al.*, 2005; Challis *et al.*, 2013).

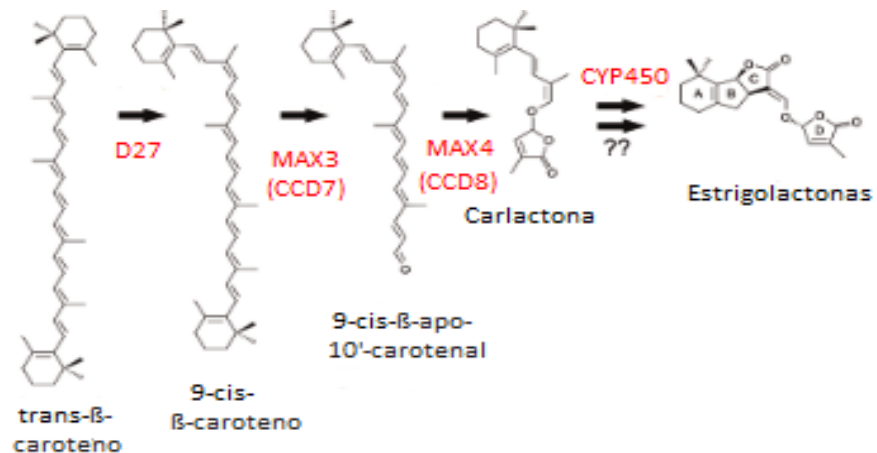


Figura 2. Ruta metabólica de síntesis de SLs. Adaptación de (Brewer *et al.*, 2013).

Proceso de señalización de SLs

En *A.thaliana*, sabemos que los genes *MAX1*, *MAX3* y *MAX4* están involucrados en la síntesis de SLs. Sin embargo, el gen *MAX2* es un componente de señalización celular involucrado en el proceso de percepción de SLs (Stirnberg *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2015). Este gen codifica una proteína de la familia F-Box, familia normalmente relacionada con la transducción de señales de fitohormonas (Stirnberg *et al.*, 2002).

Por otra parte, *DWARF14* (*D14*) es una proteína perteneciente a la superfamilia de α/β -hidrolasas, comúnmente conocida por participar en diversos procesos de señalización hormonal, especialmente en el reconocimiento de las SLs.

La expresión de *D14* en *A.thaliana* se da principalmente en yemas axilares, hojas jóvenes, hipocótilo, vasculatura y órganos florales (Chevalier *et al.*, 2014). Sin embargo, esta es capaz de transportarse entre células (Hamiaux *et al.*, 2012), de forma que su expresión y su acción pueden producirse en regiones diferentes.

El receptor *D14* es específico de SLs, siendo incapaz de reconocer otros compuestos de estructura similar como las karrikinas que son otros reguladores del crecimiento (Waters *et al.*, 2012b). En *A.thaliana*, existe un parálogo del gen *D14*, el *D14-like/KAI2*, que está relacionado con las karrikinas. Las karrikinas, al igual que las SLs, también están relacionadas con la estimulación de la germinación de semillas (Nelson *et al.*, 2010), sin embargo, su mecanismo de señalización es diferente al de las SLs (Waters *et al.*, 2014).

Investigaciones anteriores en *A.thaliana*, arroz y petunia han demostrado que la ausencia de D14 produce una insensibilidad a las SLs (Arite et al., 2009; Hamiaux et al., 2012; Marzec, 2016).

Para que se produzca la transducción de señal de las SLs, MAX2, forma un complejo SCF (Skp1, cullina y F-Box) al unirse a otras proteínas. Este complejo tiene actividad ubiquitina ligasa, marcando la proteína para su degradación en el proteosoma 26S (Hayward et al., 2009).

Cuando hay SLs en el medio, estas se unen al receptor D14, el cual a su vez se une al complejo SCF. Sucesivamente, otra proteína de la familia SUPRESOR OF MAX LIKE (SMXL) o DWARF53 también se une al complejo. La unión de la proteína SMXL, permite a su vez la activación del enzima D14, que hidrolizara a las SLs desencadenando el proceso de transducción de la señal en el cual el complejo SCF se activa y ubiquitina a SMXL para su degradación. El mecanismo de reconocimiento y transducción de señal por parte de SLs se muestra en la figura 3. Estudios en petunia han demostrado que para que se produzca la unión de MAX2 y D14 es necesaria la presencia de SLs (Hamiaux et al., 2012)

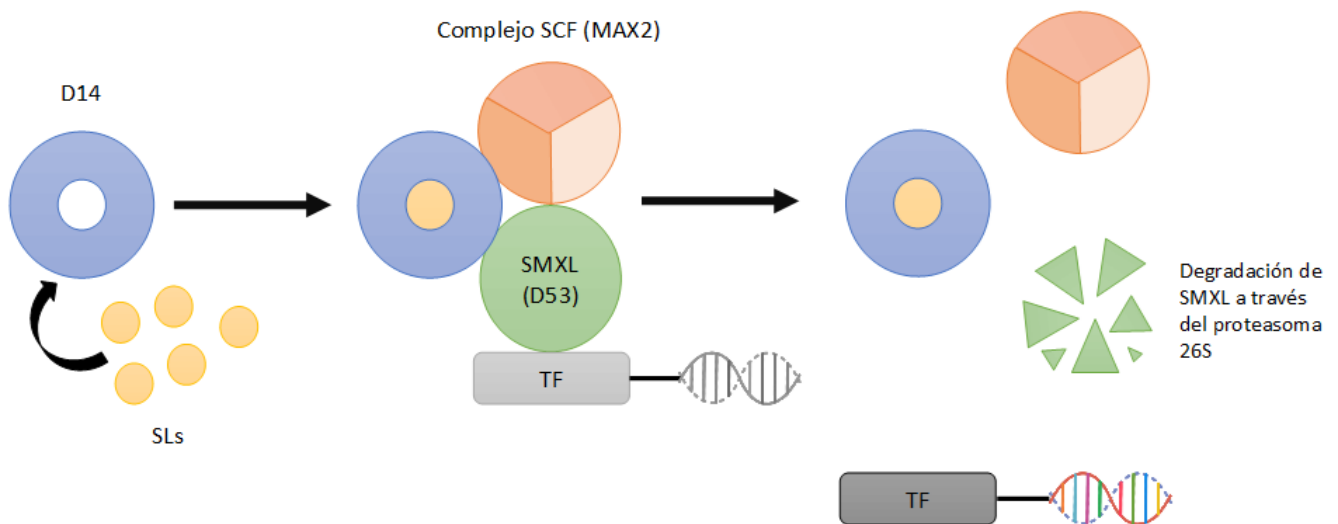


Figura 3. Ruta de reconocimiento y transducción de señal por parte de las SLs. Adaptación de (Marzec, 2017).

OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo es la caracterización de los efectos fenotípicos y moleculares de la ausencia de señalización por SLs sobre el desarrollo del sistema vascular secundario en *A.thaliana*.

RESULTADOS

La mutación del gen D14 produce alteraciones en el patrón de desarrollo de la vasculatura secundaria.

Se sabe que las SLs regulan la iniciación de la actividad cambial en *A.thaliana* (Agustí et al., 2011A). Sin embargo, hasta ahora se desconoce si las SLs llevan a cabo alguna acción durante el establecimiento del patrón de desarrollo de la vasculatura. Dado el papel central de D14 en la señalización por SLs, se procedió a observar el patrón de organización de la vasculatura secundaria en plantas adultas mutantes *d14*.

Para ello, se dejaron crecer plantas *d14-1* y plantas de genotipo silvestre (Col-0) en tierra hasta alcanzar los 20cm de altura. Como podemos observar, al igual que ocurre con los mutantes para genes involucrados en la biosíntesis de las SLs (Booker et al., 2005), el mutante *d14-1* (Figura 4 A) presenta un menor tamaño y un alto grado de ramificación con respecto a su control Col-0 (Figura 4 B), por lo que se puede identificar fácilmente.



Figura 4: Fotografías orientativas del fenotipo de planta *d14* y *Col-0*.

Para el estudio de los efectos de las SLs a nivel de organización del patrón vascular, se tomaron muestras de hipocótilo de plantas adultas *d14* y de plantas *Col-0* para compararlas fenotípicamente mediante cortes histológicos observados por microscopía óptica. Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura 5.

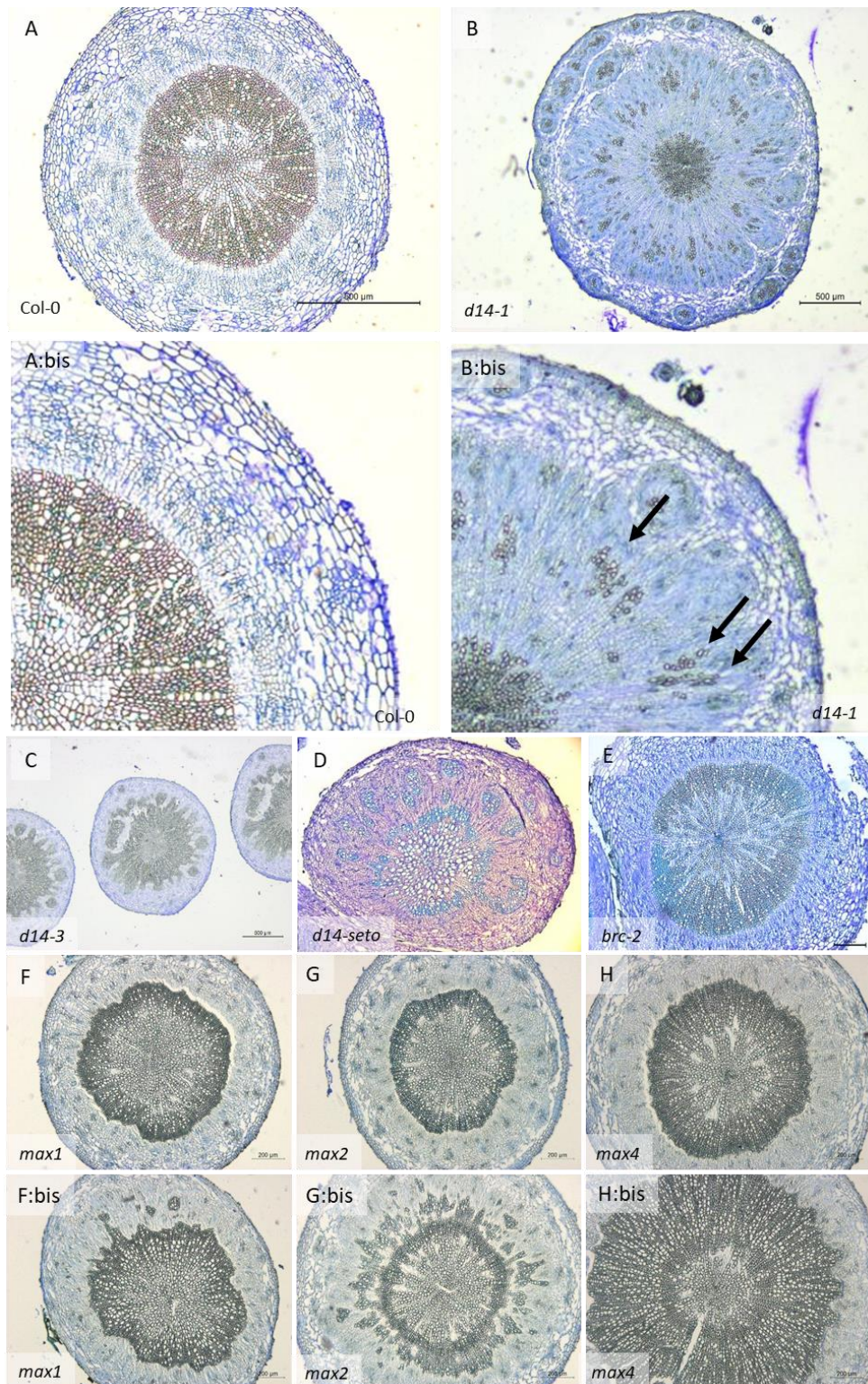


Figura 5: Cortes histológicos de hypocótilos teñidos con azul de toluidina. Las escalas utilizadas son distintas debido a la diferencia de tamaño de hypocótilos entre las distintas líneas. A: Hipocótilo de planta Col-0 adulta. B: Hipocótilo de planta d14-1 adulta. C: Hipocótilo de planta d14-3 adulta. D: Hipocótilo de planta d14-seto adulta. E: Hipocótilo de planta brc-2 adulta. F: Hipocótilo de planta max1 adulta. F-Bis: Hipocótilo de planta max1 adulta con presencia de tejido ectópico. G: Hipocótilo de planta max2 adulta. G-Bis: Hipocótilo de planta max2 adulta con presencia de tejido ectópico. H: Hipocótilo de planta max4 adulta. H-Bis: Hipocótilo de planta max4 adulta con presencia de tejido ectópico.

Como podemos observar, es posible apreciar dos diferencias fundamentales. Por una parte, se puede ver que, a nivel celular, las plantas *d14-1* (figura 5B) presentan prácticamente solo células engrosadas en la región interior, correspondiente a la región del xilema. Estas células son lo que se conoce como vasos conductores del xilema. En plantas Col-0 (figura 5A) existe una mayor proporción de células finas en la región xilemática. Estas células corresponden a lo que se conoce como fibras. Esto nos indica que el ratio de fibras/vasos es menor en plantas *d14* (figura 6).

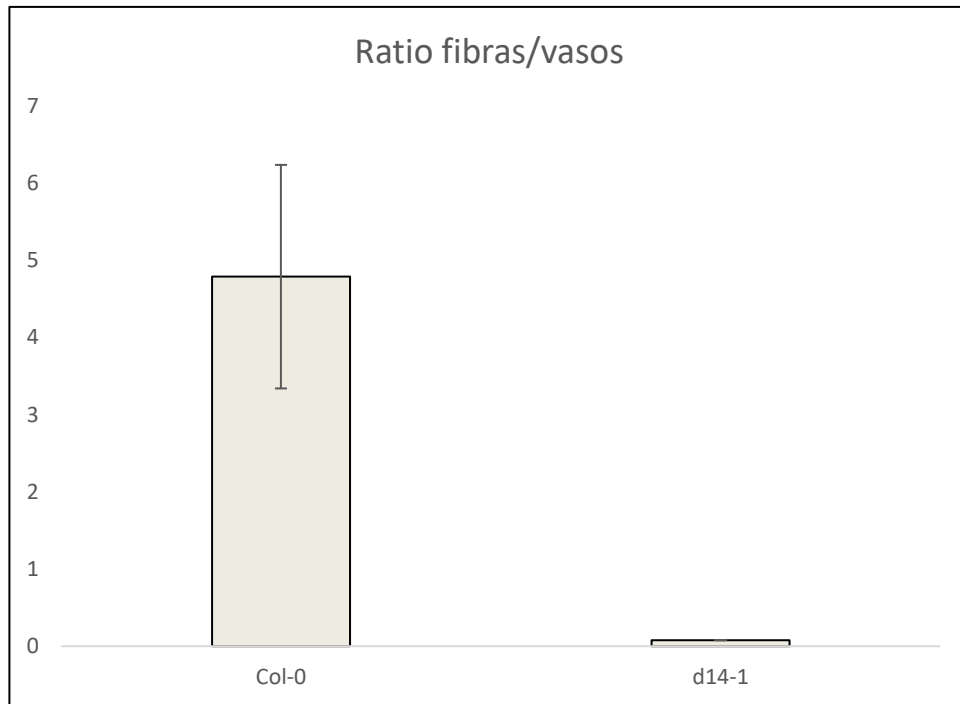


Figura 6: cuantificación de vasos y fibras presentes en plantas Col-0 (A) y *d14-1* (B). Las barras muestran la relación fibras/vasos de la media de valores obtenidos tras el análisis de 5 secciones de hipocótilo independientes por cada genotipo.

La otra diferencia apreciable es la desorganización de tejidos celulares en el cilindro vascular. Se observa como las regiones pertenecientes al xilema secundario, floema secundario y cambium se encuentran dispuestas desorganizadamente en comparación con Col-0. En plantas Col-0 estos tejidos mantienen una estructura de anillos concéntricos que se pierde en plantas *d14-1*. En este desorden, podemos destacar dos particularidades: (i) la presencia de regiones con una coloración más intensa. Estas 'islas' son regiones de células que presentan una mayor presencia de polisacáridos en la pared celular (de ahí el color diferencial en la tinción) y (ii) la presencia de células de pequeño tamaño localizadas alrededor de estas regiones de color más intenso. Estas células son muy similares a las células localizadas en la región del cambium en plantas Col-0.

Para descartar la posibilidad de que los efectos observados en *d14-1* fueran específicos de alelo, se llevó a cabo la caracterización de la organización del patrón vascular en mutantes *d14-seto* y *d14-3*. En paralelo, y para descartar que los efectos observados sean causa de la abundante ramificación que produce la mutación del gen *D14*, se estudió el mutante para el gen *BRANCHED2* (*BRC-2*), que codifica un factor de transcripción cuya función es reprimir el desarrollo de las yemas axilares (Fisher D et al.,

1996) que no está relacionado con la ruta de biosíntesis ni señalización de SLs, por lo que es un buen candidato para ser usado como control.

Se puede apreciar que las características fenotípicas previamente mencionadas propias de las plantas *d14-1* se conservan en *d14-seto* y *d14-3* (figura 6 C y D). Sin embargo, las plantas *brc-2* (figura 6E) que también posee un fenotipo ramificado, no presentan el mismo fenotipo de organización del tejido. El patrón vascular de *brc-2* es idéntico al silvestre.

Esto indica que el efecto observado en *d14-1* no es dependiente de alelo, depende intrínsecamente del estado de la proteína. Por otra parte, al comparar el fenotipo de *d14* con el de *brc-2*, se puede afirmar que la alteración del fenotipo vascular no depende de la ramificación. Los efectos dependen de la ausencia de D14.

Aunque todos los alelos mutantes puedan ser utilizados en el resto de estudios, nos centraremos en el alelo *d14-1*.

Habiendo visto los marcados efectos fenotípicos a nivel de vasculatura que produce la ausencia de D14, es de interés conocer el fenotipo de otros mutantes de señalización y biosíntesis de SLs. Esto permitirá profundizar más y determinar si los efectos producidos se deben a la ausencia de SLs o a problemas en la ruta de señalización de la hormona. Esto es fundamental para poder determinar el mecanismo molecular de acción de las SLs. Para ello, se cultivaron plantas *max1*, *max2* y *max4*, mutantes para genes involucrados en la síntesis y señalización de SLs. Se recogieron los hipocótilos y se realizaron cortes histológicos para su visualización de forma análoga a la empleada para *d14*.

En la figura 6 se pueden observar los fenotipos vasculares de los mutantes *max1* (F), *max2* (G) y *max4* (H). Se muestran dos fotografías por cada genotipo, mostrando dos fenotipos vasculares diferentes observados en las diferentes réplicas analizadas. Como se observa, todos los mutantes presentan una organización vascular diferente a la de Col-0. Se observa que *max1*, *max2* y *max4* pueden presentar regiones de tejido ectópico. Esto es similar a lo observado previamente en *d14*. Además, la organización de los tejidos vasculares también se muestra alterada en todos los mutantes, intercalándose la región del xilema, el cambium y el floema. Finalmente, también se aprecia un mayor grosor de los hipocótilos de plantas mutantes con respecto a su control Col-0.

Estos resultados nos indican que los fenotipos vasculares observados están relacionados con las SLs, ya sea a nivel de señalización o de biosíntesis, puesto a que los efectos observados en los mutantes de biosíntesis *max1*, *max2*, *max4* son muy similares a los observados en *d14*. También se puede afirmar que los efectos observados no están relacionados con el mayor grado de ramificación, puesto que el mutante *brc-2* no presenta cambios a nivel de vasculatura.

Las alteraciones fenotípicas vasculares en d14 aparecen en distintos estados de desarrollo.

El descubrimiento de los defectos fenotípicos vasculares presentes en plantas *d14* plantea la incógnita de si estos defectos están siempre presentes a lo largo del desarrollo o si, por el contrario, aparecen en algún punto en concreto del mismo.

Una estrategia que permite determinar en qué momento aparecen dichas alteraciones consiste en comparar la evolución del desarrollo vascular entre plantas *d14* y WT. Para ello, se cultivaron plantas *d14* y Col-0 y se extrajeron sus hipocótilos en diferentes momentos de su desarrollo (3.5, 5, 7.5, 10 y 15cm), para la realización de cortes histológicos y su visualización mediante microscopía óptica.

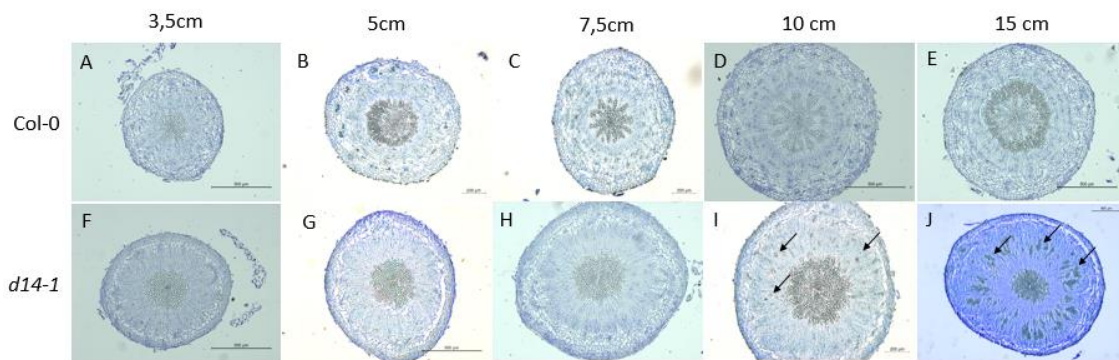


Figura 7: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina. A: Hipocótilo de Col-0 de 3'5cm. B: Hipocótilo de Col-0 de 5cm C: Hipocótilo de Col-0 de 7'5cm D: Hipocótilo de Col-0 de 10cm. E: Hipocótilo de Col-0 de 15cm. F: Hipocótilo de d14-1 de 3'5cm G: Hipocótilo de d14-1 de 5cm H: Hipocótilo de d14-1 de 7'5cm. I: Hipocótilo de d14-1 de 10cm J: Hipocótilo de d14-1 de 15cm.

Los resultados obtenidos (figura 7) muestran que las alteraciones aparecen en dos puntos del desarrollo diferentes. Como se puede observar, desde que las plantas miden 5cm ya presentan una mayor cantidad de vasos con respecto a fibras en comparación con el genotipo silvestre. Sin embargo, se observa que las plantas de 5cm aún no presentan regiones de tejido ectópico, aunque sí acumulan una gran cantidad de células de pequeño tamaño alrededor del xilema. El defecto de organización de tipos celulares comienza a observarse a los 10cm. En este punto ya es posible observar regiones de tejido ectópico lignificado en la región que ocuparía el floema (figura 7I) así como una desorganización del xilema, floema y cambium en comparación con Col-0. En todos los estados de desarrollo observados, el ratio fibras/vasos xilemáticos es menor en *d14*.

La aparición a distintos tiempos de cada uno de los fenotipos observados se tendrá en consideración para el diseño del resto de experimentos planteados posteriormente.

Las plantas *d14* presentan regiones de xilema ectópico y una región extensa de tejido con identidad de cambium.

Una incógnita que surge tras confirmar la alteración del patrón vascular en plantas *d14* es cómo están distribuidos los diferentes tipos de tejidos. Para abordar esta cuestión se utilizó una aproximación basada en el análisis de líneas marcadoras. Para ello, se obtuvieron líneas marcadoras específicas de tejido para xilema, floema y cambium tanto con marcador de fluorescencia como con marcador GUS en fondo Col-0. Estas líneas se cruzaron con plantas *d14-1* para la introgresión del marcador en fondo mutante.

En la figura 8 se observa la señal fluorescente derivada de las líneas generadas con los marcadores de xilema (*NST3::CFP*), floema (*APL::CFP*) y cambium (*WOX4::GFP*).

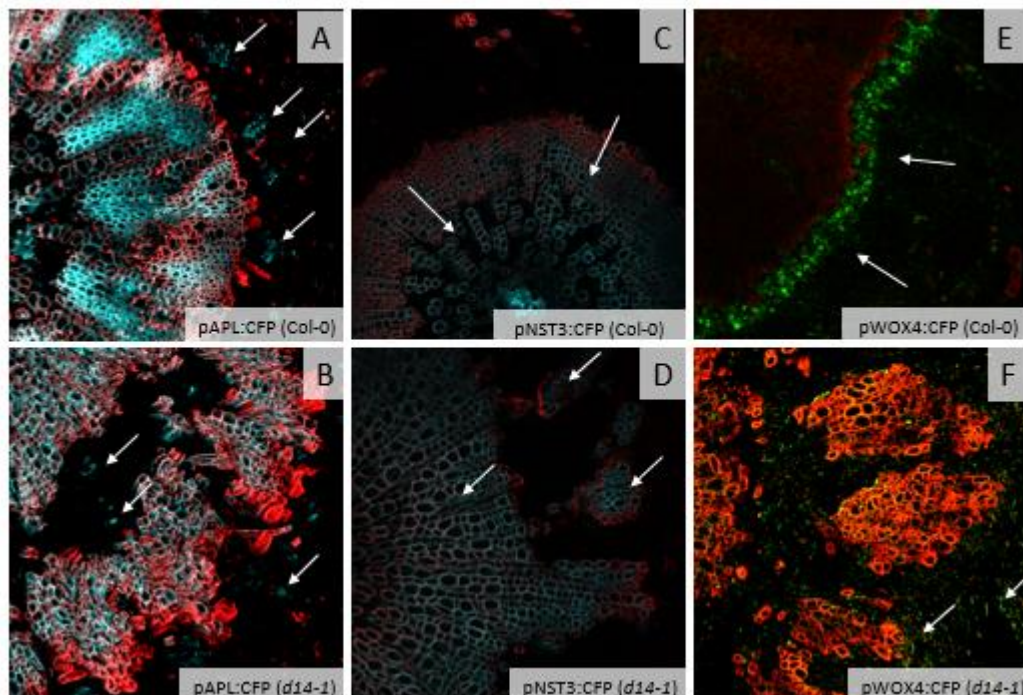


Figura 8: Cortes de hipocótilo en fresco sumergidos en yoduro de etidio para su visualización. A: Hipocótilo de planta Col-0 con marcador de floema (*pAPL::CFP*). B: Hipocótilo de planta *d14-1* con marcador de floema (*pAPL::CFP*). C: Hipocótilo de planta Col-0 con marcador de xilema (*pNST3::CFP*). E: Hipocótilo de planta *d14-1* con marcador de xilema (*pNST3::CFP*). F: Hipocótilo de planta Col-0 con marcador de cámbium (*pWOX4::YFP*). G: Hipocótilo de planta *d14-1* con marcador de cámbium (*pWOX4::CFP*).

Como se puede observar, las regiones lignificadas de tejido ectópico presentes en *d14* tienen identidad de xilema (figura 8D). Además, se puede detectar que algunas de las células rodeando a este tejido tienen identidad de cámbium (figura 8F). Sin embargo, no se muestra una señal homogénea alrededor de las regiones de xilema ectópico, lo que indica que no todas las células presentes en esta región tienen identidad de cambium. Por otra parte, el floema se distribuye de manera dispersa. En Col-0 se observan vasos floemáticos muy cercanos al xilema (figura 8A). No obstante, en *d14* la señal que se observa son puntos alrededor de la región xilemática (figura 8B)

En la figura 9 se presentan los resultados de las líneas marcadoras con GUS. El promotor seleccionado es el del gen ATHB8. Este promotor dirige la expresión del gen marcador en células en proceso de diferenciación a xilema. En plantas *d14* se observa una abundante región de tejido cambial, que cubre desde el borde de la región central xilemática y cubre las regiones de tejido ectópico.

Estos resultados indican que las células de pequeño tamaño previamente observadas son células que se están diferenciando a xilema. En Col-0 la señal se presenta en forma de círculo rodeando al xilema.

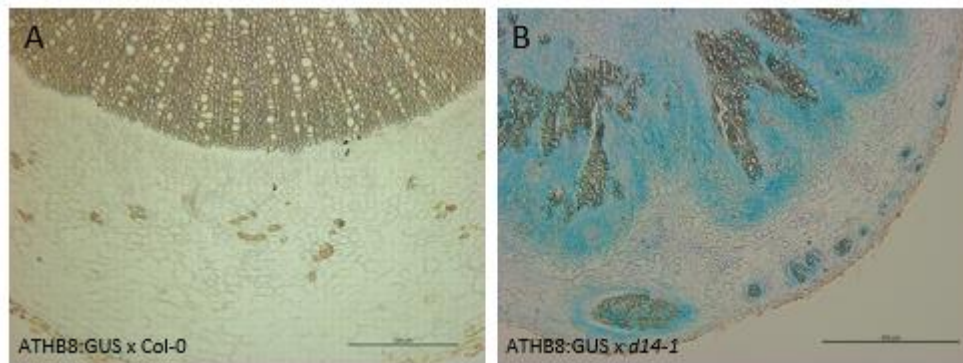


Figura 9: Cortes histológicos de hypocótilos tratados con tinción GUS y teñidos con eosina. A: Hipocótilo de ATHB8::GUS (Col-0). B: Hipocótilo de ATHB8::GUS (d14-1).

En conclusión, el análisis de líneas marcadoras en fondo *d14* indica que las regiones de tejido ectópico tienen identidad de xilema. De la misma forma, se ha podido detectar que en plantas *d14* existe una abundante región de xilema en desarrollo mezclado con cambium que abarca una extensa región del cilindro vascular.

Estos resultados sustentan la hipótesis de que existe una desregulación de señalización hormonal debido a la ausencia de D14.

Los genes reguladores de la actividad cambial se encuentran desregulados en *d14*.

Para elucidar el mecanismo molecular que subyace al fenotipo de organización del patrón vascular observado en *d14*, se realizó un análisis transcriptómico (RNA-seq).

Habiendo determinado que la disminución del ratio de fibras/vasos y la aparición de las regiones xilemáticas deslocalizadas a lo ancho del cilindro vascular aparecen a tiempos distintos del desarrollo vascular, se han seleccionado distintos estadios para analizar el transcriptoma. Este diseño permitirá detectar qué genes están implicados en los dos defectos observados por separado. Se seleccionaron tres estadios diferentes para el análisis: plantas *d14-1* de 5, 10 y 15cm, así como sus controles Col-0. Las comparaciones realizadas quedan explicadas en la figura 10.

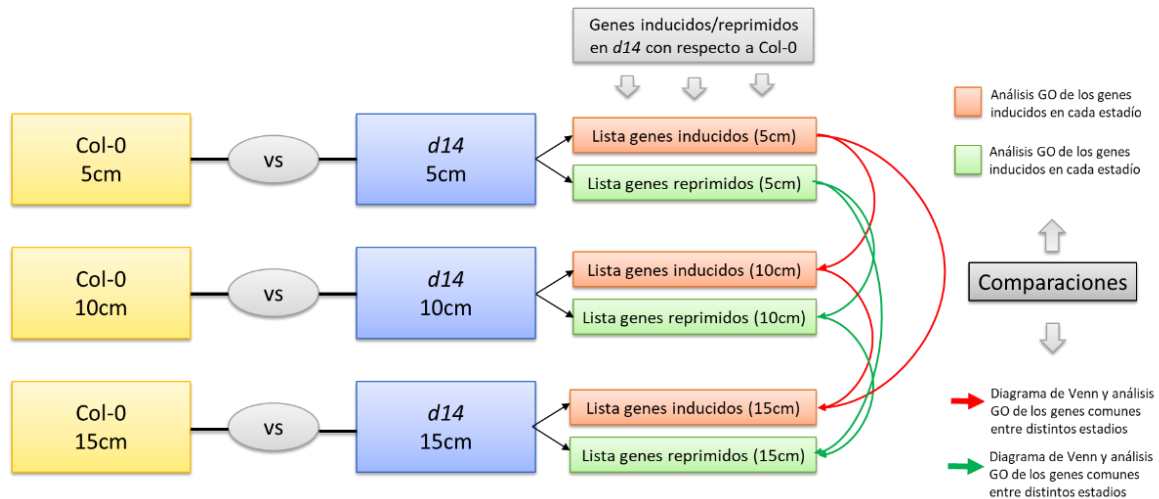


Figura 10: Esquema general orientativo de las comparaciones realizadas a través de los análisis bioinformáticos. Primeramente, se realizó una comparación de las lecturas en crudo de d14 contra Col-0 para identificar los genes inducidos y reprimidos en d14 en cada estadio. Posteriormente se realizaron comparaciones por separado los genes inducidos y reprimidos en d14 en cada una de las condiciones.

En total, 4137 genes se encuentran desregulados a lo largo del crecimiento de d14. La figura 11 recoge varias categorías de genes en función de su patrón de expresión a lo largo de la serie temporal en cada uno de los dos genotipos estudiados. Así, encontramos tanto genes que se encuentran siempre inducidos en d14 con respecto a Col-0, como genes que se inducen o se reprimen a lo largo del desarrollo de la planta o genes que se encuentran reprimidos en todo momento.

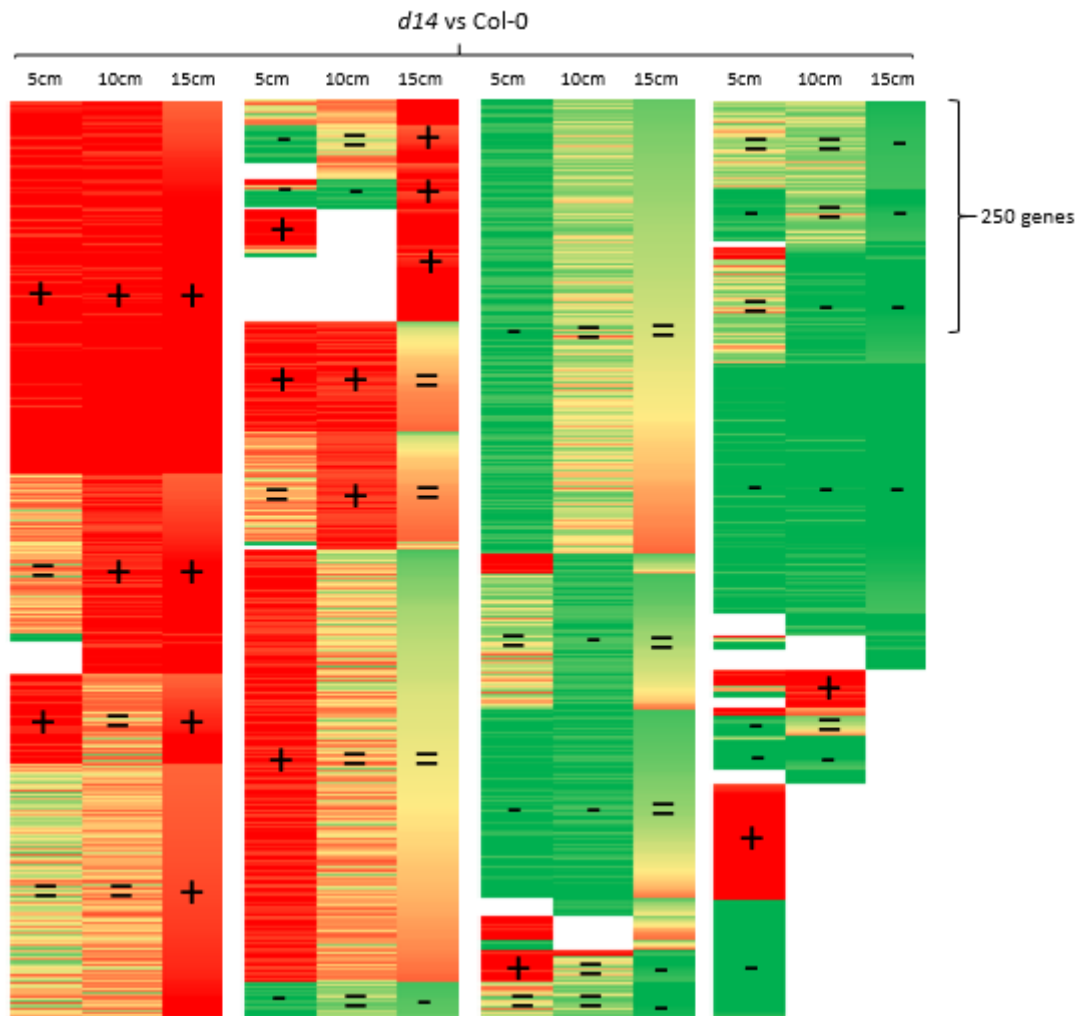


Figura 11: Heatmap de los genes inducidos (rojo) y reprimidos (verde) en *d14* comparado con *Col-0*. El color rojo muestra los genes que presentan un valor de Log_2FC superior a 1 (inducidos) y el color verde los genes que presentan un valor inferior a -1 (reprimidos). Los genes con un valor de Log_2FC entre 1 y -1, genes con una expresión similar en *d14* comparado con *Col-0*, se muestran en amarillo. El valor de $p\text{Value}$ ajustado de los genes seleccionados es menor que 0'05. El criterio para la selección de genes se aplicó para cada gen individualmente. En el caso de que el gen no pase el criterio de $p\text{Value}$ ajustado en alguna de las condiciones se muestra en color blanco.

Para determinar la función biológica en la cual están involucrados los genes seleccionados se realizó un estudio de enriquecimiento de términos de ontología génica (GO). Tras la comparación de los términos en los tres estadios podemos observar que a lo largo del crecimiento de *d14* se produce una represión progresiva de genes involucrados en la respuesta a giberelinas (AT1G74670, AT5G14920, AT3G10185) en comparación con *Col-0* (figura 12 B). Por otra parte, también se observa que en *d14* también existe una inducción fuerte de genes relacionados con la respuesta a auxinas en etapas tempranas (5cm), que se va reduciendo a lo largo del ciclo de la planta (figura 12 A).

A Genes inducidos					B Genes reprimidos								
No	GO Term	Onto	Description	CM			No	GO Term	Onto	Description	CM		
				1	2	3					1	2	3
1	GO:0050996	P	response to stimulus	1	2	3	1	GO:0019760	P	glucosinolate metabolic process	1	2	3
2	GO:0010033	P	response to organic substance	1	2	3	2	GO:0016137	P	glycoside metabolic process	1	2	3
3	GO:0009725	P	response to hormone stimulus	1	2	3	4	GO:0019757	P	glucosinolate metabolic process	1	2	3
4	GO:0009719	P	response to endogenous stimulus	1	2	3	5	GO:0016138	P	glycoside biosynthetic process	1	2	3
5	GO:0042221	P	response to chemical stimulus	1	2	3	6	GO:0016144	P	5-glycoside biosynthetic process	1	2	3
6	GO:0009733	P	response to auxin stimulus	1	2	3	7	GO:0019761	P	glucosinolate biosynthetic process	1	2	3
7	GO:0065007	P	biological regulation	1	2	3	8	GO:0019758	P	glucosinolate biosynthetic process	1	2	3
8	GO:0050794	P	regulation of cellular process	1	2	3	9	GO:0010876	P	lipid localization	1	2	3
9	GO:0005984	P	disaccharide metabolic process	1	2	3	10	GO:0034637	P	cellular carbohydrate biosynthetic process	1	2	3
10	GO:0009834	P	secondary cell wall biogenesis	1	2	3	11	GO:0044262	P	cellular carbohydrate metabolic process	1	2	3
11	GO:0010556	P	regulation of macromolecule biosynthetic process	1	2	3	12	GO:0044272	P	sulfur compound biosynthetic process	1	2	3
12	GO:0009889	P	regulation of biosynthetic process	1	2	3	13	GO:0016051	P	carbohydrate biosynthetic process	1	2	3
13	GO:0031326	P	regulation of cellular biosynthetic process	1	2	3	14	GO:0009896	P	response to stimulus	1	2	3
14	GO:0045449	P	regulation of transcription	1	2	3	15	GO:0006790	P	sulfur metabolic process	1	2	3
15	GO:0080090	P	regulation of primary metabolic process	1	2	3	16	GO:0005975	P	carbohydrate metabolic process	1	2	3
16	GO:0060918	P	auxin transport	1	2	3	17	GO:0019748	P	secondary metabolic process	1	2	3
17	GO:0009926	P	auxin polar transport	1	2	3	18	GO:0009889	P	regulation of biosynthetic process	1	2	3
18	GO:0019219	P	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1	2	3	19	GO:0010556	P	regulation of macromolecule biosynthetic process	1	2	3
19	GO:0009914	P	hormone transport	1	2	3	20	GO:0031326	P	regulation of cellular biosynthetic process	1	2	3
20	GO:0031323	P	regulation of cellular metabolic process	1	2	3	21	GO:0045449	P	regulation of transcription	1	2	3
21	GO:0051171	P	regulation of nitrogen compound metabolic process	1	2	3	22	GO:0019219	P	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	1	2	3
22	GO:0006950	P	response to stress	1	2	3	23	GO:0080090	P	regulation of primary metabolic process	1	2	3
23	GO:0019222	P	regulation of metabolic process	1	2	3	24	GO:0031323	P	regulation of cellular metabolic process	1	2	3
24	GO:0003700	F	transcription factor activity	1	2	3	25	GO:0051171	P	regulation of nitrogen compound metabolic process	1	2	3
25	GO:0030528	F	transcription regulator activity	1	2	3	26	GO:0006950	P	response to stress	1	2	3
26	GO:0009723	P	response to ethylene stimulus	1	2	3	27	GO:0015833	P	peptide transport	1	2	3
27	GO:0006970	P	response to osmotic stress	1	2	3	28	GO:0006857	P	oligopeptide transport	1	2	3
							29	GO:0009739	P	response to gibberellin stimulus	1	2	3
							30	GO:0006355	P	regulation of transcription, DNA-dependent	1	2	3
							31	GO:0051252	P	regulation of RNA metabolic process	1	2	3
							32	GO:0032774	P	RNA biosynthetic process	1	2	3
							33	GO:0043221	P	response to chemical stimulus	1	2	3
							34	GO:0003700	F	transcription factor activity	1	2	3
							35	GO:0030528	F	transcription regulator activity	1	2	3
							36	GO:0018798	F	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	1	2	3
							37	GO:0004553	F	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	1	2	3
							38	GO:0010476	P	gibberellin mediated signaling pathway	1	2	3
							39	GO:0009740	P	gibberellin acid mediated signaling pathway	1	2	3

Figura 12: Análisis de ontología génica de los genes inducidos (A) y reprimidos (B) en *d14* con respecto a *Col-0* en los tres estadios (1: 5cm, 2: 10cm, 3: 15cm). Los genes inducidos seleccionados presentan un valor de $\text{Log}_2\text{foldChange}$ superior a 1 así como un $p\text{Value Ajustado}$ mayor a 0'05. Los genes reprimidos seleccionados presentan un valor de $\text{Log}_2\text{foldChange}$ inferior a -1 así como un $p\text{Value Ajustado}$ mayor a 0'05. El grado de significancia se muestra en tonalidades entre rojas y amarillas, siendo el rojo la mayor significancia y el amarillo el menor valor de significancia. En color gris se muestran los resultados no significativos.

Otra característica a resaltar en *d14* es el desbalance a nivel de actividad de diversos factores de transcripción. Podemos observar la inducción y la represión de diversos factores de transcripción. Esto se suma a la desregulación que se muestra a nivel de los procesos de biosíntesis de macromoléculas. En especial, podemos destacar la inducción de la biosíntesis de fenilpropanoides y el metabolismo de oligosacáridos, así como la fuerte represión de la biosíntesis de carbohidratos y glicosinolatos constante durante todo el desarrollo de la planta.

El análisis también detecta una represión constante a lo largo del desarrollo de genes involucrados en el transporte de moléculas a través de membrana.

Estos resultados nos dan una visión general de lo que ocurre a nivel molecular. Como podemos observar, existe una gran desregulación tanto a nivel transcripcional como a nivel hormonal que está relacionado con lo observado a nivel fenotípico en los diferentes estadios de *d14* con respecto a *Col-0*.

Ahora, para poder obtener el conjunto de genes involucrado en las dos alteraciones fenotípicas vasculares observadas, debemos determinar qué genes están desregulados en los diferentes estadios y cuáles de estos genes están desregulados en varios estadios. Para ello, la primera aproximación que se llevó a cabo fue la generación de diagramas de Venn de los genes inducidos y reprimidos en *d14* con respecto a *Col-0* (figura 13).

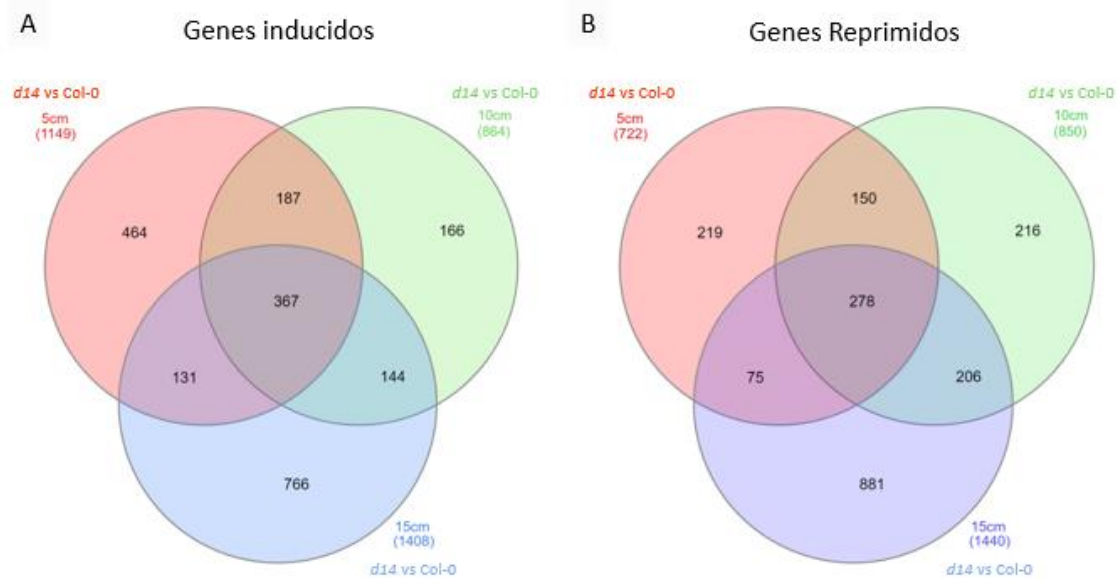


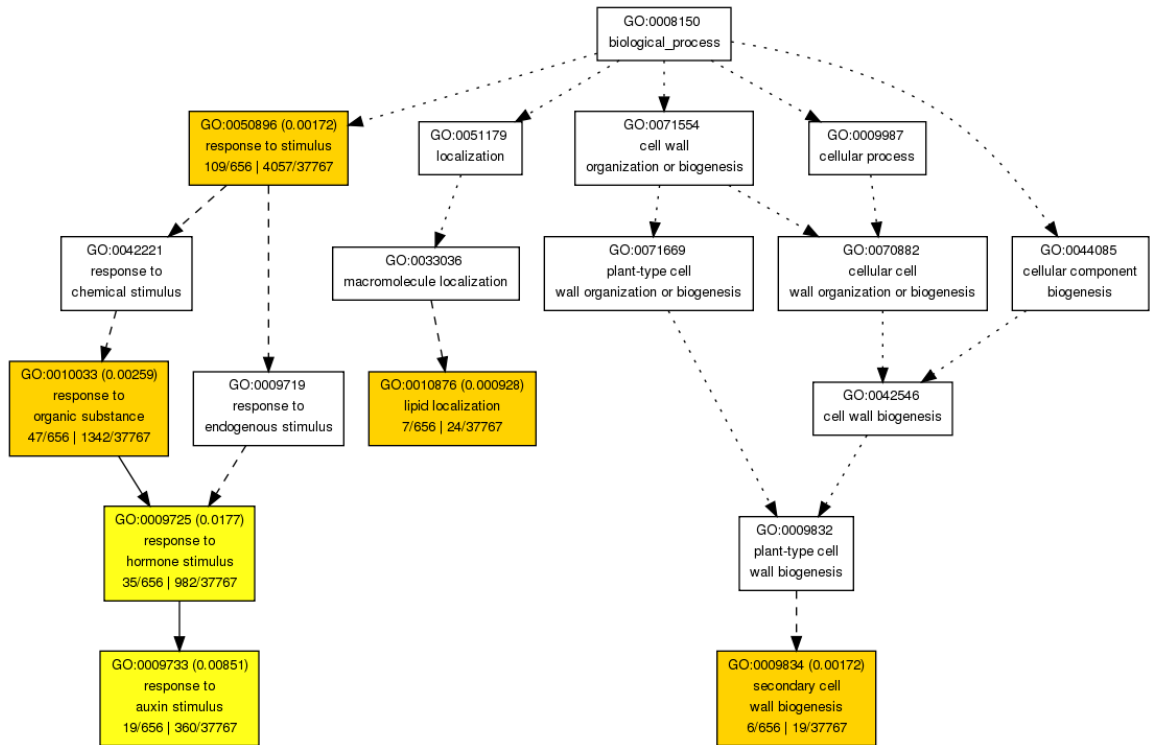
Figura 13: Diagramas de Venn de los genes inducidos (A) y reprimidos (B) en *d14* con respecto a *Col-0* en los diferentes estadios (5, 10 y 15cm). Los genes seleccionados presentan un valor de Log_2FC superior a 1 en el caso de los genes inducidos e inferior a -1 en el caso de los reprimidos. El valor de $p\text{Value}$ ajustado de los genes seleccionados es menor que 0'05. Los criterios para la selección de genes fueron aplicados en cada estadio por cada gen individual, siendo un criterio aún más estricto que para los resultados mostrados anteriormente.

Dentro de los genes inducidos y reprimidos en *d14*, los genes comunes entre 10 y 15cm serían, en principio, los que tendrían más posibilidades de ser los causantes de la presencia de las regiones xilemáticas ectópicas. De la misma forma, los genes inducidos y reprimidos comunes entre 5, 10 y 15cm y los genes presentes únicamente en 5cm podrían ser los responsables de producir el aumento del cambium y de la ausencia de fibras.

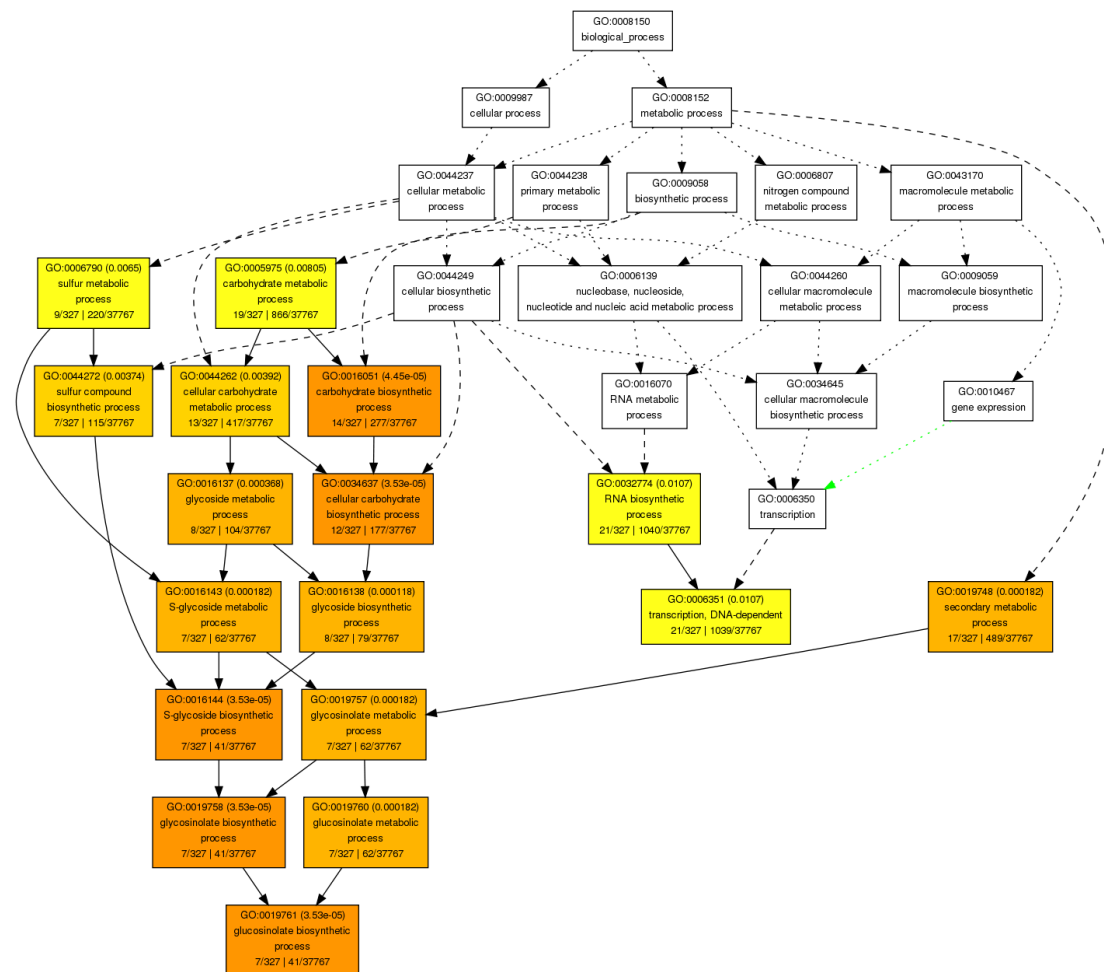
El resultado de los análisis de términos GO de los diferentes grupos candidatos se muestra en la figura 14.

A

B



B



C

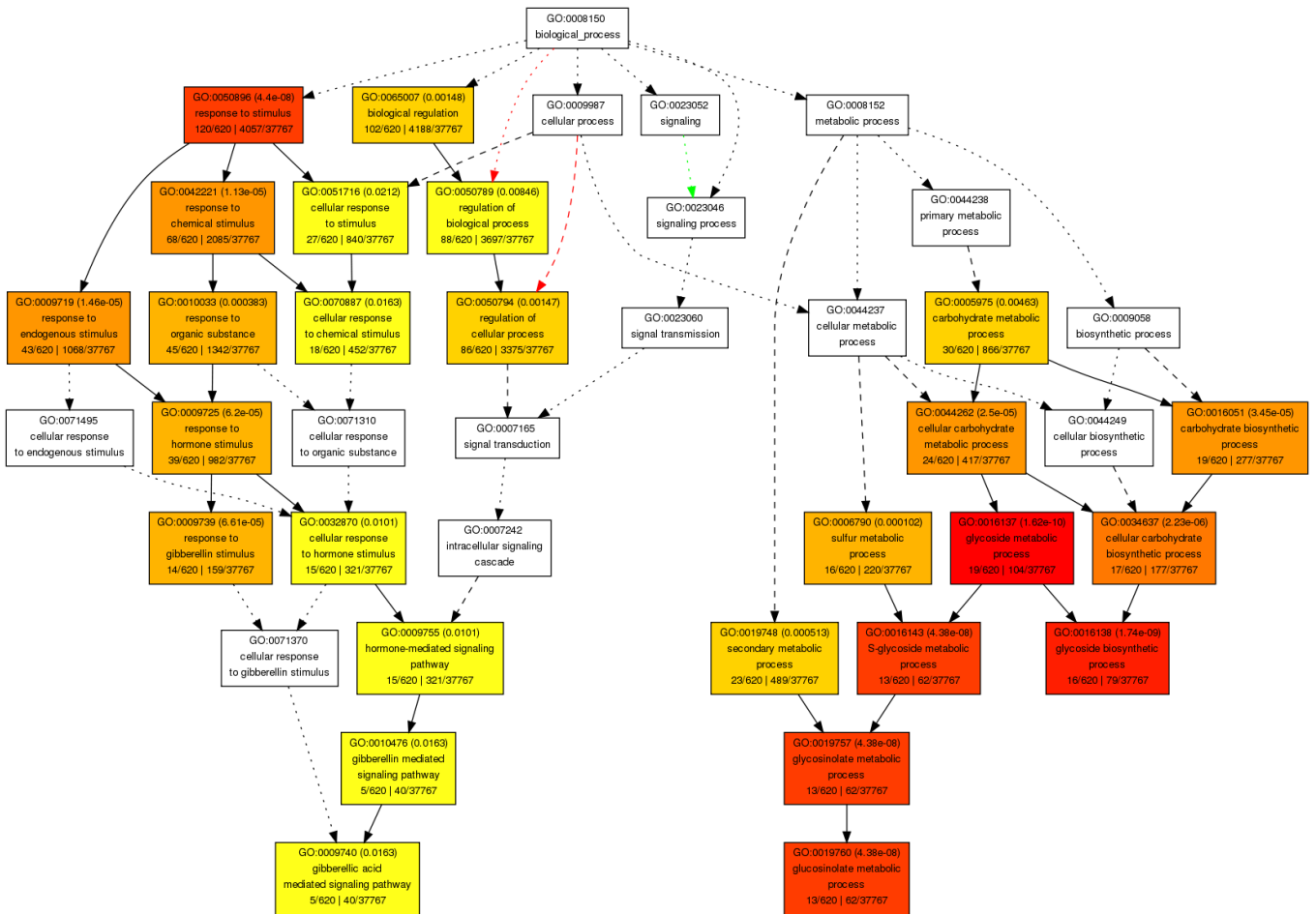


Figura 14: Resultados esquemáticos de los análisis GO realizados con los genes inducidos y reprimidos a los 5cm (A); 10cm y 15cm (B); 5cm, 10cm y 15cm (C).

Tras el análisis realizado, se puede observar que a los 5cm se destacan genes relativos a auxinas, así como genes involucrados en la formación de la pared secundaria (Figura 14 A). Por otra parte, en 10cm y 15cm resaltan las categorías de glicósidos y glucosinolatos (Figura 1 B). En cuanto a los genes destacados en los tres estadios (5, 10 y 15cm), se puede destacar la señalización por giberelinas.

La validación de los resultados de RNA-seq se realizó por qRT-PCR (figura 1-Anexo)

El tratamiento con giberelinas revierte los efectos fenotípicos producidos por la ausencia de D14.

El perfil transcriptómico generado sugiere una elevada represión de genes involucrados en la síntesis de giberelinas, especialmente en etapas tempranas del desarrollo de plantas *d14*. Dentro del amplio abanico de funciones de las giberelinas una de ellas es la de promover la diferenciación de las fibras xilemáticas (Dayan J. et al., 2012)

Como se ha demostrado previamente, a lo largo del desarrollo de *d14* el ratio fibras/vasos es muy bajo, hasta el punto de mostrar una ausencia completa fibras en etapas tempranas del desarrollo.

Por lo tanto, una de las cuestiones que se plantean es si *d14* tiene un déficit de giberelinas y si es dicha ausencia la causante de la reducción proporcional de fibras. Para comprobar esta hipótesis, se trataron plantas *d14* con giberelinas (GA3) así como plantas *max4* y Col-0. Del mismo modo, se trataron con paclobutrazol, inhibidor de la síntesis de giberelinas, para observar los efectos del déficit casi absoluto de giberelinas, y mock como control. Los resultados se muestran en la figura 15.

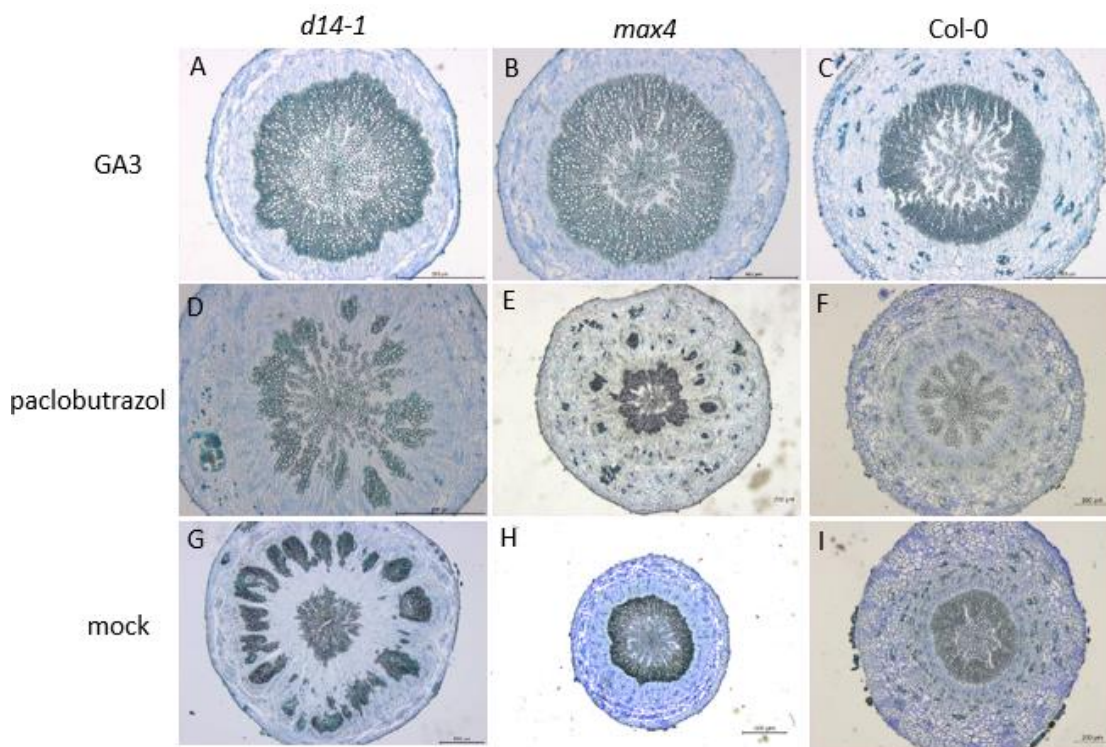


Figura 15: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina. A: Hipocótilo de *d14-1* adulta tratada con GA3. B: Hipocótilo de *max4* adulta en GA3. C: Hipocótilo de Col-0 adulta tratada con GA3. D: Hipocótilo de *d14-1* adulta tratada con paclobutrazol. E: Hipocótilo de *max4* tratada con paclobutrazol. F: Hipocótilo de Col-0 adulta tratada con paclobutrazol. G: Hipocótilo de *d14-1* tratada con mock. H: Hipocótilo de *max4* adulta tratada con mock. I: Hipocótilo de Col-0 tratada con mock.

Como se puede observar, el tratamiento con GA3 revierte casi totalmente los efectos fenotípicos vasculares en *d14-1*. De la misma forma, el tratamiento revierte igualmente los efectos fenotípicos de plantas *max4*. Podemos observar que el tratamiento con GA3 aumenta la cantidad de fibras en *d14*, así como permite la formación de un cilindro vascular similar al silvestre, implicando que las GAs no solo revierten el fenotipo de abundancia relativa de tipos celulares xilemáticos sino también el de organización del patrón vascular.

Por otra parte, podemos observar que el tratamiento con paclobutrazol aumenta los defectos fenotípicos observados, tanto en *d14* como en *max4*. Sin embargo, en Col-0 no altera el orden del cilindro vascular, únicamente reduce la cantidad de fibras.

Los resultados muestran que las giberelinas son un factor importante para la recuperación del fenotipo vascular. Sin embargo, su ausencia (por ejemplo, WT con tratamientos con paclobutrazol) no es la única la causa de los defectos observados. Dado que las plantas con déficit de señalización por SLs (*d14*) suplementadas con GAs muestran un patrón de desarrollo vascular prácticamente idéntico al silvestre, se plantea la hipótesis (discutida en la siguiente sección) de que la pérdida de la señalización por giberelinas y por SLs conlleva la pérdida de la organización del patrón de desarrollo de la vasculatura secundaria. Por tanto, es suficiente con que una de las dos rutas de señalización esté activa para el mantenimiento de dicho patrón.

La expresión de *D14* bajo promotores específicos de tejido vascular revierte los efectos fenotípicos vasculares observados.

Teniendo caracterizados los efectos que produce la ausencia de *D14* tanto a nivel fenotípico como a nivel molecular, una de las cuestiones que se plantean es si existe un tejido de entre los vasculares que sea clave para mediar los efectos de *D14* sobre el patrón de desarrollo. Para responder a esta pregunta se plantea la expresión de *D14* en cambium, xilema o floema utilizando promotores específicos de tejido. Ya es conocido que *D14* en arroz está presente en el floema y es transportada junto con el resto de componentes de la savia hasta las yemas axilares (Kameoka H., et al 2016). Sin embargo, se desconoce si esta proteína es capaz de atravesar las distintas capas del tejido vascular hasta la región donde es requerida.

Según los resultados observados en la figura 16, podemos determinar que la expresión de *D14* bajo un promotor constitutivo de floema (figura 16 C) revierte las alteraciones observadas. Como vemos, desaparecen las regiones de xilema ectópico presentes en *d14* (figura 16 B), así como se aprecia una reducción de células del cambium.

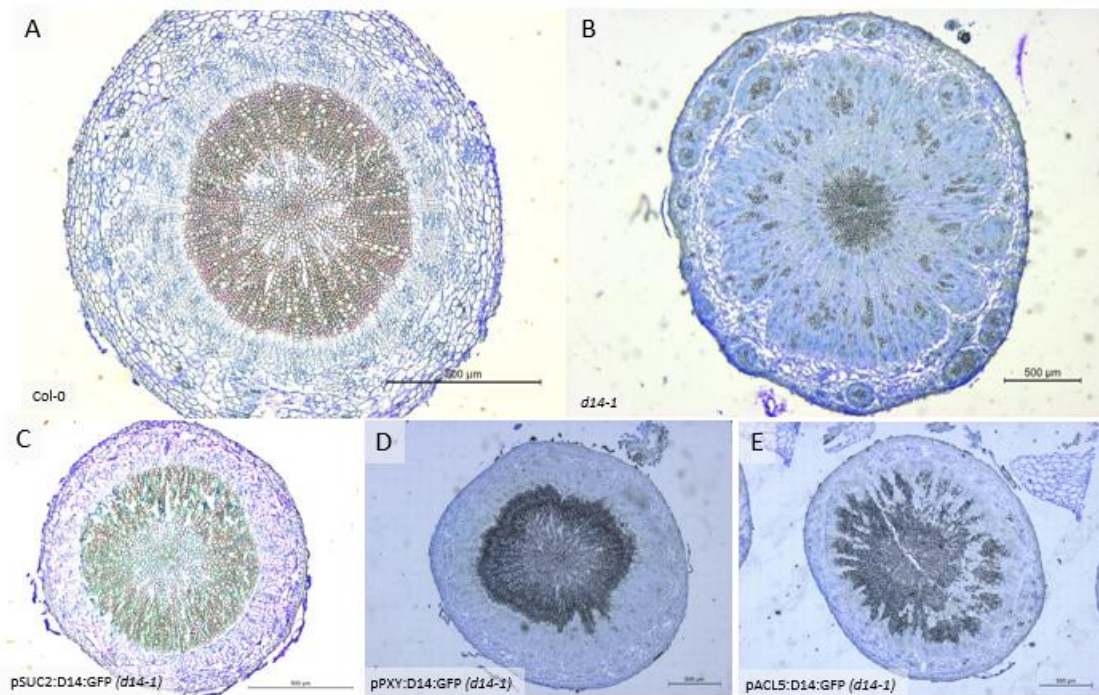


Figura 16: Cortes histológicos de hipocótilos teñidos con azul de toluidina. A: Hipocótilo de Col-0 de planta adulta. B: Hipocótilo de *d14-1* adulta. C: Hipocótilo de *d14-1* adulta expresando D14 marcada con GFP bajo un promotor constitutivo de floema (*pSUC2:D14:GFP*). D: Hipocótilo de *d14-1* adulta expresando D14 marcada con GFP bajo un promotor constitutivo de cámbium (*pPXY:D14:GFP*). E: Hipocótilo de *d14-1* adulta expresando D14 marcada con GFP bajo un promotor constitutivo de xilema (*pACL5:D14:GFP*).

Las líneas expresando D14 en xilema y cámbium no pudo llevarse a homocigosis, por lo que son heterocigotas para la expresión de la proteína en fondo *d14-1*. Sin embargo, se pueden apreciar tendencias en cuanto a efectos fenotípicos a nivel de vasculatura. Así, la línea que expresa D14 en el cámbium (figura 16 D) en heterocigosis consigue revertir parcialmente las alteraciones vasculares observadas en plantas *d14-1*. El cilindro vascular vuelve a ser fenotípicamente similar al silvestre. Por otra parte, expresando D14 en el xilema no se observa la recuperación del fenotipo silvestre. Sin embargo, hay que remarcar que los resultados no son concluyentes hasta que no se obtengan plantas homocigotas.

El hecho de que la expresión de *D14* en floema o en cambium reviertan (al menos parcialmente) el fenotipo sugiere la existencia de un mecanismo de transporte de la proteína hacia el lugar dónde se requiere. Sin embargo, el fenotipo obtenido en la línea que expresa D14 en xilema indicaría que el transporte de la proteína no es omnidireccional. En todo caso, el análisis de las líneas homocigotas despejará dudas en este sentido.

En la figura 17 podemos observar la localización exacta de la expresión del promotor específico de floema utilizado en Col-0 (A). La figura 17 B, por otra parte, muestra la localización de la proteína D14 marcada con GFP y expresada bajo el mismo promotor en fondo genético *d14-1*.

Como se observa la proteína se muestra en una región mucho más acotada que la expresión del promotor de floema utilizado (la región circundante al cambium; Figura 16B), zona donde se encuentra normalmente el floema en desarrollo, sugiriendo un movimiento de D14 hacia esta zona.

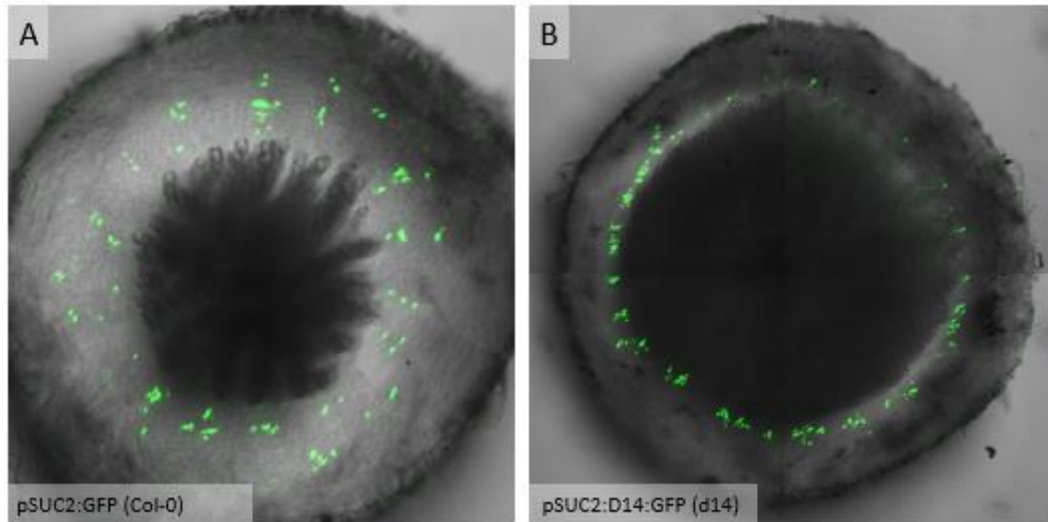


Figura 17: Muestras de hipocotilos cortadas en fresco tratadas con Clearsee observadas al microscopio confocal. A: muestra expresando D14 marcada con GFP bajo promotor floema en fondo Col-0 (pSUC2:GFP). B: muestra expresando D14 marcada con GFP bajo promotor floema en fondo d14 (pSUC2:D14:GFP).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han permitido iniciar la caracterización de los efectos fenotípicos y moleculares que produce la mutación del gen D14 a lo largo del desarrollo de la vasculatura secundaria en *Arabidopsis thaliana*. Los resultados obtenidos indican que D14 está involucrado en la diferenciación celular, promoviendo la síntesis de fibras, y en la organización del patrón vascular. Estos defectos son independientes de la ramificación presente en mutantes de biosíntesis o señalización de SLs (entre los cuales se encuentra d14), puesto a que brc2, afectado en ramificación, no presenta defectos a nivel de vasculatura.

Pese a que, como se ha indicado, los defectos a nivel de vasculatura secundaria no sólo aparecen en d14 sino también en otros mutantes de biosíntesis (max1, max4) y señalización de SLs (max2), estos, no son tan pronunciados como en d14 (figura 5). Esto es probable que se deba al papel central que juega D14 en la ruta de señalización por SLs. En mutantes de biosíntesis de SLs, es posible que exista una cantidad residual de SLs que atenúe el fenotipo. En el caso de max2, es posible que no se bloquee totalmente la cascada de señalización dado que (i) MAX2 actúa aguas abajo de D14 (implicando que no altera la capacidad de D14 para unirse a las SLs) y (ii) entra dentro de lo posible que tenga cierta redundancia con otras proteínas F-box.

La caracterización anatómica temporal de los defectos vasculares observados ha permitido conformar que las dos alteraciones anatómicas descritas (ratio fibras/vasos y organización del patrón tisular) aparecen en tiempos distintos durante el desarrollo (figura 7). Desde el inicio del desarrollo vascular ya se puede percibir la baja frecuencia de diferenciación de fibras xilemáticas (figura 7 A). Sin embargo, no es hasta más tarde, cuando la planta alcanza aproximadamente los 10cm, cuando se originan las regiones de xilema ectópico. A partir de este punto es cuando se aprecia la alteración del patrón de desarrollo vascular. Esta alteración presenta regiones de xilema ectópico rodeadas de células de cambium y células de xilema en diferenciación, así como regiones de floema situadas aleatoriamente en el cilindro vascular (figura 7 D).

Los análisis presentados en este proyecto indican que los defectos anatómicos identificados a nivel de vasculatura concuerdan en gran medida con los resultados obtenidos a nivel transcriptómico. En etapas tempranas del desarrollo existe una fuerte inducción de genes relacionados con el transporte y la respuesta a auxinas. Las auxinas son hormonas con efectos ya conocidos sobre el desarrollo vascular (Vannestres y Friml., 2009). En estudios previos se ha demostrado la relación de SLs con las auxinas (Chen et al., 2008). Sin embargo, no existe tanto conocimiento en cuanto a la acción de las auxinas sobre el desarrollo vascular en ausencia de señalización por SLs. Genes responsables de la biosíntesis de auxinas como la IAA-AMIDO SINTASA2 (AT4G37390), genes involucrados en el transporte de auxinas como el gen codificante de la proteína PIN5 (AT5G16530) y genes de respuesta a auxinas como el gen ARF11 (AT2G46530) se encuentran inducidos en d14.

Las auxinas son sintetizadas en el meristemo apical y se transportan hacia las regiones inferiores de la planta a través de transportadores. Estas tienen diferentes funciones entre las cuales está el control de la diferenciación vascular (Chen et al., 2008). Desde hace tiempo se conoce que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de auxina presente en tejidos vasculares y el ratio de diferenciación (Bourbouloux and Bonnemain, 1979). Esta correlación también se ha encontrado entre el ratio de transporte de auxinas y la actividad del cámbium (Hollis y Tepper, 1971)

En d14, se puede observar un aumento considerable de células cambiales y células en proceso de diferenciación a xilema. Este aumento del ratio de diferenciación concuerda con la sobreexpresión de genes involucrados en la respuesta a auxinas detectado.

Adicionalmente, el aumento del cámbium queda reflejado en parte por el aumento del metabolismo de disacáridos, ya que se ha demostrado que existe relación entre el aumento de la actividad enzimática de monosacáridos y el aumento de la actividad del cámbium (Hauch y Magel, 1998).

Otra de las funciones conocidas de las auxinas es la inhibición del crecimiento de las yemas laterales manteniendo la dominancia apical. Las plantas d14 presentan un desarrollo descontrolado de las yemas de roseta. Las hojas de roseta conteniendo las yemas se insertan en el hipocótilo. Por tanto, sería plausible que la pérdida de dominancia apical sobre estas yemas se explicara por una acumulación masiva de auxinas en el hipocótilo debida a la desorganización general del patrón vascular secundario de este. Así, la desorganización tisular en el hipocótilo impediría, físicamente, el transporte de las auxinas a las yemas axilares de las hojas de roseta.

Llama la atención la sobreexpresión en d14 de PXY y WOX4, dos genes clave en regulación de la actividad cambial. PXY es un gen requerido para mantener la polaridad celular requerida para el control de la división celular durante el desarrollo vascular (Fisher y Turner, 2007) mientras que WOX4 está involucrado en la diferenciación del xilema y floema (Ji et al., 2010) y actúa aguas abajo en la señalización mediada por PXY (Hirakawa et al., 2010). La sobreexpresión de ambos genes explicaría (o al menos concuerda con) la proliferación excesiva de células del xilema.

Los datos transcriptómicos indican una gran represión de genes involucrados en la biosíntesis de giberelinas (GA20 oxidasas y GA2 oxidasas), así como de genes regulados por dichas hormonas (AT1G74670, AT5G14920, AT3G10185). Las giberelinas juegan un papel fundamental en la diferenciación de las fibras xilemáticas (Felipo-Benavent A. et al., 2018). La baja proporción de fibras en d14 concuerda con la ausencia de biosíntesis de giberelinas. Sorprendentemente, el tratamiento con giberelinas (figura 15) consigue revertir no solo el fenotipo de diferenciación de fibras sino, en gran medida, el de organización tisular en d14. Esto implica que la señalización por giberelinas es también un factor importante para el establecimiento del patrón de desarrollo vascular normal, lo cual es una función hasta ahora desconocida para esta hormona.

Considerando que (i) los tratamientos con paclobutrazol (un agente inhibidor de la biosíntesis de giberelinas) en Col-0 inhiben la diferenciación de fibras pero no tienen efecto sobre el patrón de organización de la vasculatura secundaria y (ii) los tratamientos con giberelinas sobre d14 recuperan la organización de dicho patrón, se plantea la hipótesis de que, para el mantenimiento del patrón de organización de la vasculatura secundaria es necesario que tanto la ruta de señalización por giberelinas como la de SLs estén activas (Figura 18).

La recepción de SLs por medio de D14 conduce a la formación de un complejo de proteínas que media la ubiquitinación (para su posterior degradación) de las proteínas SMXL6, SMXL7 y SMXL8 (Chevalier et al., 2014). La degradación de estas proteínas dispara la señalización por SLs y, de hecho, estas proteínas fueron identificadas durante un rastreo para detectar supresores de MAX2 (Wang et al., 2015).

A tenor de los resultados presentados aquí, hipotetizamos que una de las funciones de SMXL6, SMXL7 y SMXL8 podría ser la de inhibir la síntesis o la señalización de giberelinas (figura 18). Al presentar una señalización reducida de giberelinas, se produciría una disminución de la cantidad de fibras vasculares. De la misma forma, al reducirse la cantidad de giberelinas presentes, estas no podrían regular la expresión de proteínas con dominio DELLA (Silverstone et al., 2001; Dil et al., 2004). Este grupo de proteínas, entre las cuales nos encontramos proteínas como RGA o GAI, tienen múltiples funciones entre las cuales podemos destacar la represión de la actividad BP, clave en la formación de fibras (Felipo-Benavent et al., 2018), la represión de la elongación del tallo o la dominancia apical (Dill y Sun 2001). La acumulación de DELLA y de SMXLs bloquearía tanto la señalización por giberelinas como por SLs, propiciando los fenotipos vasculares observados.

Los datos transcriptómicos indican que los genes **ACL5** y **ATHB8** están sobreexpresados en d14. **ACL5** codifica una termoespermina sintasa y su expresión está regulada positivamente por auxinas y por el factor de transcripción **ATHB8**, cuya expresión también está regulada, a su vez, por auxinas (Vera-Sirera et al., 2015). La termoespermina está involucrada en la diferenciación del xilema, impulsando la proliferación y maduración de los vasos (Muñiz et al., 2008). La sobreexpresión de **ATHB8** y de **ACL5** es probable que sea debida al exceso de señalización por auxinas observado en d14.

Futuros tratamientos con auxinas sobre d14 así como otros experimentos encaminados a entender la regulación específica de D14 sobre la actividad de las auxinas en el hipocótilo, determinarán si las auxinas participan en la señalización hormonal cruzada descrita entre giberelinas y SLs durante la regulación del desarrollo vascular secundario.

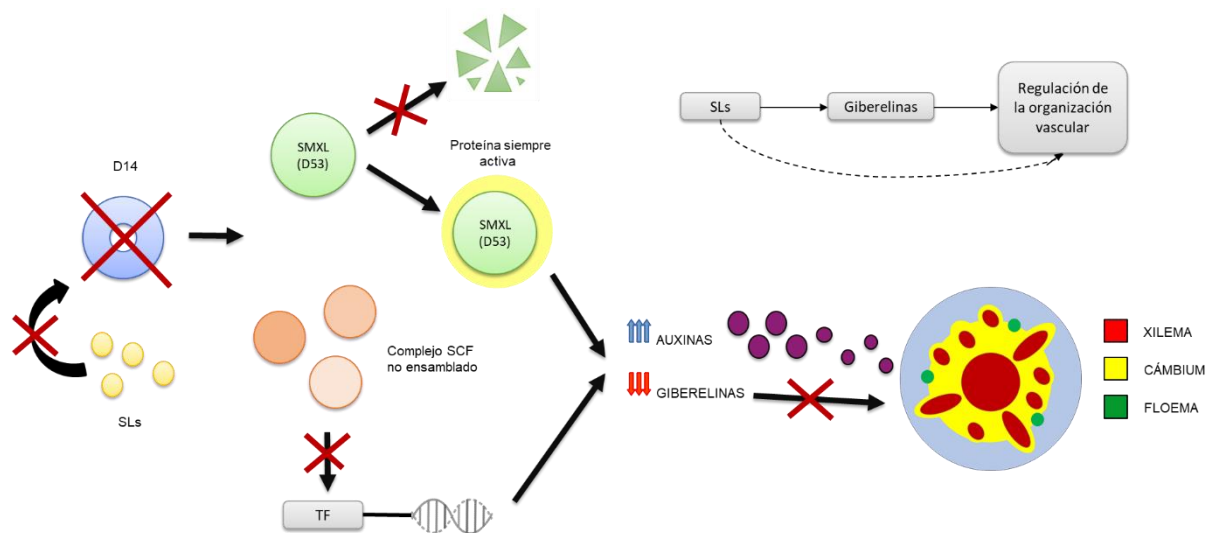


Figura 18: esquema de la ruta hipotética de señalización en ausencia de SLs.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esterilización de las semillas

Las semillas fueron esterilizadas siguiendo el método modificado de Parsa *et al.*, (2018). Las semillas se trataron con etanol 70 con tritón X 100 (0,05%) durante 2 minutos y seguidamente se introdujeron en etanol al 96% durante 1 minuto. Posteriormente, las semillas se dejaron secar sobre papel estéril dentro de cabina de flujo laminar para eliminar los restos de etanol.

Estratificación de las semillas

Las semillas se colocaron en agarosa al 0,1% y se almacenaron en oscuridad a 4°C durante al menos 48h para la vernalización de las mismas (Sung & Amasino, 2005).

Las semillas ya estratificadas fueron sembradas en tierra. Se sembraron de 3 a 4 semillas por maceta para asegurar la germinación de al menos 1 planta por maceta. Una vez producida la germinación de las plantas se eliminaron las plántulas sobrantes dejando únicamente 1 planta por maceta. Las plantas se cultivaron en un fitotrón con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 21°C.

Genotipado de las muestras

Se recogieron entre 2 y 3 hojas por planta adulta con ayuda de unas pinzas estériles. El material extraído fue conservado a -20°C hasta su posterior manipulación.

Para la extracción de DNA genómico, las muestras fueron trituradas manualmente en hielo con la ayuda de un mortero pequeño de uso para eppendorf. A cada muestra individual se añadieron 400µl de tampón TNES (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, y 10% sucrosa). Los eppendorfs con las muestras, fueron centrifugados a 11000rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se recuperaron 350 µl con cuidado de no arrastrar el pellet y se colocaron en otro eppendorf. Se añadieron 350 µl de isopropanol en cada uno y se agitaron manualmente mediante inversión 5 veces. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 11000rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y posteriormente se dejaron secar durante 3 horas para la eliminación total del isopropanol residual. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas en 50 µl agua miliQ estéril y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

El genotipado de las muestras fue realizado mediante el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores empleados para los diferentes genotipados quedan recogidos en la tabla 1.

GEN	SECUENCIA	USO
D14	GCGCCGTCTCGCTCGAATGAGTCAACACAACATCTTAGAA	GoldenBraid
D14	GCGCCGTCTCGGCGACCTAAGATACTCCGCC	GoldenBraid
D14	GCGCCGTCTCGTCGCATCTCGGTGGAGATAC	GoldenBraid
D14	GCGCCGTCTCGCTACGAACCCCGAGGAAGAGCTCGCCGGA	GoldenBraid
PXY	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGCGTAGCTTTTAGAAAGAAATTAAGT	GoldenBraid
PXY	GCGCCGTCTCGAAAGACCTAGCTCGACACATT	GoldenBraid
PXY	GCGCCGTCTCGCTTTTCATTCTTTAATTTACATGTTAATC	GoldenBraid
PXY	GCGCCGTCTCGCTCACATTAAAGGCATAGCTTGGATTTCC	GoldenBraid
ACL5	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGATCCAAGTTGAGGAGAAGATATAG	GoldenBraid
ACL5	GCGCCGTCTCGCATCTCTTCGTGAACATATAGAC	GoldenBraid
ACL5	GCGCCGTCTCGGATGACGATCATATATTTAAAACATTC	GoldenBraid
ACL5	GCGCCGTCTCGCTCACATTACCATTGATTTTGTTCACCA	GoldenBraid
d14-1	AAGAATATGGCAAGTGCAAC	Genotipado
d14-1	GATGATTCCGATCATAGCG	Genotipado
d14-seto	TCGAAGAAAAGAAGGGCCTCT	Genotipado
d14-seto	TGTGACAATGCCAACTGTCCT	Genotipado
d14-3	AAAGATAGCCGCAGAGTCTCC	Genotipado
d14-3	ATTCCGAGTGAATCAACGATG	Genotipado
pPXY	TCTGCATGCGTATACATTCCA	Genotipado
pWOX4	AGTGCTCCATGCAGACATGA	Genotipado
pSMXL5	AATGAGATCAAAACCCCTTCG	Genotipado
pNST3	AATAACAATTTCCCTTTTGG	Genotipado
pACL5	CGGTCTCGCCTTATGGGTGAAGCCGTAGAG	Genotipado
pAPL	CGTATAGTGGCTTTTACACACATTTT	Genotipado
pATHB8	TCTGCATGCGTATACATTCCA	Genotipado
pSUC2	AGAATCGAACGTCCATATCAGT	Genotipado
CFP	GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	Genotipado
YFP	CTTCAGCTCGATGCGGTTAC	Genotipado
GFP	GGGTAGCGGCTGAAGCACTG	Genotipado
WOX4	TGGTGGAGAAGGAGGAGT	qRT-PCR
WOX4	TCATGACTTCATCTCCCTTCAGGA	qRT-PCR
GA20ox	AAGGAGACGCTGTCGTTCCGCTACAC	qRT-PCR
GA20ox	GGATGGTGAGCGACGTGGGGTCGCAATG	qRT-PCR
PXY	CCGGTTCGTACGGTTACATT	qRT-PCR
PXY	ACGACCTACCCATGCTTTTG	qRT-PCR
ACT	GTAAGTGAATGGTAAAGGCTGGAT	qRT-PCR
ACT	CATGATGTCTAGGTCGACCAACA	qRT-PCR

Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados para los genotipados y la realización de qRT-PCRs

Recogida de hipocótilos para la realización de cortes en parafina

Las plantas crecidas en tierra fueron extraídas una vez alcanzado el tamaño y estadio deseado. Se extrajeron los hipocótilos de 5 plantas por cada individuo. La extracción de los hipocótilos se realizó de forma manual mediante el uso de un bisturí. Los hipocótilos fueron almacenados en etanol 70% a 4°C hasta su posterior manipulación.

Los hipocótilos recogidos fueron pretratados con FAE (50% etanol, 5% ácido acético glacial, 3,7% formaldehído y 31,3% agua destilada) durante 4 horas en vacío, se trataron con etanol al 70% durante 1 hora seguido por un tratamiento de etanol al 90% durante 2 horas cambiando el etanol utilizado al cabo de una hora, se trataron con etanol al 95% con eosina durante una hora, después con etanol al 95% durante 1 hora y después con etanol absoluto durante 1 hora. Seguidamente, se realizaron tres tratamientos con histoclear durante 1 hora y se pasó a sumergir las muestras en parafina durante 1 hora en vacío y finalmente se sumergieron los hipocótilos otra vez en parafina durante 3 horas en vacío.

Los hipocótilos se dispusieron verticalmente para permitir la realización cortes de secciones transversales de las muestras. Una vez orientados, se montaron los bloques de parafina para corte en el microtomo.

Se obtuvieron entre 10 y 20 cortes de un grosor de 10 μm por cada muestra. Los cortes se coloraron en un portaobjetos y se dejaron reposar durante 2 horas en una placa calefactora a 40°C para su fijación.

Eliminación de la parafina

Las muestras fijadas fueron posteriormente tratadas con histoclear durante 10 minutos para eliminar los restos de parafina. Se realizaron lavados posteriores de 10 minutos cada uno con etanol 90%, 70%, 50%, 30% y finalmente agua miliQ para la eliminación del histoclear.

Tinción de las muestras con azul de toluidina

Se preparó una disolución de azul de toluidina al 0,02% (Pradhan Mitra & Loqué, 2014) y se colocaron las muestras en dicha solución durante 2 minutos. Una vez teñidas, las muestras fueron lavadas con agua miliQ y posteriormente por etanol absoluto para eliminar los restos de azul de toluidina.

Montaje de las muestras

Una vez secos los portaobjetos, se colocaron 5 gotas de Mercko-Glass y el cubreobjetos. Se dejaron solidificar durante 1 hora para permitir el endurecimiento del Mercko-Glass. Este procedimiento permite la conservación de muestras a largo plazo.

Visualización de las muestras

Los portaobjetos conteniendo las muestras a analizar fueron llevados al microscopio (Leica DVM5000 HD) para su visualización y se realizaron varias capturas de cada muestra para poder realizar una comparación de resultados.

Recogida del material vegetal para la extracción de ARN

Se recogieron hipocótilos de plantas *d14*, así como de plantas silvestres del ecotipo col-0, de 5, de 10 y de 15 centímetros. Se recogieron 10 hipocótilos de cada planta seccionando manualmente las plantas mediante el uso de una cuchilla. Inmediatamente, las muestras recién cortadas fueron almacenadas en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN (Bustin, 2002; Fleige & Pfaffl, 2006). Posteriormente, las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior manipulación.

Extracción de RNA

Las muestras de hipocótilos almacenadas a -80°C fueron trituradas mediante el uso de un mortero adaptado para trabajar en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de muestra triturada. Las muestras trituradas fueron procesadas mediante el uso del kit NucleoSpin RNA plant (Macherey-Nagel) siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante para la extracción y purificación de ARN.

Cuantificación del RNA extraído

La concentración del RNA extraído se cuantificó con la ayuda de un nanodrop (NanoDrop ND-1000). Para ello, se pipeteó 1 μL de cada muestra por individual en el detector. El uso del equipo queda explicado en las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Análisis de la calidad de las muestras con Bioanalyzer

Para el análisis de calidad de las muestras de RNA extraídas, estas fueron llevadas a un servicio del IBMCP para el análisis de calidad de las muestras (Bioanalyzer 2100 de Agilent). Se proporcionaron 2 μL por cada muestra a analizar al servicio de análisis. El uso del equipo utilizado para el análisis de las muestras queda descrito en el protocolo proporcionado por el fabricante.

Obtención de cDNA

Para la obtención de cDNA a partir de RNA, se utilizó el kit PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (Takara). Los pasos a seguir se realizaron conforme al protocolo del fabricante.

Realización de la qRT-PCR

Se realizó un experimento de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para los genes mencionados, utilizando los cebadores presentes en la tabla 1. El procedimiento a seguir queda explicado en el protocolo del fabricante.

Los resultados fueron analizados mediante el uso del software 7500 Fast Software v2.0.6 (ThermoFisher) y herramientas de Microsoft Excel.

Cruces genéticos

Los cruces genéticos se realizaron manualmente. Para ello, se recogió polen de uno de los parentales escogidos con el cual se polinizó al otro parental. Las líneas marcadoras utilizadas para la realización de los cruces se muestran en la tabla 2.

Marcador	Fondo genético
pSUC2::GFP	Col-O
pWOX4::YFP	Col-O
pNST3::CFP	Col-O
pAPL::CFP	Col-O
pPXY::YFP	Col-O
pSMXL::CFP	Col-O
pJ121::GFP	Col-O
pATHB8::GUS	Col-O

Tabla 2: Líneas marcadoras utilizadas para los diversos cruces genéticos realizados.

Las diferentes líneas utilizadas fueron cruzadas con *d14-1* para la introgresión de la mutación. Las semillas provenientes de los cruces realizados fueron cultivadas y autopolonizadas para la obtención de plantas homocigotas tanto para el marcador como para la mutación *d14-1*. Las líneas obtenidas se muestran en la tabla 3.

Marcador	Fondo genético
pSUC2::GFP	<i>d14-1</i>
pWOX4::YFP	<i>d14-1</i>
pNST3::CFP	<i>d14-1</i>
pAPL::CFP	<i>d14-1</i>
pPXY::YFP	<i>d14-1</i>
pSMXL::CFP	<i>d14-1</i>
pJ121::GFP	<i>d14-1</i>
pATHB8::GUS	<i>d14-1</i>

Tabla 3: Cruces genéticos obtenidos mediante cruzamientos.

No todos los cruces realizados han sido mostrados en este trabajo.

Obtención de hipocótilos para cortes en fresco para la visualización al microscopio confocal

Se cultivaron plantas hasta alcanzar 15cm de altura. Se extrajeron sus respectivos hipocótilos manualmente con ayuda de una cuchilla. Se realizaron cortes transversales de los mismos para obtener secciones de 1mm de grosor. Las secciones se sumergieron en una solución de yoduro de etidio diluido en agua al 0'001%. Se colocaron en portaobjetos y se observaron directamente en el microscopio confocal (Confocal Zeiss 780).

Obtención de hipocotilos para tratamiento con Clearsee

Los hipocótilos fueron extraídos de las plantas mediante el uso de una cuchilla afilada. Una vez extraídos, se procedió a la realización de cortes transversales a mano de un grosor aproximado de 2mm. Inmediatamente, los cortes realizados fueron transferidos a tubos eppendorf. Se inoculó 1mL de solución conteniendo paraformaldehído al 4% disuelto en PBS 1x. Las muestras fueron almacenadas a 4°C en oscuridad. Posteriormente las muestras se procesaron siguiendo el protocolo de Kurihara et al., (2015).

Ensayos GUS

Los ensayos GUS se realizaron siguiendo el protocolo de Jefferson R (1987).

Diseño de construcciones de plásmidos

Los plásmidos generados fueron diseñados mediante la estrategia GoldenBraid (Sarrion-Pedrigones., et al 2013), con la ayuda de las herramientas informáticas de Benchling (<https://www.benchling.com/life-sciences-cloud/>). Los oligonucleótidos utilizados para la domesticación de los insertos se muestran en la tabla 1.

Electroporación de las cepas bacterianas

Se utilizaron bacterias electrocompetentes para la introgresión de los diferentes plásmidos generados. Las cepas de *Escherichia Coli* (*E.Coli*) utilizada fue la TOP10. La cepa de *Agrobacterium Tumefaciens* (*A.tumefaciens*) utilizada fue la C58. Se introdujeron 100mL de la cepa de bacteria utilizada en cubetas de electroforesis con 2uL de plásmido. Posteriormente se introdujeron en el electroporador y se les dio un pulso de 14400V en el caso de *A.thumefaciens* y 15000V en el caso de *E.Coli*.

Inmediatamente se incorporaron 300µl de medio de crecimiento a las bacterias electroporadas y se mantuvieron a 37°C durante dos horas antes de su crecimiento en placa. Las placas con medio de crecimiento contienen el medio de selección correspondiente para cada tipo de plásmido utilizado.

Extracción de plásmidos

Las colonias deseadas fueron seleccionadas de las placas de cultivo crecidas el día anterior. Con ayuda de un asa de siembra se picaron las colonias y se crecieron en tubos de cultivo de 10mL en medio de cultivo líquido LB (Sezonov et al., 2007) y se dejaron crecer 24 horas a 37°C.

Para la extracción de plásmidos se utilizó el kit de extracción de plásmidos (EZNA Plasmid Mini Kit I). El procedimiento a seguir queda detallado en el protocolo del fabricante.

Cuantificación de la cantidad de plásmido extraído

La concentración del RNA extraído se cuantificó con la ayuda de un nanodrop (NanoDrop ND-1000). Para ello, se pipeteó 1µL de cada muestra por individual en el detector. El uso del equipo queda explicado en las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Transformación de *A.thaliana*

La transformación de las plantas de *A.thaliana* se realizó siguiendo el protocolo de inmersión floral (Clough SJ and Bent AF, 1998). Se incubaron 50mL de cepa de *A.thumefaciens* conteniendo la construcción deseada a 28°C durante dos días en tubos falcon. Los tubos se centrifugaron con a 15000rpm durante 30min. Se descartó el sobrenadante. Se preparó una solución acuosa al 5% de sucrosa y Silwet L-77 a 500 µl por cada 500mL de medio. El precipitado de los tubos falcon conteniendo la cepa de *A.thumefaciens* concentrada se disolvió en 500mL de solución de sucrosa con Silwet obteniéndose así la solución de infiltración.

La solución de infiltración se utilizó para transformar mediante inmersión de la parte aérea de la planta de plantas en floración. Para ello, se sumergieron individualmente las plantas en la solución durante 15 segundos.

Tratamiento de plantas en tierra con giberelinas y paclobutrazol

El tratamiento de plantas con giberelinas (GA3) y paclobutrazol fue realizado en tierra. Se sembraron semillas de *A.thaliana* en tierra y se regaron inicialmente con solución nutritiva hasta la germinación de las mismas.

Se prepararon los stocks de GA3 y paclobutrazol diluyendo 0'01g de GA3 en 10mL etanol absoluto y 0'001g de paclobutrazol en 10mL de acetona. Para el riego, se vertió 1mL de stock de GA3 o paclobutrazol por cada litro de agua de riego utilizada. Las plantas se regaron dos veces por semana con la solución de paclobutrazol o GA3 hasta alcanzar la etapa adulta.

Tratamiento bioinformático de las muestras analizadas por RNA-seq

Los datos en crudo enviados por la compañía BGI fueron inicialmente procesados con la herramienta 'cutadapt' para eliminar los adaptadores de cada lectura. Posteriormente se realizó el mapeo sobre el genoma de *A.thaliana* con la herramienta 'hisat2'. Tras el mapeo, se realizó el conteo de lecturas mediante la herramienta 'htseq-count'. Seguidamente se realizó el análisis de expresión diferencial con DESeq2.

Tras el análisis de expresión diferencial se realizaron dos análisis diferentes de las muestras. Por una parte, se realizó un heatmap mediante el programa Excel. Por otra parte, se realizaron diagramas de Venn separando genes inducidos y reprimidos en la muestra mutante en comparación con la silvestre.

Los genes seleccionados cumplen los requisitos de tener un valor de Log2FoldChange superior a 1 o inferior a -1 así como un pValue ajustado inferior a 0'05.

Los enriquecimientos de términos GO fueron realizados con la ayuda de las herramientas informáticas de AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>).

REFERENCIAS

- Agusti, J., Herold, S., Schwarz, M., Sanchez, P., Ljung, K., Dun, E. A., ... Greb, T. (2011). Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20242–20247. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111902108> (A)
- Agusti, J., Lichtenberger, R., Schwarz, M., Nehlin, L., & Greb, T. (2011). Characterization of Transcriptome Remodeling during Cambium Formation Identifies MOL1 and RUL1 As Opposing Regulators of Secondary Growth. *Plos Genetics*, 7(2), e1001312. doi: 10.1371/journal.pgen.1001312 (B)
- Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., & Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043), 824–827. <https://doi.org/10.1038/nature03608>
- Alabdallah, O., Ahou, A., Mancuso, N., Pompili, V., Macone, A., Pashkoulov, D., ... Tavladoraki, P. (2017). The Arabidopsis polyamine oxidase/dehydrogenase 5 interferes with cytokinin and auxin signaling pathways to control xylem differentiation. *Journal of Experimental Botany*, 68(5), 997–1012. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw510>
- Alder, A., Jamil, M., Marzorati, M., Bruno, M., Vermathen, M., Bigler, P., ... Al-Babili, S. (2012). The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335(6074), 1348–1351. <https://doi.org/10.1126/science.1218094>
- Altamura, M. M., Possenti, M., Matteucci, A., Baima, S., Ruberti, I., & Morelli, G. (2001). Development of the vascular system in the inflorescence stem of Arabidopsis. *New Phytologist*, 151(2), 381–389. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00188.x>
- Arite, T., Umehara, M., Ishikawa, S., Hanada, A., Maekawa, M., Yamaguchi, S., & Kyojuka, J. (2009). D14, a strigolactone-insensitive mutant of rice, shows an accelerated outgrowth of tillers. *Plant and Cell Physiology*, 50(8), 1416–1424. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp091>
- Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., ... Helariutta, Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, 21(11), 917–926. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.017>
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., ... Leyser, O. (2005). MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell*, 8(3), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.009>
- Brewer, P. B., Koltai, H., & Beveridge, C. A. (2013). Diverse roles of strigolactones in plant development. *Molecular Plant*, 6(1), 18–28. <https://doi.org/10.1093/mp/sss130>
- Bustin, S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time PCR: Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29(1), 23–39. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>
- Cardoso, C., Ruyter-Spira, C., & Bouwmeester, H. J. (2011). Strigolactones and root infestation by plant-parasitic *Striga*, *Orobanche* and *Phelipanche* spp. *Plant Science*, 180(3), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.007>
- Challis, R. J., Hepworth, J., Mouchel, C., Waites, R., & Leyser, O. (2013). A Role for MORE AXILLARY GROWTH1 (MAX1) in Evolutionary Diversity in Strigolactone Signaling Upstream of MAX2. *Plant Physiology*, 161(4), 1885–1902. <https://doi.org/10.1104/pp.112.211383>
- Chaffey, N., Cholewa, E., Regan, S., & Sundberg, B. (2002). Secondary xylem development in Arabidopsis: a model for wood formation. *Physiologia Plantarum*, 114(4), 594–600. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1140413.x

Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., & Vega, V. et al. (2008). Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 133(6), 1106–1117. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.043

Chen, J., Zhang, L., Zhu, M., Han, L., Lv, Y., Liu, Y., Li, P., Jing, H., & Cai, H. (2018). Non-dormant Axillary Bud 1 regulates axillary bud outgrowth in sorghum. *Journal of Integrative Plant Biology* 12(1). doi: 10.1111/jipb.12665

Chevalier, F., Nieminen, K., Sanchez-Ferrero, J. C., Rodriguez, M. L., Chagoyen, M., Hardtke, C. S., & Cubas, P. (2014). Strigolactone Promotes Degradation of DWARF14, an α -Glucosyltransferase Essential for Strigolactone Signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(3), 1134–1150. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.122903>

Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C. P., Gregory, B.D., ...Feirmann, K.A. (1999). The Arabidopsis *dwf7/ste1* Mutant Is Defective in the Delta7 Sterol C-5 Desaturation Step Leading to Brassinosteroid Biosynthesis. *The Plant Cell Online*, 11(2), 207–222. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.2.207>

Crawford, S., Shinohara, N., Sieberer, T., Williamson, L., George, G., Hepworth, J., ... Leyser, O. (2010). Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*, 137(17), 2905–2913. <https://doi.org/10.1242/dev.051987>

Czarnecki, O., Yang, J., Wang, X., Wang, S., Muchero, W., Tuskan, G. A., & Chen, J. G. (2014). Characterization of MORE AXILLARY GROWTH genes in populus. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102757>

Dayan, J., Voronin, N., Gong, F., Sun, T., Hedden, P., Fromm, H., & Aloni, R. (2012). Leaf-Induced Gibberellin Signaling Is Essential for Internode Elongation, Cambial Activity, and Fiber Differentiation in Tobacco Stems. *The Plant Cell*, 24(1), 66–79. doi: 10.1105/tpc.111.093096

Demura, T., & Fukuda, H. (2007). Transcriptional regulation in wood formation. *Trends in Plant Science*, 12(2), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.12.006>

Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E., & Carlson, J. E. (1992). Characterization of vascular lignification in Arabidopsis thaliana. *Canadian Journal of Botany*, 70(11), 2238–2244. <https://doi.org/10.1139/b92-277>

Dolan, L., & Roberts, K. (1995). Secondary thickening in roots of Arabidopsis thaliana: anatomy and cell surface changes. *New Phytologist*, 131(1), 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03061.x>

Emery, J. F., Floyd, S. K., Alvarez, J., Eshed, Y., Hawker, N. P., Izhaki, A., ... Bowman, J. L. (2003).

Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes. *Current Biology*, 13(20), 1768–1774. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.09.035>

Etchells, J. P., Provost, C. M., Mishra, L., & Turner, S. R. (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*, 140(10), 2224–2234. <https://doi.org/10.1242/dev.091314>

Felipo-Benavent, A., Úrbez, C., Blanco-Touriñán, N., Serrano-Mislata, A., Baumberger, N., & Achard, P. et al. (2018). Regulation of xylem fiber differentiation by gibberellins through DELLA-KNAT1 interaction. *Development*, 145(23), dev164962. doi: 10.1242/dev.164962

Fisher, K., & Turner, S. (2007). PXY, a Receptor-like Kinase Essential for Maintaining Polarity during Plant Vascular-Tissue Development. *Current Biology*, 17(12), 1061–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.049>

Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>

Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., ... Rochange, S. F. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210), 189–194. <https://doi.org/10.1038/nature07271>

Hamiaux, C., Drummond, R. S. M., Janssen, B. J., Ledger, S. E., Cooney, J. M., Newcomb, R. D., & Snowden, K. C. (2012). DAD2 is an α/β hydrolase likely to be involved in the perception of the plant branching hormone, strigolactone. *Current Biology*, 22(21), 2032–2036. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.007>

Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A. J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., ... Komeda, Y. (2000). ACAULIS5, an Arabidopsis gene required for stem elongation, encodes a spermine synthase. *EMBO Journal*, 19(16), 4248–4256. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4248>

Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C., & Leyser, O. (2009). Interactions between Auxin and Strigolactone in Shoot Branching Control. *Plant Physiology*, 151(1), 400–412. <https://doi.org/10.1104/pp.109.137646>

Hauch, S., & Magel, E. (1998). Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. *Planta*, 207(2), 266–274. doi: 10.1007/s004250050482

Hollis, C., & Tepper, H. (1971). Auxin Transport within Intact Dormant and Active White Ash Shoots. *Plant Physiology*, 48(2), 146–149. doi: 10.1104/pp.48.2.146

Itoh, J., Hibara, K., Sato, Y., & Nagato, Y. (2008). Developmental Role and Auxin Responsiveness of Class III Homeodomain Leucine Zipper Gene Family Members in Rice. *Plant Physiology*, 147(4), 1960–1975. doi: 10.1104/pp.108.118679

Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., & Scanlon, M. J. (2010). WOX4 Promotes Procambial Development. *Plant Physiology*, 152(3), 1346–1356. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149641>

Kapulnik, Y., Delaux, P. M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Winer, S., Bhattacharya, C., ... Koltai, H. (2011a). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta*, 233(1), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1310-y>

Kapulnik, Y., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Kaplan, Y., Winer, S., Hershenhorn, J., & Koltai, H. (2011b). Strigolactones interact with ethylene and auxin in regulating root-hair elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 62(8), 2915–2924. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq464>

Kim, I., Cho, E., Crawford, K., Hempel, F., & Zambryski, P. (2005). Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in Arabidopsis. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(6), 2227–2231. doi: 10.1073/pnas.0409193102

Knott, J. M., Römer, P., & Sumper, M. (2007). Putative spermine synthases from *Thalassiosira pseudonana* and *Arabidopsis thaliana* synthesize thermospermine rather than spermine. *FEBS Letters*, 581(16), 3081–3086. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.074>

Kondo, Y., Hirakawa, Y., Kieber, J. J., & Fukuda, H. (2011). CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. *Plant and Cell Physiology*, 52(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq129>

- Kubo, M., Udagawa, M., Nishikubo, N., Horiguchi, G., Yamaguchi, M., Ito, J., ... Demura, T. (2005). Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes and Development*, 19(16), 1855–1860. <https://doi.org/10.1101/gad.1331305>
- Laplaze, L., Parizot, B., Baker, A., Ricaud, L., Martinière, A., Auguy, F., ... Haseloff, J. (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, Volume 56(419), 2433–2442. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri236>
- Lucas, W. J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S. R., Helariutta, Y., ... Kachroo, P. (2013). The Plant Vascular System: Evolution, Development and Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(4), 294–388. <https://doi.org/10.1111/jipb.12041>
- Marzec, M. (2016). Perception and Signaling of Strigolactones. *Frontiers in Plant Science*, 7(August), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01260>
- Marzec, M. (2017). Strigolactones and Gibberellins: A New Couple in the Phytohormone World? *Trends in Plant Science*, 22(10), 813–815. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.001>
- McConnell, J. R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., & Barton, M. K. (2001). Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots. *Nature*, 411(6838), 709–713. <https://doi.org/10.1038/35079635>
- Mitsuda, N., Iwase, A., Yamamoto, H., Yoshida, M., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2007). NAC Transcription Factors, NST1 and NST3, Are Key Regulators of the Formation of Secondary Walls in Woody Tissues of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 19(1), 270–280. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047043>
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Plant Physiology*, 89–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>
- Muniz, L., Minguet, E. G., Singh, S. K., Pesquet, E., Vera-Sirera, F., Moreau-Courtois, C. L., ... Tuominen, H. (2008). ACAULIS5 controls *Arabidopsis* xylem specification through the prevention of premature cell death. *Development*, 135(15), 2573–2582. <https://doi.org/10.1242/dev.019349>
- Nelson, D. C., Flematti, G. R., Riseborough, J.-A., Ghisalberti, E. L., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2010). Karrikins enhance light responses during germination and seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 7095–7100. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911635107>
- Nelson, D. C., Scaffidi, A., Dun, E. A., Waters, M. T., Flematti, G. R., Dixon, K. W., ... Smith, S. M. (2011). F-box protein MAX2 has dual roles in karrikin and strigolactone signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8897–8902. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100987108>
- Parsa, S., Ortiz, V., Gómez-Jiménez, M. I., Kramer, M., & Vega, F. E. (2018). Root environment is a key determinant of fungal entomopathogen endophytism following seed treatment in the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biological Control*, 116, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.001>
- Pradhan Mitra, P., & Loqué, D. (2014). Histochemical Staining of *Arabidopsis thaliana* Secondary Cell Wall Elements. *Journal of Visualized Experiments*, (87), 1–11. <https://doi.org/10.3791/51381>
- Rasmussen, A., Mason, M. G., De Cuyper, C., Brewer, P. B., Herold, S., Agusti, J., ... Beveridge, C.A. (2012). Strigolactones Suppress Adventitious Rooting in *Arabidopsis* and *Pea*. *Plant Physiology*, 158(4), 1976–1987. <https://doi.org/10.1104/pp.111.187104>

Ragni, L., Nieminen, K., Pacheco-Villalobos, D., Sibout, R., Schwechheimer, C., & Hardtke, C. (2011). Mobile Gibberellin Directly Stimulates Arabidopsis Hypocotyl Xylem Expansion. *The Plant Cell*, 23(4), 1322-1336. doi: 10.1105/tpc.111.084020

Sachs, T. (1991). Cell polarity and tissue patterning in plants. *Development*, 113(Supplement 1), 83-93.

Scheres, B., Dilaurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M. T., Janmaat, K., Weisbeek, P., & Benfey, P. N. (1995). Mutations affecting the radial organisation of the Arabidopsis root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development*, 121(1), 53-62. <https://doi.org/10.1101/gad.1426606.rates>

Shen, H., Luong, P., & Huq, E. (2007). The F-Box Protein MAX2 Functions as a Positive Regulator of Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 145(4), 1471-1483. <https://doi.org/10.1104/pp.107.107227>

Simona Baima, Marco Possenti, Antonella Matteucci, Ellen Wisman, Maria Maddalena Altamura, Ida Ruberti, and G. M. (2001). The Arabidopsis ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems. *Plant Physiology*, 126(2), 643-655. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.643>

Soundappan, I., Bennett, T., Morffy, N., Liang, Y., Stanga, J. P., Abbas, A., ... Nelson, D. C. (2015). SMAX1-LIKE/D53 Family Members Enable Distinct MAX2-Dependent Responses to Strigolactones and Karrikins in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 27(11), 3143-3159. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00562>

Stirnberg, P., van De Sande, K., & Leyser, H. M. O. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in Arabidopsis. *Development (Cambridge, England)*, 129(5), 1131-1141. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.8.1779>

Sung, S., & Amasino, R. M. (2005). REMEMBERING WINTER: Toward a Molecular Understanding of Vernalization. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 491-508. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144307>

Turnbull, C. G. N., Booker, J. P., & Leyser, H. M. O. (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in Arabidopsis. *Plant Journal*, 32(2), 255-262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01419.x>

Ueda, H., & Kusaba, M. (2015). Strigolactone Regulates Leaf Senescence in Concert with Ethylene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 169(1), 138-147. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00325>

Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., ... Yamaguchi, S. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195-200. <https://doi.org/10.1038/nature07272>

Vanneste, S., & Friml, J. (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell*, 136(6), 1005-1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>

Wallner, E. S., López-Salmerón, V., & Greb, T. (2016). Strigolactone versus gibberellin signaling: reemerging concepts? *Planta*, 243(6), 1339-1350. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2478-6>

Waters, M. T., Brewer, P. B., Bussell, J. D., Smith, S. M., & Beveridge, C. A. (2012a). The Arabidopsis Ortholog of Rice DWARF27 Acts Upstream of MAX1 in the Control of Plant Development by Strigolactones. *Plant Physiology*, 159(3), 1073-1085. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196253>

Waters, M. T., Nelson, D. C., Scaffidi, A., Flematti, G. R., Sun, Y. K., Dixon, K. W., & Smith, S. M. (2012b). Specialisation within the DWARF14 protein family confers distinct responses to karrikins and strigolactones in Arabidopsis. *Development*, 139(7), 1285-1295. <https://doi.org/10.1242/dev.074567>

Waters, M. T., Scaffidi, A., Sun, Y. K., Flematti, G. R., & Smith, S. M. (2014). The karrikin response system of Arabidopsis. *Plant Journal*, 79(4), 623-631. <https://doi.org/10.1111/tpj.12430>

Woo, H. R. (2001). ORE9, an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*, 13(8), 1779–1790. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.8.1779>

Yamaguchi, M., Goue, N., Igarashi, H., Ohtani, M., Nakano, Y., Mortimer, J. C., ... Demura, T. (2010). VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System. *Plant Physiology*, 153(3), 906–914. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154013>

Vera-Sirera, F., De Rybel, B., Úrbez, C., Kouklas, E., Pesquera, M., & Álvarez-Mahecha, J. et al. (2015). A bHLH-Based Feedback Loop Restricts Vascular Cell Proliferation in Plants. *Developmental Cell*, 35(4), 432-443. doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.022

Ye, Z.-H., Freshour, G., Hahn, M. G., Burk, D. H., & Zhong, R. (2002). Vascular development in Arabidopsis. *International Review of Cytology*, 220, 225–238. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)20007-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)20007-8)

Zwanenburg, B., Pospíšil, T., & Čavar Zeljković, S. (2016). Strigolactones: new plant hormones in action. *Planta*, 243(6), 1311–1326. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2455-5>

Zhong, R., & Ye, Z. (2003). The SAC Domain-Containing Protein Gene Family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132(2), 544-555. doi: 10.1104/pp.103.021444

ANEXOS:

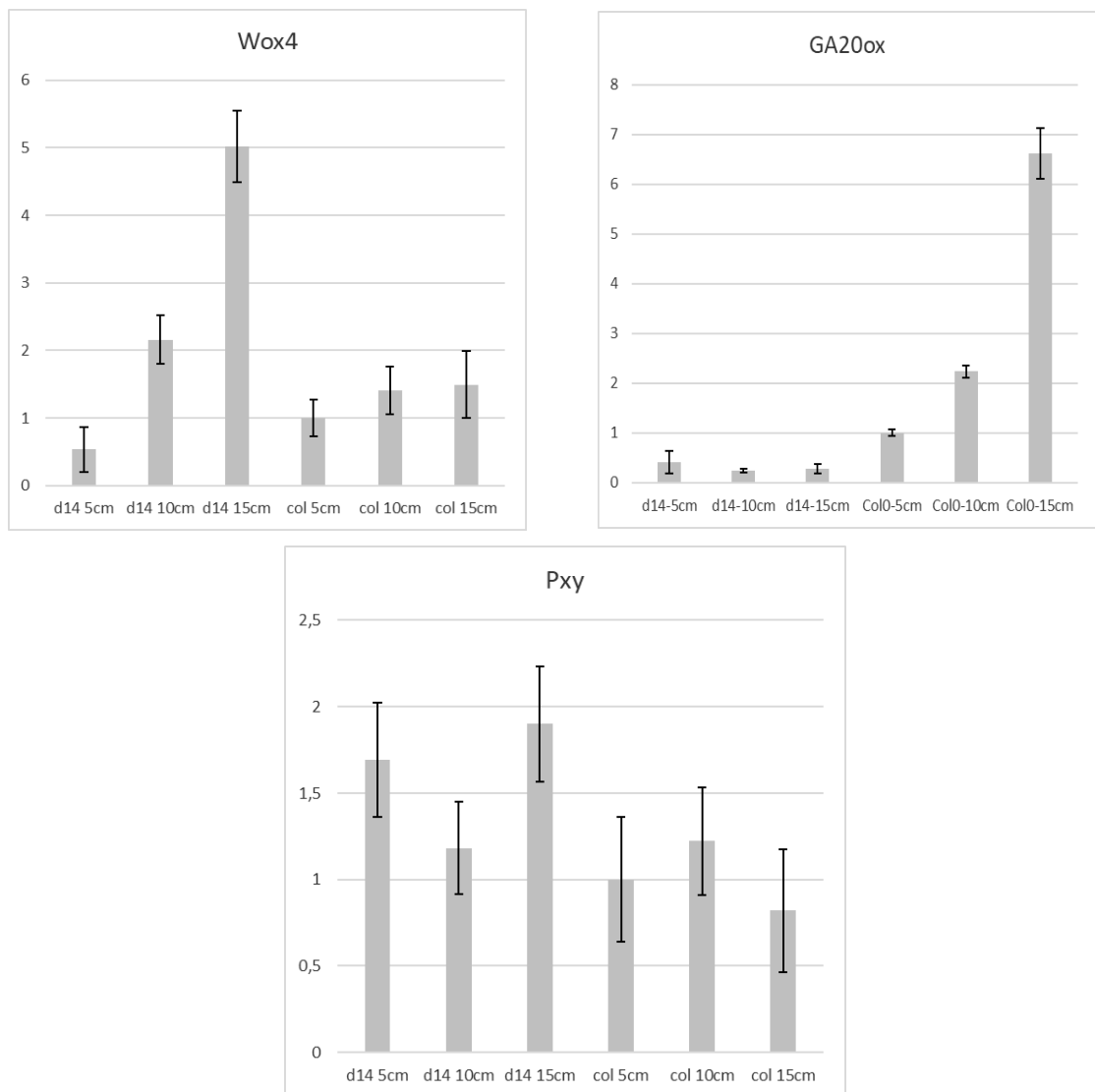


Figura 1: Resultados de las qRT-PCRs realizadas para la validación del RNA-seq