



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto del estrés osmótico y salino en el tiempo de
floración y la descendencia de *Arabidopsis thaliana*
(ecotipo Columbia): evaluación de la participación de
algunos genes MADS-box en estos procesos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RUBÉN AGUSTÍN CAMACHO RAMÍREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERENICE GARCÍA PONCE DE LEÓN**

Ciudad Universitaria Cd. Mx. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A los miembros de mi jurado:

A la Dra. Rosalinda Tapia López, A la Dra. Adriana Garay Arroyo, al Dr. Ulises Yunuén Rosas López y al Dr. Agustín de Jesús Quiróz Flores por sus comentarios que enriquecieron mi trabajo y mi visión de la biología.

A la Dra. Berenice García Ponce de León por su paciencia y consejos que dieron forma a mi tesis y a mi como científico.

A la Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán por su asesoría en la estadística que me ayudaron a entender lo importante de esta disciplina para la correcta interpretación de los datos.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla y a la Dra. María de la Paz Sánchez por sus comentarios y sugerencias.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas; Departamento de Ecología Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Berenice García Ponce de León.

La investigación realizada fue financiada por los proyectos PAPIIT de la DGAPA (UNAM): IN203214-3; IN203814 e IN211516 y de CONACyT: 240180 a cargo de las Doctoras Berenice García Ponce de León, Elena Alvarez-Buylla, María de la Paz Sánchez y Adriana Garay Arroyo a quienes les agradecemos su apoyo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres por no dejar que me rindiera, y a mis hermanos por soportar mi gusto por la biología.

A Alba Itzel Martínez Salazar por ayudarme a encontrar lo que me apasiona de la biología, por su compañía en todos estos años de estudio y principalmente por llenar de alegría cada momento de mi licenciatura.

A todos mis profesores de la licenciatura porque gracias a sus enseñanzas me hicieron aferrarme a la biología.

Índice

Resumen.....	8
Introducción.....	10
Las plantas y su entorno.....	10
Obtención del agua por las plantas.....	10
Respuesta de las plantas ante el estrés hídrico.....	13
Efectos del estrés hídrico en la productividad.....	15
El meristemo apical aéreo.....	16
Transición a la floración.....	18
Señalización por fotoperiodo de día largo.....	19
Vernalización y vía autónoma.....	21
Temperatura no óptima o termosensora.....	22
Madurez de la planta.....	22
Señalización por trehalosa.....	23
Giberelinas.....	23
Otros mecanismos de regulación de la floración.....	24
Los MADS-box y su papel en la transición a la floración.....	25
Antecedentes.....	26
Hipótesis.....	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares.....	30

Metodología.....	31
Material biológico, esterilización y condiciones de crecimiento.....	31
Crecimiento en hidroponia.....	31
Aplicación del estrés en hidroponia.....	32
Estrés salino.....	33
Estrés por sequía.....	33
Determinación del potencial hídrico.....	34
Análisis de bases de datos de microarreglos.....	35
Medición de la tasa de crecimiento de la parte aérea.....	35
Cuantificación de la floración.....	35
Cuantificación de la descendencia.....	36
Análisis estadístico.....	36
Análisis de expresión genética por RT-PCR.....	36
Resultados.....	36
Crecimiento en hidroponia como metodología para imponer estrés osmótico en <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Establecimiento de sistemas de crecimiento para analizar el efecto del estrés hídrico y salino en el tiempo de floración.....	42
Análisis de la expresión de genes conocidos que participan en la transición a la floración, en condiciones de estrés hídrico por medio de bases de datos de microarreglos.....	45
Efecto de la sequía en el tiempo de floración de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl19</i>	47
Efecto de la sequía en la descendencia de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl19</i>	51
Efecto de la sequía en el desarrollo vegetativo de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl19</i>	54
Efecto de la salinidad en el tiempo de floración de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl1</i>	56
Efecto de la salinidad en la descendencia de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl19</i>	58

Efecto de la salinidad en el desarrollo vegetativo de plantas silvestres, <i>xal1</i> y <i>agl19</i>	60
Discusión.....	62
Plasticidad del tiempo de floración en respuesta al estrés hídrico y salino.....	62
<i>AGL19</i> como regulador positivo de la transición a la floración en respuesta a sequía.....	65
El papel del tiempo de floración en la descendencia bajo condiciones de sequía y salinidad.....	66
El papel de <i>XAL1</i> en el desarrollo del fruto.....	68
El tiempo de floración de las plantas <i>agl19</i> mejora la producción de silicuas en sequía.....	70
Conclusiones.....	71
Perspectivas.....	71
Bibliografía.....	72

Resumen

La transición a la floración se define como el momento en que la planta pasa de una fase vegetativa a una reproductiva y se caracteriza porque el meristemo apical aéreo deja de producir hojas y se transforma en un meristemo de inflorescencia del cual se van a generar los meristemos que se diferencian finalmente en los órganos florales.

En *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado ampliamente la transición a la floración por medio de mutantes que muestran tiempos de floración alterados, al crecer las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. De esta forma, se han identificado “7 vías de floración” que corresponden: al fotoperiodo de día largo, la vernalización, temperatura no óptima, respuesta a giberelinas, una vía autónoma a señales exógenas y endógenas, la que responde al desarrollo por envejecimiento y la señalización por trehalosa.

Pese a que las plantas muestran una gran plasticidad al crecer en un ambiente con cambios constantes, existen alteraciones del medio que pueden llegar a disminuir su tasa de desarrollo o reproducción, a lo que se le conoce como estrés. Las formas en la que las plantas responden al estrés para asegurar su reproducción, se divide básicamente en dos: una es “afrentarlo” alargando el estado vegetativo al retrasar la transición a la floración, esperando mejores condiciones para su reproducción; o “evadiendo” el estrés al acelerar la floración para lograr la producción de semillas anticipada.

El estrés hídrico es uno de los principales causantes de pérdidas agronómicas, pero se conoce muy poco sobre los mecanismos que afectan el tiempo de floración, por lo que resulta necesario su estudio en plantas modelo como *Arabidopsis* en donde ya se conoce una amplia red genética que regula la transición a la floración.

En este trabajo se desarrollaron metodologías para establecer un sistema de crecimiento en el que las plantas de *Arabidopsis*, sometidas a estrés osmótico en un medio líquido, o estrés salino e hídrico en un medio sólido, alcanzaran su etapa reproductiva y se pudieran estudiar los posibles cambios en el tiempo de floración y la producción de semillas. Así mismo, se evaluó el papel de algunos genes MADS-box que participan en la transición a la floración, en la respuesta a estos tipos de estrés.

Los resultados de este trabajo muestran que la sequía y la salinidad alargaron el tiempo de transición a la floración en las plantas silvestres, pero sin la concomitante generación de hojas. Esto podría indicar que las plantas “afrontaron” el estrés. Sin embargo, también hubo una reducción drástica en la cantidad y tamaño de las silicuas.

AGL19 induce la floración bajo estrés hídrico, pero reprime la producción de silicuas en este tipo de estrés. Por otra parte, *XALI* no parece participar en la regulación del tiempo de floración en respuesta al estrés, aunque podría tener un papel como represor en la producción de silicuas, ya que se observó un aumento en su número al crecer el mutante en salinidad. Por lo tanto, podemos decir que el aplazamiento de la floración bajo las condiciones de estrés hídrico o salino utilizadas, no confiere una ventaja en la producción de silicuas en *Arabidopsis*, sin embargo, no se descarta un posible efecto positivo en la viabilidad de las semillas de subsecuentes generaciones.

Introducción

Las plantas y su entorno

La plasticidad en los organismos les permite crecer en un ambiente (o nicho) sujeto a una gran variedad de factores bióticos y abióticos. El éxito reproductivo, o adecuación, será directamente proporcional a la capacidad que los organismos tengan de modificar su desarrollo de acuerdo a las variaciones en el ambiente, sin embargo, cuando se da un cambio brusco de uno o varios de estos factores que repercuten en el desarrollo del organismo, se le conoce como estrés (Cain *et al.*, 2011). La intensidad y duración de este, afectan directamente el ciclo de vida del organismo (Franks, 2011; Versules y Juenger, 2011; Riboni *et al.*, 2013).

Las plantas, al ser organismos sésiles, responden de manera plástica por lo que han adquirido adaptaciones fisiológicas y de desarrollo para evitar el estrés o contender con él. Una de ellas, es acelerando o retrasando su etapa reproductiva (van der Weele *et al.*, 2000; Kreps *et al.*, 2002; Shinozaki y Kazuko, 2007; Hirt 2010; Franks, 2011; Versules y Jurger, 2011; Ji *et al.*, 2014).

Obtención del agua por las plantas

Una de las condiciones más limitantes para el desarrollo de un organismo es la disponibilidad de agua (Franks, 2011; Ji *et al.*, 2014). El estrés hídrico tiene un gran impacto en el desarrollo de las plantas, ya que sólo el 3% del agua que toman es utilizada para el crecimiento y el metabolismo, y el otro 97% de agua se pierde por evapotranspiración. Esto causa que un pequeño cambio en la cantidad de agua disponible se

traduzca en una alteración en el metabolismo y crecimiento de la planta (Taiz y Zeiger, 2010).

La disponibilidad del agua depende de sus propiedades intrínsecas y del medio en el que se encuentre; el movimiento de la misma se define por medio del potencial hídrico que se refiere a la energía libre que tienen las moléculas de agua. Las plantas absorben el agua del suelo y la transportan a la parte aérea, ya que hay una diferencia en el potencial hídrico entre estos dos ambientes, siendo el aire en donde el potencial hídrico es mucho más negativo, por lo tanto, el agua tiende a subir. Hay 4 componentes principales que definen el potencial hídrico: la gravedad, el potencial mátrico, la presión hidrostática y el potencial osmótico (Figura 1; Boyer y Kramer, 1995; Taiz y Zeiger, 2010).

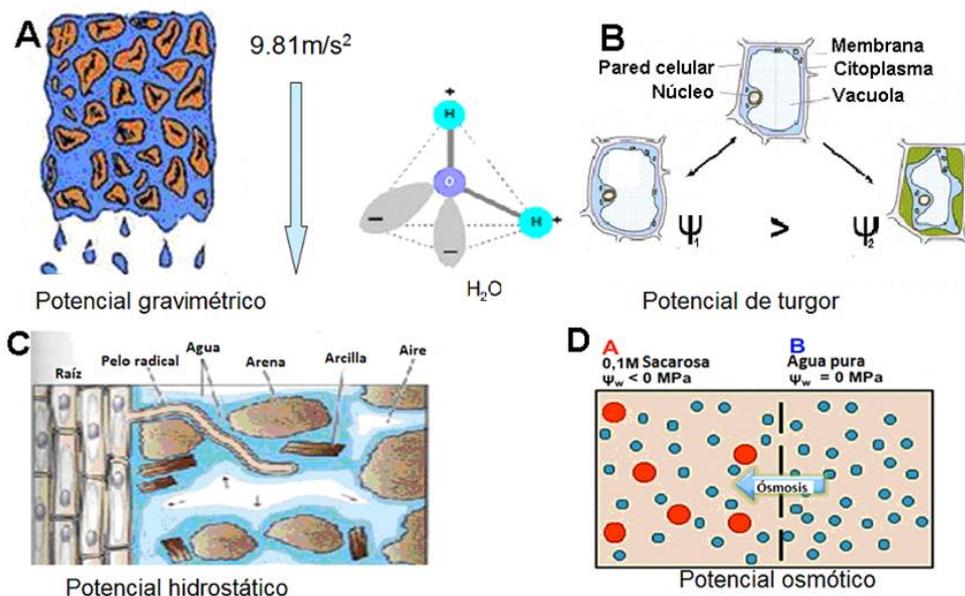


Figura 1: Componentes del potencial hídrico: A) La gravedad influye sobre la capacidad que tiene el agua para fluir de un medio a otro. B) Potencial de turgor generado por la pared celular. C) El potencial hidrostático del suelo también conocido como potencial mátrico, y D) El potencial osmótico dado por la concentración de osmolitos (Modificado de Taiz y Zeiger 2010).

La gravedad afecta al potencial hídrico impidiendo el movimiento ascendente del agua, sin embargo, ya que tiene un valor constante, no se toma en cuenta su participación en la medición del potencial hídrico (Boyer y Kramer, 1995; Taiz y Zeiger, 2010).

La presión hidrostática puede afectar positiva o negativamente al potencial hídrico. El origen de la presión hidrostática negativa en las plantas se debe a la fuerza ténsil que se crea en el xilema y al turgor por la rigidez de la pared celular. Esta presión hidrostática negativa también existe en el suelo y en las células del mesófilo a lo que se le denomina potencial mátrico, el cual es causado por la fuerza ténsil que se crea en la interfase de agua / aire, por lo que mientras menos agua exista en el sustrato o en las hojas esta se unirá con más fuerza para reducir su superficie de contacto con el aire (Boyer y Kramer, 1995; Taiz y Zeiger, 2010).

El último factor que afecta el potencial hídrico es el potencial osmótico. En este caso, los solutos ocupan el espacio de las moléculas de agua, disminuyendo la cantidad de agua en la disolución y por lo tanto su potencial hídrico.

La intensidad en la que los solutos afecten el potencial hídrico depende de sus características intrínsecas, su concentración y la temperatura, su valor se puede obtener con la fórmula: $\Psi_s = -RTC_s$ en donde R es la constante de los gases ($8.32 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$); T es la temperatura de la solución en grados Kelvin y C_s es la concentración del soluto. Así el potencial hídrico disminuirá, si aumenta la concentración del soluto osmóticamente activo indicado por el signo negativo en la ecuación (Money, 1989; Boyer y Kramer, 1995).

En suma, todos estos componentes darán un valor definido al potencial hídrico del suelo o de la planta, por lo que el agua fluirá de la región con mayor potencial hídrico a la

región donde exista un menor potencial hídrico. Para que la raíz pueda tomar el agua, las plantas han adquirido mecanismos para regular el potencial osmótico y la presión hidrostática disminuyendo así su potencial hídrico con respecto al del suelo (Boyer y Kramer, 1995; Taiz y Zeiger, 2010).

Respuesta de las plantas ante el estrés hídrico o salino

La estacionalidad en las diferentes regiones del mundo causa periodos definidos de lluvias y sequía. La intensidad del estrés hídrico causado por la temporada de sequía depende de la disponibilidad del agua existente en el suelo con base en las características físico-químicas del mismo (Boyer y Kramer, 1995). La sequía causa diversas respuestas fisiológicas en la planta, como son: la acumulación de solutos que ayuda a reducir el potencial hídrico de las células de la raíz, un uso eficiente del agua mediante el cierre estomático, la reducción de la tasa fotosintética y la promoción de la respiración, todas para hacer frente a las condiciones estresantes (Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Hirt, 2010; Skirycs *et al.*, 2010; Versules y Juenger, 2011). Las vías de señalización que responden a este tipo de estrés se pueden dividir básicamente en dos: dependientes o independiente del ácido abscísico (ABA).

El ABA es una hormona vegetal que controla diversos procesos biológicos, entre los que destaca la respuesta al estrés hídrico. Durante la exposición a este tipo de estrés ocurre un aumento en la producción de ABA, la cual funciona como una señal a larga distancia, que se encarga de orquestar respuestas fisiológicas relacionadas con la conductancia y el cierre estomático (Bray 1997; Dodd y William, 2004; Shinozaki, y Yamaguchi-Shinozaki,

2007; Huang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Además, el ABA desencadena una cadena de transducción de señales que lleva a la activación de factores transcripcionales que se unen a los elementos reguladores de la transcripción como Abscisic Acid-Responsive Element (ABRE) y que modulan la expresión de genes ligados a la tolerancia del estrés como el gen *RESPONSIVE TO DESSICATION 29B (RD29B)* (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Huang *et al.*, 2012).

Adicionalmente a la respuesta mediada por ABA, se ha observado que ciertos genes que confieren resistencia al estrés hídrico se activan en mutantes de ABA, tal es el caso de los factores de transcripción *CRT/DRE BINDING FACTOR/DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1 (CBF/DREB1)* y *DREB2* que pertenecen a la familia ERF/AP2. Estos genes poseen elementos reguladores en su promotor como *DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT/C-REPEAT (DRE/CRT)*, los cuales se ha observado, responden a condiciones de estrés por frío, salinidad y sequía independientemente de la acumulación de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Seo *et al.*, 2009; Hirt, 2010; Huang *et al.*, 2012).

La producción de proteínas LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) y proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés Heat Shock Proteins), así como enzimas relacionadas con la síntesis de solutos osmóticamente activos como la prolina, poliaminas, manitol, trehalosa, etc. que disminuyen el potencial osmótico de la raíz, son algunas de las acciones que la planta emprende para afrontar el estrés hídrico independientemente de si la señalización es dependiente o no de ABA (Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Hirt, 2010; Skirycz *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012).

El estrés iónico puede causar un estrés osmótico (dependiendo de la concentración del soluto) y un estrés por los iones liberados. Específicamente, el estrés salino por NaCl causa un desbalance iónico en la rizósfera, afectando el intercambio de nutrientes entre el suelo y la planta (Hirt, 2010; Huang *et al.*, 2012). Las principales respuestas a un estrés salino están orientadas al almacenamiento de sales por medio de bombas vacuolares de Na^+/H^+ y la secreción de iones (Apse *et al.*, 1999; Hirt, 2010; Huang, *et al.*, 2012). Se ha identificado una vía de señalización que responde al estrés salino, que se conoce como Salt Overly Sensitive (SOS), en la cual participan 3 genes: *SOS1*, *SOS2* y *SOS3* (Hirt, 2010; Huang *et al.*, 2012). El gen *SOS3* codifica para un sensor de Ca^{2+} que a su vez activa a *SOS2* y este a su vez a *SOS1* que codifica para una bomba de Na^+/H^+ (Hirt, 2010; Huang *et al.*, 2012).

Efectos del estrés hídrico en la productividad

A pesar de los mecanismos que poseen las plantas para continuar con su desarrollo bajo condiciones de estrés hídrico, en muchos casos una consecuencia inminente es la reducción de la productividad agrícola, lo que pone en riesgo la seguridad alimentaria. El cambio climático modifica los patrones de precipitación, lo que causa que las temporadas de sequía sean más intensas (FAO 2015). Los estudios sobre el efecto del estrés osmótico o salino sobre la producción de semillas, se avocan principalmente a la productividad agrícola donde se ha observado que ocurre una disminución de la producción de biomasa (Araus *et al.*, 2002; Bray 1997; Chinnusamy *et al.*, 2005; Blum, 2009). Además, para que se puedan producir semillas, las plantas deben transitar de una etapa de crecimiento vegetativo a una etapa reproductiva, posterior a la cual, se llevará a cabo la polinización y la posterior

maduración del gineceo, el cual protegerá las semillas hasta su madurez. Esta etapa del desarrollo ha mostrado tener una gran plasticidad ante diversas condiciones de estrés osmótico o salino (Wada y Takeno, 2010; Sherrad Maheranli, 2006; Franks *et al.*, 2007; Franks, 2011; Ivey y Carr, 2012, Riboni *et al.*, 2013). Sin embargo, se conoce muy poco sobre la regulación molecular que liga la transición a la floración y la producción de semillas, con la señalización dada en respuesta al estrés hídrico.

El meristemo apical aéreo

A partir de 1979, *Arabidopsis thaliana* L. (Heiz) se ha utilizado como organismo modelo para estudios de floración. Esta planta, miembro de la familia Brassicaceae, posee cualidades muy atractivas que la hacen ser un gran modelo de estudio como son: su genoma relativamente pequeño, lo que ha permitido su secuenciación y la anotación de cada gen; su ciclo de vida corto, por lo que es posible realizar estudios de genética; su tamaño, que facilita su crecimiento en cuartos con condiciones controladas; su autopolinización, que garantiza la producción de progenie y maximiza el control sobre líneas mutantes y, finalmente, que se puede transformar fácilmente (Meyerowitz y Somerville, 1994).

En *Arabidopsis*, el meristemo apical aéreo (o shoot apical meristem: SAM) da origen a las hojas de la roseta durante el estado vegetativo y una vez que ha transitado al estado reproductivo, se produce la inflorescencia y los meristemos florales. El SAM está conformado por 3 linajes celulares bien definidos: la capa L1 que consiste de células con divisiones anticlinales que dan origen a la epidermis y la capa L2 que corresponde a células que se dividen periclinalmente y deriva en el mesófilo; estas dos capas en conjunto

conforman la túnica. Existe una tercera capa denominada L3 o corpus la cual tiene divisiones anticlinales y periclinales que da origen a los tejidos centrales de las hojas y tallos (Figura 2; Huala y Sussex 1993; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010).

De forma superpuesta a las capas L1, L2 y L3, el SAM está organizado en tres regiones citológicas con características definidas: la zona central (CZ), que contienen las células pluripotenciales, la zona periférica (PZ), donde comienza la diferenciación de los órganos laterales y la zona que está por debajo de la ZC (RZ) que provee de células pluripotenciales al tallo (Figura 2). Una vez que el meristemo transita al estado reproductivo los meristemas de flor (MF) se originan a partir de la zona periférica del meristemo de inflorescencia (MI) manteniendo las capas L1, L2 y L3 donde la L1 contribuye a la formación de la epidermis, el estigma, parte del tejido de transmisión y el integumento de los óvulos, mientras que la capa L2 es generalmente la fuente de células germinales, finalmente la capa L3 da origen a los tejidos más internos, como lo es el tejido vascular (Huala y Sussex 1993; Álvarez-Buylla *et al.*, 2010).

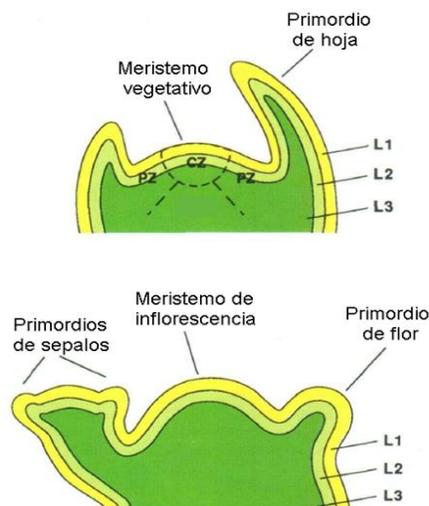


Figura 2: Estructura del meristemo apical aéreo. En la parte superior se muestra un meristemo vegetativo y en la parte inferior un meristemo de inflorescencia y meristemas de flor a sus lados en diferentes estadios de desarrollo. (Imagen modificada de Huala y Sussex, 1993).

El meristemo de flor tiene un crecimiento determinado que se diferencia en 4 verticilos: sépalos y pétalos que son estériles, así como el gineceo y el androceo fértiles, encargados de producir los gametos (Taiz y Zeiger, 2010; Mauseth, 2014). El gineceo o pistilo se compone de 3 partes principales: el estigma que recibe al polen, el estilo que conecta al estigma con el ovario y el ovario que desarrolla la megaspora. Por otro lado, el androceo o estambre se compone de: la antera donde se producen las microsporas o polen y el filamento que sostiene a la antera (Figura 3; Mauseth, 2014).

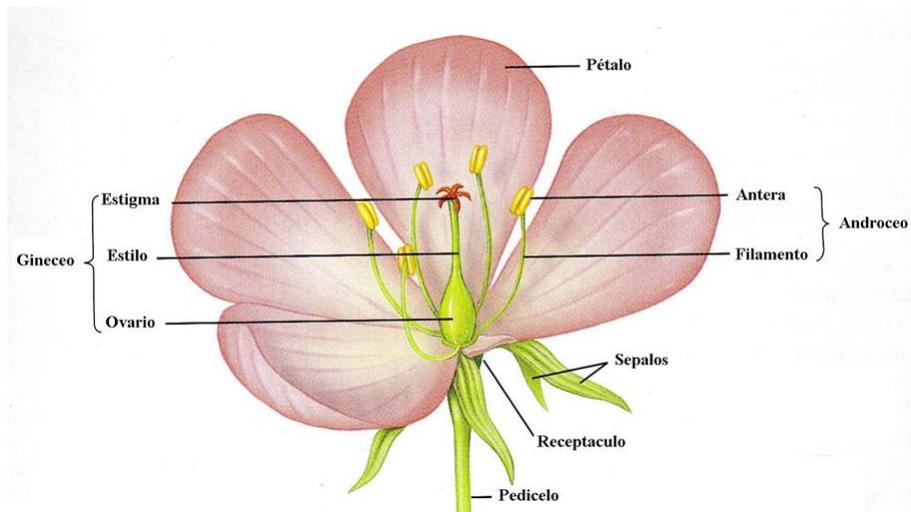


Figura 3: La estructura de la flor con sus 4 verticilos: sépalos, pétalos, androceo y gineceo. (Imagen modificada de Mauseth, 2014).

Transición a la floración

La transición a la floración ha sido ampliamente estudiada en *Arabidopsis* mediante el uso de mutantes afectados en su tiempo de floración bajo diferentes condiciones de crecimiento. Posteriormente, estudios genéticos-moleculares han permitido el descubrimiento de muchos de los genes responsables de cada fenotipo. Así se han identificado 7 diferentes “vías de señalización” dentro de una gran red de regulación

genética que integran señales exógenas: como la luz (Eskins, 1992) y la temperatura (Johanson *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012), y señales endógenas de la planta como: el estado maduro de la roseta (Fornara y Coupland, 2009; Wang *et al.*, 2009), el nivel de recursos energéticos (Corbesier *et al.*, 1998; Wahl *et al.*, 2013) y la concentración de giberelinas (Blázquez *et al.*, 1998; Domalgaska *et al.*, 2010; D'Aloia *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). A continuación, se describen brevemente cada una de ellas.

Señalización por fotoperiodo de día largo

En el caso de *Arabidopsis*, al ser una planta distribuida en el hemisferio norte (Europa, Asia central y el norte de África) entre los 0 a 4250 m. s. n. m. su floración ocurre en primavera-verano (Holl y Heynhold, 1842), respondiendo al fotoperiodo de día largo como uno de los factores exógenos que promueve su floración (Komeda, 2004; Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012).

La inducción a la floración en día largo está regulada en parte por proteínas del ciclo circadiano, una de las cuales es GIGANTEA (GI) (Mizoguchi *et al.*, 2005; McClung, 2006; Sawa y Steve, 2011). GI se une con FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX PROTEIN 1 (FKF1) para llevar a cabo la ubiquitinación de CYCLING DOF FACTORS (CDFs), los represores transcripcionales de *CONSTANS* (*CO*). Por otro lado, GI se une al promotor de *CO* para inducir su transcripción y se ha demostrado que la detección del fotoperiodo de día largo recae en la inducción transcripcional y la acumulación de la proteína *CO*. La proteína de *CO* a su vez, es estabilizada en presencia de luz en el

fotoperiodo de día largo por CRYPTOCHROME 1 Y 2 (CRY1/2) y PHYTOCHROME A (PHY A), fotorreceptores que inhiben la acción de CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1) y SUPRESOR OF PHYTOCROME A (SPA1), que ubiquitan a CO en la obscuridad para su degradación. En día corto, CO es degradada rápidamente por la acción de estas proteínas, lo cual impide la activación de sus genes blanco (Figura 4; Guo *et al.*, 1998; Andrés y Coupland, 2012).

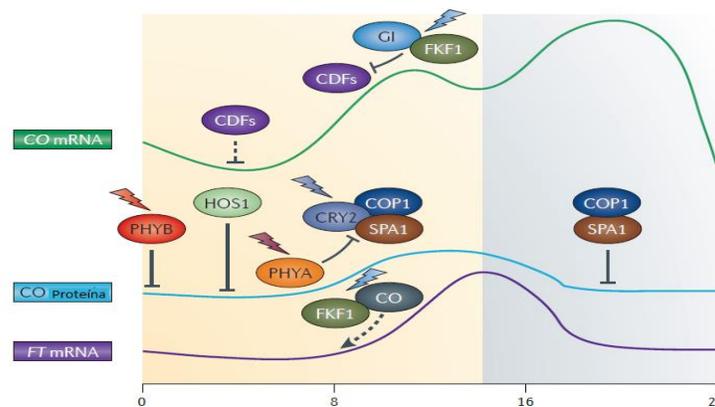


Figura 4: Regulación transcripcional y post-traduccional de CONSTANS (CO) en fotoperiodo de día largo. GI y FKF1 inducen la transcripción de CO mientras que CRY2 y PHYA evitan su degradación dada por COP1 y SPA1, permitiendo la acumulación de CO y la inducción de FT en esta condición de crecimiento (imagen modificada de Andrés y Coupland, 2012).

Finalmente, CO induce la expresión de *FLOWERING LOCUS T* (FT) en las hojas, el cual es conocido como el “florigeno”, ya que su proteína viaja al SAM donde forma un dímero con *FLOWERING LOCUS D* (FD), induciendo así la expresión de *APETALA 1* (AP1) y *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (SOC1), que hacen competente el meristemo de inflorescencia para la formación de los meristemas de flor (Figura 5; Kardailsky *et al.*, 1999; Komeda 2004; Amasino, 2010).

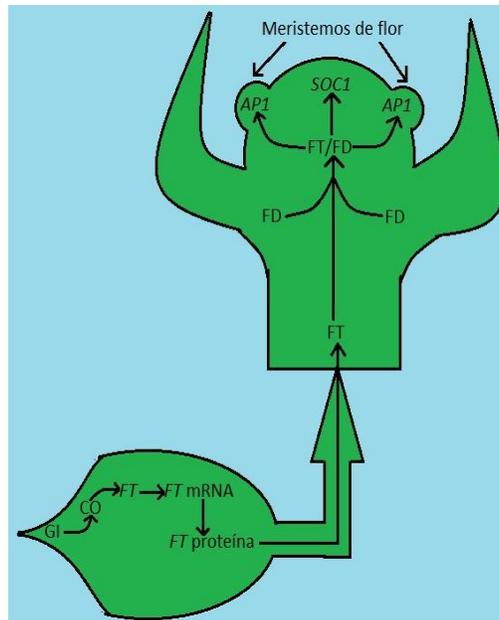


Figura 5: Transición a la floración en condiciones de día largo. GI induce a *CO*, el cual, al acumularse su proteína, promueve la expresión de *FT* y su proteína viaja al SAM y promueve la formación de los meristemas de flor al inducir a *AP1* y a *SOC1*.

Vernalización y vía autónoma

Otro estímulo ambiental al cual *Arabidopsis* está expuesta, es el invierno. La exposición prolongada al frío, o vernalización, es necesaria para que ciertos ecotipos puedan florecer (Johanson *et al.*, 2000; Komeda, 2004; Amasino, 2010). Se sabe que *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un factor transcripcional del tipo MADS-box actúa como un represor de la floración al inhibir la expresión de *SOC1* y *FT* durante el estado vegetativo.

Para que se de la transición a la floración, pueden ocurrir dos cosas: una es que durante el invierno se active la expresión de proteínas polycomb que, mediante marcas epigenéticas de remodelación de cromatina, eviten la transcripción de *FLC* (Sung y Amasino, 2004; Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012). La otra posibilidad es que proteínas como FCA, FLK, FPA y FY, reguladores post-transcripcionales de *FLC*, inhiban

la estabilidad de su mensajero. Los mutantes en esta vía que se ha llamado autónoma, son de floración tardía bajo cualquier fotoperiodo, pero pueden ser complementados al ser vernalizados, debido a la represión epigenética de *FLC* (Simpson, 2004, Amasino, 2010).

Temperatura no óptima o termosensora

Así como el frío es característico del invierno, el calor es una característica del verano y al igual que las plantas responden al frío, estas también son capaces de responder al calor para florecer. *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4 (PIF4)*, el cual incrementa su transcripción cuando la temperatura aumenta a 27° C, induce la expresión de *FT* aún cuando las plantas se crecen en un fotoperiodo de día corto, iniciando de esta forma el proceso de floración (Kumar *et al.*, 2012; Capotilla *et al.*, 2014).

Madurez de la planta

Además de las señales ambientales también se requiere que la planta adquiera cierta madurez para florecer, la cual le permitirá afrontar los gastos energéticos para la producción de semillas (Komeda, 2004; Fornara y Coupland, 2009; Amasino, 2010). Dentro de las señales que indican que la planta ha alcanzado la madurez, está la inducción del microRNA172 (miR172), el cual reprime la expresión de algunos represores de la floración como *TARGET OF EAT (TOE)* y *SCHLAFMÜTZE (SMZ)*. Esto a su vez, permite la expresión de los factores *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE 3, 4 y 5 (SPL3, 4 o 5)*, los cuales inducen también la expresión de *FT* promoviendo la transición a la floración (Fornara y Coupland, 2009; Amasino, 2010).

Señalización por trehalosa

La cantidad de sustancias de reserva también es un indicativo de la madurez la planta y de que posee los recursos energéticos para soportar la transición a la floración y la formación de semillas. Recientemente, se ha descubierto que la trehalosa-6-fosfato actúa como molécula señalizadora que repercute en la inducción de *FT* y por lo tanto también en la transición a la floración (Wahl *et al.*, 2013).

Giberelinas

Las hormonas son moléculas que coordinan diferentes funciones biológicas en la planta. Las giberelinas tienen un papel crucial en la transición a la floración, ya que inducen la expresión tanto de *FT* como de *LEAFY (LFY)*, lo que deriva en la floración aún cuando las condiciones de fotoperiodo no sean inductivas (Blázquez *et al.*, 1998; Domagalska *et al.*, 2010; Srinanth y Schmid, 2011).

Cada una de estas “vías” fueron identificadas por mutantes específicos en cada una de ellas que presentaban afectaciones en el tiempo de floración en las diferentes condiciones, pero en realidad existe una red compleja de interacciones entre todas estas, las cuales confluyen en la inducción de *LFY* y *API* que le dan la identidad al meristemo de flor (Figura 6; Kardailsky *et al.*, 1999; Komeda 2004; Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012; Blumel *et al.*, 2015).

involucrados en el ciclo circadiano en respuesta a diferentes condiciones de estrés, tal es el caso de *GI* (Kwon *et al.*, 2014).

Los MADS-box y su papel en la transición a la floración

Varios de los genes involucrados en el proceso de floración son factores de transcripción pertenecientes a la familia de los MADS-box. Estos factores de transcripción tienen un dominio de unión al DNA (MADS) que se une específicamente a las cajas CA₆RG (CC[A/T]₆GG). Dentro de los MADS-box se pueden diferenciar 2 tipos: los del tipo I que poseen el dominio MADS y un carboxilo terminal; mientras que los del tipo II de plantas poseen, además del dominio MADS, un dominio I y uno K que participan en la formación de dímeros y finalmente un dominio C que tiene funciones de regulación transcripcional y de formación de complejos protéicos (Smaczniak *et al.*, 2012) Dentro de los genes del tipo II encontramos represores de la floración como *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* y *FLC* e inductores de esta como: *SOC1*, *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, *AP1*, *FRUITFULL (FUL)*, *XAANTAL1 (XAL1/AGL12)*, *XAANTAL2 (XAL2/AGL14)*, *AGL17* y *AGL19* entre otros (Smyth, 1995; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Simpson, 2004; Shönrock *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2008; Tapia-López *et al.*, 2008; Amasino, 2010; Smaczniak *et al.*, 2012; Torti y Fornara, 2012; Kim *et al.*, 2013; Balanza *et al.*, 2014; Pérez-Ruiz *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2015).

Antecedentes

El efecto del estrés hídrico en el tiempo de floración se ha abordado desde un punto de vista agronómico y los estudios realizados se han enfocado principalmente en mejorar la productividad agrícola (Araus *et al.*, 2002; Bray 1997; Chinnusamy *et al.*, 2005; Blum, 2009). Sin embargo, se ha observado que la floración es un proceso de desarrollo que presenta plasticidad ante el estrés abiótico en diversas especies (Tabla 1; Wada y Takeno, 2010, Sherrard y Maheeranli, 2006; Franks, 2007; Franks *et. al*, 2071; Ivey y Carr 2011, Riboni *et al.*, 2013).

Tabla 1: Efectos del estrés abiótico en el tiempo de floración de diferentes especies

Factor Estresante	Especies	Respuesta en la Floración
Alta intensidad de luz	<i>Pharbitis nil</i>	Inducción
Poco oxígeno		
Bajas Temperaturas		
Supresión de elongación de la raíz		
Baja intensidad de luz	<i>Lemna paucicostata</i> <i>Perilla frutescens var. crispa</i>	Inducción
Ultravioleta C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Inducción
Sequía	<i>Pseudotsuga menziesii</i> <i>Citrus sp.</i>	Inducción
	<i>Ipomoea batatas</i>	Promoción
Nutrición pobre	<i>Pharbitis nil</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	Inducción
	<i>Macroptilium atropurpureum</i> <i>Cyclamen persicum</i> <i>Ipomoea batatas</i>	Promoción
Poco nitrógeno	<i>Lemna paucicostata</i>	Inducción
Concentración alta de GA	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Promoción
Poda de raíz	<i>Citrus sp.</i> <i>Pharbitis nil</i>	Inducción
Estimulación mecánica	<i>Ananas comosus</i>	Inducción

(Modificada de Wada y Takeno, 2010).

Riboni y col. (2013) demostraron que GI, además de promover la floración en respuesta al fotoperiodo de día largo, promueve la floración bajo condiciones de sequía estableciendo así una respuesta de evasión al estrés hídrico. En dicho trabajo se observó que al imponer un estrés hídrico utilizando un riego al 30% en día largo, GI promueve la expresión de *FT* y de *TWIN SISTER OF FT (TSF)* los cuales activan a *SOC1*, que a su vez tiene una retroalimentación positiva sobre *TSF*. Este proceso es dependiente tanto del fotoperiodo de día largo como de ABA y ocurren independientemente de CO. En condiciones de día corto y sequía no se induce la floración, debido a la permanencia de represores de la floración como SVP y FLC (Figura 7; Riboni *et al.*, 2013).

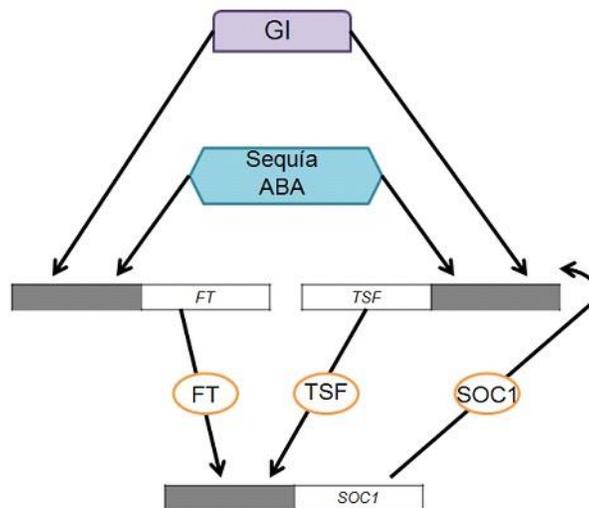


Figura 7: GI promueve la floración al inducir a *FT* y *TSF* en condiciones de día largo y sequía y este proceso se encuentra mediado por ABA (Imagen modificada de Riboni *et al.* 2013).

Por otra parte, existen estudios donde se demostró que el estrés salino retarda el tiempo de floración (Achard *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2011 y 2014). El estrés salino alarga el tiempo de crecimiento vegetativo al aumentar las proteínas DELLA que reprimen la señalización por giberelinas y además las proteínas DELLA inhiben la expresión de *LFY*

lo que retarda la floración (Achard *et al.*, 2006). Por otra parte, se encontró que la sobre expresión del factor de transcripción *membrane-bound NAC transcription factor* (NTL8) en su forma activa, retarda la floración en plantas crecidas con 100 mM de NaCl, por lo que los autores proponen que el retraso en la floración dado por estrés salino se debe a la regulación negativa de *FT* vía NTL8 (Kim *et al.*, 2007). Recientemente se demostró también que el retraso en el tiempo de floración en condiciones de salinidad se debe a la falta de actividad del complejo FT-FD debido a la inducción de BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) que también compite por FD (Figura 8; Ryu *et al.*, 2014). En resumen, la evidencia que existe hasta el momento indica que el estrés salino retarda la floración en *Arabidopsis* y que esto se debe a la falta de expresión o actividad de *FT* y a la disminución en la expresión de *LFY* por la presencia de proteínas DELLA.

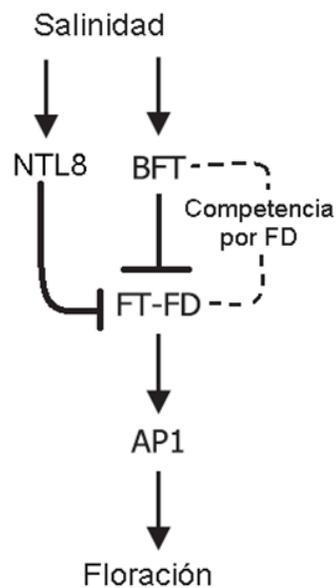


Figura 8: La salinidad retarda la floración. En condiciones de salinidad se induce la expresión de *BFT*, cuya proteína interactúa con FD en el núcleo inhibiendo la formación del dímero FT-FD. Adicionalmente el factor de transcripción NTL8 reprime la expresión de *FT* en salinidad (Imagen modificada de Ryu *et al.*, 2014).

Con excepción de los trabajos antes mencionados, los estudios sobre las respuestas al estrés a nivel molecular se han orientado principalmente a los mecanismos que suceden básicamente durante el crecimiento vegetativo. Además, las metodologías empleadas generalmente utilizan choques de estrés por periodos cortos de tiempo (Bray, 1997; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Seo *et al.*, 2009; Hirt, 2010; Skiryts *et al.*, 2010; Versules y Juenger, 2011; Huang *et al.*, 2012). Por lo tanto, este trabajo está encaminado primero, a establecer las metodologías que nos permitan el análisis del estrés osmótico, hídrico y salino en la floración. Segundo, a tratar de establecer si algunos genes MADS-box que se sabe participan en la transición a la floración, también la regulan en respuesta al estrés y tercero, a tratar de encontrar una relación entre el tiempo de floración y la producción de semillas bajo condiciones de estrés osmótico o salino, sobre lo cual no existen estudios al respecto.

Hipótesis

Al someter plantas silvestres y mutantes de algunos genes MADS-box de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) a estrés osmótico o salino, se retardará el tiempo de floración, pero habrá mayor producción de semillas, siendo más acentuados los fenotipos en los mutantes.

Objetivo general

Cuantificar el tiempo de floración y la descendencia de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) y algunos mutantes en genes MADS-box cuando se aplica un estrés osmótico o salino durante periodos largos de tiempo.

Objetivos particulares

- Establecer un sistema de crecimiento que nos permita evaluar la transición a la floración y la producción de descendencia en *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés osmótico o salino.

- Analizar, con el uso de bases de datos de microarreglos, la expresión de algunos genes MADS-box relacionados con el tiempo de floración en condiciones de estrés osmótico y estrés salino.

- De encontrarse genes MADS-box que se regulen por estrés (en el objetivo anterior), evaluar el tiempo de floración y descendencia de algunos de sus mutantes cuando son sometidos a condiciones de estrés hídrico o salino en comparación con las plantas silvestres.

Metodología

Material biológico, esterilización y condiciones de crecimiento generales

Para el ensayo en hidroponia y el crecimiento en cajas Petri, las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia fueron esterilizadas con una mezcla de cloro 60%, tween 20 0.005% durante 5 minutos, seguido de 4 lavados rápidos con agua bidestilada estéril, las semillas se estratificaron con 1 ml agua bidestilada estéril y se dejaron en la oscuridad a 4 °C por 3 días.

Para los ensayos de sequía y salinidad las semillas de las plantas silvestres y de los mutantes *xal1-2*, *agl19* (*salk_000234C* y *GK576F07*) fueron estratificadas con 1 ml de agua bidestilada estéril y posteriormente se dejaron en oscuridad durante 3 días a 4 °C.

Una vez estratificadas las semillas se sembraron en medio Murashi y Skoog (MS) al 0.2x (sales 0.88g/L, MES 0.5g/L) pH de 5.6 (hidroponia y placa) o en sustrato. Todos los ensayos se mantuvieron en condiciones de día largo (16 horas de luz por 8 de oscuridad) con aproximadamente 6800 lx y con una temperatura de ~23° C.

Crecimiento en hidroponia

Para el estudio del efecto del estrés osmótico se empleó el dispositivo “Araponics”, el cual consta de un contenedor negro con capacidad de ~2L, una rejilla y conos para portar las semillas. Para oxigenar el medio se utilizó una bomba de aire y se distribuyó en el medio con un difusor de arena compacta. Como solución nutritiva se usó MS 0.2X sin sacarosa, estéril. Las semillas se colocaron en los conos usando agar al 0.65% como sustrato previamente esterilizados y enfriados 24 horas a 4 °C para que solidificara.

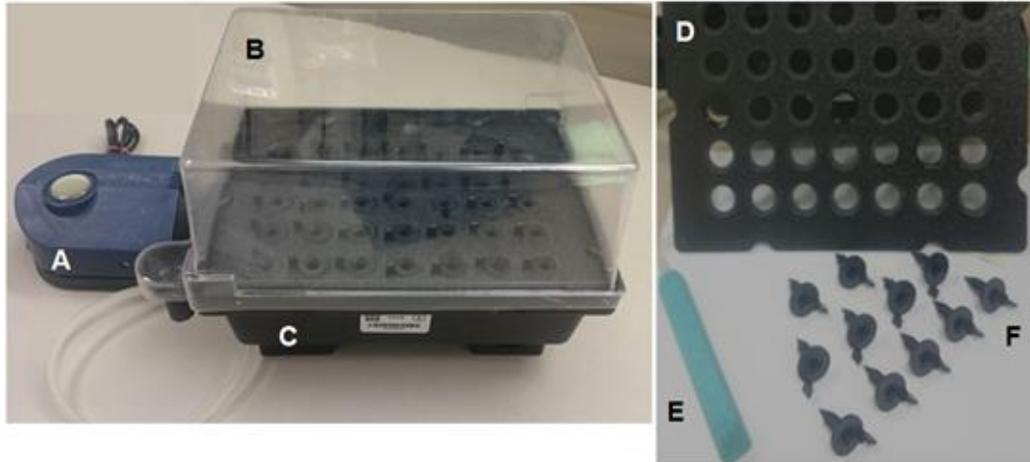


Figura 9: Dispositivo de hidroponia “Araponics”, este dispositivo consta de: A) una bomba de aire, B), un domo, C) contenedor para el medio de crecimiento, D) rejilla, E) difusor de arena y F) conos para portar las semillas.

Aplicación del estrés en hidroponia

Siete días posteriores a la siembra en MS, la solución nutritiva se reemplazó por el mismo medio adicionado con manitol, NaCl o PEG 8000 a las concentraciones y duración que se indica en la Tabla 2.

Tabla 2: Soluciones estresantes para hidroponia.

Soluto	Concentración	Duración del estrés
PEG 8000	2% (2.5mM)	2-5 días
	3% (3.75mM)	5 días
	4% (5mM)	5 días
	5% (6.25mM)	3 y 5 días
	10% (12.5mM)	3 y 5 días
Manitol	5mM	5 días
	10mM	5 días
	15mM	5 días
NaCl	15mM	5 días
	150mM	5 días

Una vez concluido el estrés, se reemplazó la solución estresante por el medio MS inicial. Para evitar la contaminación la solución nutritiva fue renovada cada siete días hasta el término del experimento.

Estrés salino

Para analizar el efecto del estrés salino en el tiempo de floración y la descendencia, las plantas fueron sembradas en metromix. Después de nueve días de crecimiento, las plantas se sometieron al estrés salino regándolas dos veces a la semana con 500 ml de NaCl 100 mM por charola. El control se regó con la misma frecuencia y volumen, pero con agua corriente. El riego se mantuvo hasta el final del experimento.

Estrés por sequía

Para el estudio de los efectos de la sequía se utilizó la combinación de dos sustratos, uno de ellos con un tamaño de partícula de grava y el otro de arenisca, el primer sustrato fue Turface (MVP Hummer international), y el segundo Metromix. Estos sustratos se utilizaron en una relación turface/metromix 2:1.

Para determinar la capacidad de campo se tomaron 100 grs del sustrato en su punto de saturación, y se secaron durante 72 horas en horno a 65 °C. La determinación de la capacidad de campo se realizó al inicio de cada experimento.

Como macetas se utilizaron vasos de unicel de 4 oz. (120 cm³), perforados en la base y los costados, el diámetro de los orificios es de ~7 mm. Una vez esterilizado el sustrato en autoclave las macetas se llenaron con el sustrato saturado de agua con un peso final de 70 gr. Durante los primeros 9 días post-siembra las macetas fueron regadas con agua corriente manteniendo el ~90% de agua. Al 9º día posterior a la siembra se retiró el agua de la charola y se detuvo el riego de las plantas en el tratamiento de sequía hasta que alcanzaron el ~60% de contenido de agua, una vez que el sustrato llegó a este porcentaje, se controló la cantidad de agua del sustrato pesando las macetas diariamente y añadiendo la cantidad de agua necesaria para que el sustrato mantuviera el ~60% de contenido de agua. Las plantas control se mantuvieron entre un 80-90% de contenido de agua. El tratamiento se mantuvo hasta el final del experimento.

Determinación del potencial hídrico

La medición del potencial hídrico de las soluciones y sustratos, se realizó con el osmómetro Wescor VAPRO 5600 en el laboratorio de la Dra. Alejandra Covarrubias del Instituto de Biotecnología (UNAM). Este aparato entrega valores de mmol/Kg y los datos obtenidos fueron convertidos a MPa con la fórmula:

$$\Psi_s = -RTC_s$$

Donde R es la constante de los gases (8.32 Jmol⁻¹K⁻¹); T es la temperatura de la solución en grados Kelvin y C_s es la concentración del soluto en moles/Kg (Money, 1989).

Análisis de bases de datos de microarreglos

A partir de los loci de algunos de los genes que se conoce participan en la transición a la floración (*GI* (AT1G22770), *CO* (AT5G15840) y *FT* (AT1G65480)) y en especial de genes MADS-box (*XAL1* (AT1G71692), *XAL2* (AT4G11880), *AGL17* (AT2G22630), *AGL19* (AT4G22950), *AGL24* (AT4G24540), *SOCI* (AT2G45660) y *FUL* (AT5G60910)), se analizó su expresión bajo condiciones de salinidad, sequía y estrés osmótico en las bases de datos: AtGeneExpress (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>), TileViz (<http://jsp.weigelworld.org/tileviz/tileviz.jsp>), GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>) y BAR Toronto (<https://bar.utoronto.ca/eplant/>).

De las cuales se tomaron los datos más representativos para cada gen.

Medición de la tasa de crecimiento de la parte aérea

Al momento en el que se iniciaron los tratamientos de sequía o salinidad, se midió la parte aérea de las plantas, tomando como parámetros dos diámetros en la roseta, con los cuales se determinó el área. Las mediciones se efectuaron diariamente durante nueve días para sequía y 12 para salinidad.

Cuantificación de la floración

Para cuantificar la floración se utilizaron dos parámetros, el primero fueron los días post-siembra que tardaron las plantas para que el escapo alcanzara 1 cm de altura y el segundo fueron las hojas de roseta producidas en ese momento. Adicionalmente se cuantificaron las hojas caulinares.

Cuantificación de la descendencia

Para tener un aproximado de la descendencia, se contabilizaron y se midieron todas las silicuas producidas por cada planta al momento de la dehiscencia.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico “GraphPad Prism 6”. Primero se realizó una prueba D’Agostino y Pearson para determinar si los datos se ajustaban a una distribución normal, con base en estos resultados se realizaron ANOVAs de una vía seguidas de comparaciones múltiples de Turkey o pruebas de T o Mann-Withney.

Análisis de expresión genética por RT-PCR

Las plantas silvestres y los mutantes *agl19salk_000234C* y *agl19GK576F07* se crecieron en cajas petri en medio MS 0.2X durante 10 días y se colectó la parte aérea. La extracción de RNA total se llevó a cabo con TRIzol (Invitrogen). La síntesis de cDNA se llevó a cabo con un oligo dT y para los ensayos de PCR se utilizaron los siguiente oligonucleótidos y condiciones indicadas:

AGL19:

AGL19MPE (F1) 5’ GTGAGGGGCAAAACGGAGATG 3’

AGL19 R 285 (R2) 5’ TCCAGATGTTTCGTCTCTCG 3’

AGL19R 430 (R7) 5’ ATTCTTTTTGAAGAAGTTGTAAG 3’

Fragmento F1-R7, fragmento 660 pb (sólo exones), Tm 58°C, 40 ciclos.

Fragmento F1-R2, fragmento 282 pb (sólo exones), Tm 60°C, 40 ciclos.

TUB:

TUB F 5'CTCAAGAGGTTCTCAGCAGTA3'

TUB R 5'TCACCTTCTTCATCCGCAGTT3'

TUBULINA2 fragmento 668 pb, Tm 62°C a 25 ciclos.

Resultados

Con el uso de hidroponia y los substratos, fue posible establecer sistemas que disminuyeran el potencial hídrico del medio. Los resultados en el tiempo de floración y la descendencia, así como el crecimiento vegetativo de la roseta, en respuesta al estrés hídrico y salino, se evaluaron y se describen a continuación.

Crecimiento en hidroponia como metodología para imponer estrés osmótico en *Arabidopsis thaliana*

Los métodos de crecimiento en líquido han sido utilizados para el estudio de diversos procesos en *Arabidopsis* (Tocquin *et al.*, 2003; Tocquin *et al.*, 2006; D'Aloia *et al.*, 2011). En el presente trabajo se buscó establecer un sistema de estrés osmótico en hidroponia, debido a que con este sistema podríamos equiparar los potenciales hídricos entre diferentes solutos y controlarlos eficientemente, además nos permitiría establecer si el estrés salino podría tener un efecto tóxico además de su efecto osmótico que afectara la floración.

Se logró disminuir eficientemente el potencial hídrico del medio mediante la adición de 3 diferentes solutos osmóticamente activos. En la Figura 10 se muestra la disminución del potencial hídrico causado por diferentes concentraciones de manitol, NaCl y PEG 8000, siendo este último el que presenta la pendiente con el menor valor lo que lo posiciona como el soluto que a menor concentración disminuye más fuertemente el potencial hídrico.

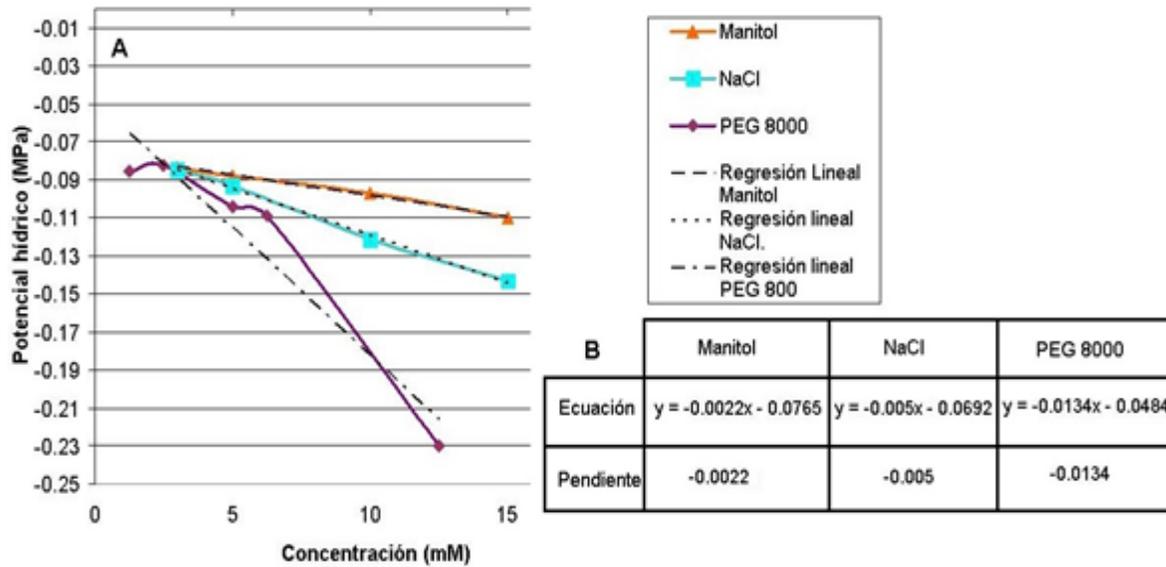


Figura 10: El potencial hídrico en hidroponía. A) Los solutos disueltos en medio líquido MS 0.2X sin sacarosa disminuyen el potencial hídrico del medio de forma inversamente proporcional a su concentración. B) El PEG 8000 es el soluto que reduce más drásticamente el potencial hídrico del medio al tener la pendiente más inclinada.

De esta forma encontramos que utilizando PEG 8000 a 4 %, Manitol a 15 mM y NaCl a 10 mM lograríamos tener un valor de potencial hídrico similar en el medio, lo que nos permitiría equiparar el efecto en el tiempo de floración utilizando los diferentes solutos osmóticamente activos. Sin embargo, los efectos en el desarrollo de la planta cuando crecían en los diferentes solutos eran diversos, aunque tuviesen el mismo potencial hídrico, lo que nos llevó a analizar la respuesta de las plantas en las concentraciones indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3: Concentración y duración del tratamiento con agentes estresantes y su efecto en el desarrollo de las plantas.

Agente estresante	Concentración	Duración del estrés (7 días postsiembra)	Efecto en el desarrollo
PEG 8000	2% (2.5 mM)	2-5 días	Disminución del tamaño de la raíz y roseta
	3% (3.75 mM)	5 días	Disminución del tamaño de la raíz y roseta
	4% (5 mM)	5 días	Disminución del tamaño de la raíz y roseta
	5% 6.25 mM)	3 y 5 días	Impide el desarrollo
	10% (12.5 mM)	3 y 5 días	Impide el desarrollo
Manitol	5 mM	5 días	Disminución del tamaño de la raíz
	10 mM	5 días	Disminución del tamaño de la raíz
	15 mM	5 días	Disminución del tamaño de la raíz
NaCl	15 mM	5 días	Disminución del tamaño de la raíz
	150 mM	5 días	Disminución del tamaño de la raíz

Se buscó que el estrés no afectara demasiado el crecimiento vegetativo, ya que un retraso severo en el desarrollo de la planta podría generar un retraso en la floración. Sin embargo, encontramos que a pesar de que todos los solutos a diferentes concentraciones y periodos de aplicación del estrés afectaron el desarrollo vegetativo de Arabidopsis, no tenían una correlación directa con el tiempo de floración (Tabla 3; Figura 11).

En la Figura 11 se observa que el estrés salino induce la floración en las plantas silvestres antes que los otros tratamientos. Sin embargo, no logramos obtener resultados que fueran reproducibles, pese a que se realizaron varias repeticiones de los experimentos en la Tabla 3.

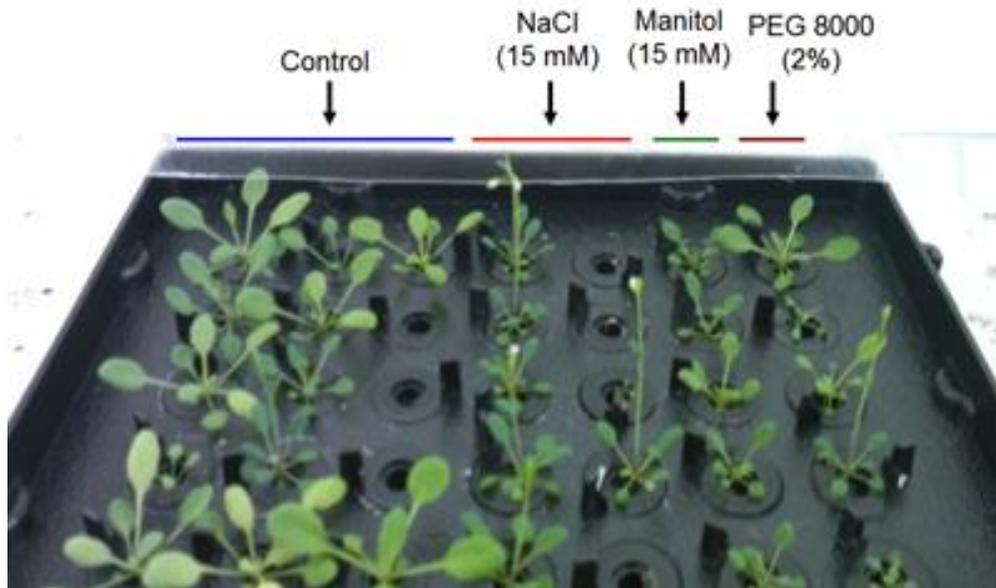
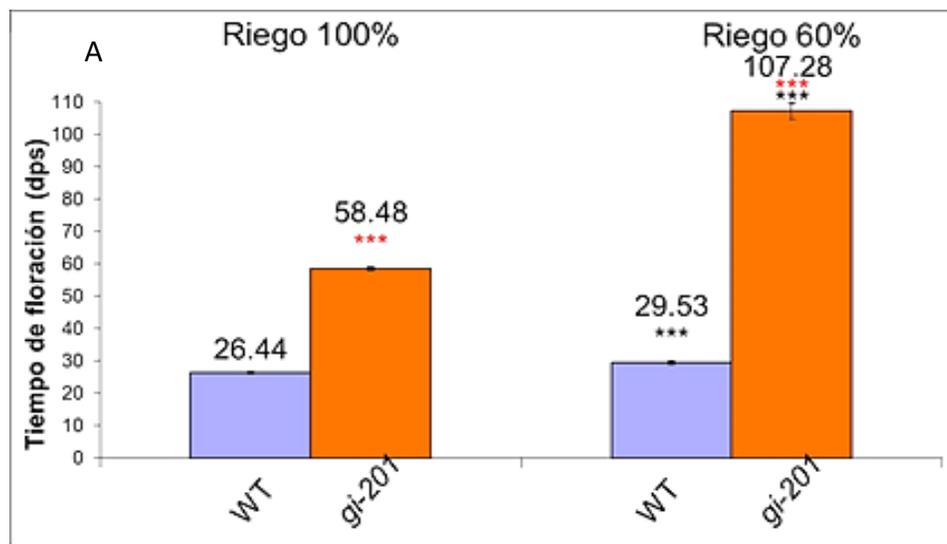


Figura 11: El estrés salino indujo la floración temprana, aunque este resultado no fue reproducible. En la foto se muestran las plantas después de ser sometidas al estrés por separado.

Es posible que en este sistema de crecimiento sea difícil mantener una disolución homogénea ya que el sistema no cuenta con agitación. También es posible que la difusión del oxígeno mediante aeración con la bomba de aire no haya sido suficiente, lo que provocaba que en algunas ocasiones se estresaran las plantas aún más. Por las observaciones anteriores, este sistema de crecimiento fue descartado y pasamos a los sistemas sólidos.

Establecimiento de sistemas de crecimiento para analizar el efecto del estrés hídrico y salino en el tiempo de floración

El papel de *GI* en el control del tiempo de floración en día largo bajo condiciones de sequía fue descrito por Riboni y colaboradores (2013). Así que decidimos utilizar como control al mutante *gi-201* y plantas silvestres para probar un sistema similar utilizando turface:metromix (2:1) con un riego al 60%. Con este experimento establecimos que efectivamente *gi-201* es de floración tardía tanto en condiciones de día largo (control) como en respuesta al estrés hídrico, siendo en este último caso más drástico el efecto (Figura 12). Encontramos que, pese a la gran diferencia en el tiempo de floración, existía una diferencia sutil en el número de hojas (Figura 12B). Incluso en las plantas silvestres se observó un menor número de hojas en las plantas sometidas al estrés hídrico que en las plantas bien irrigadas.



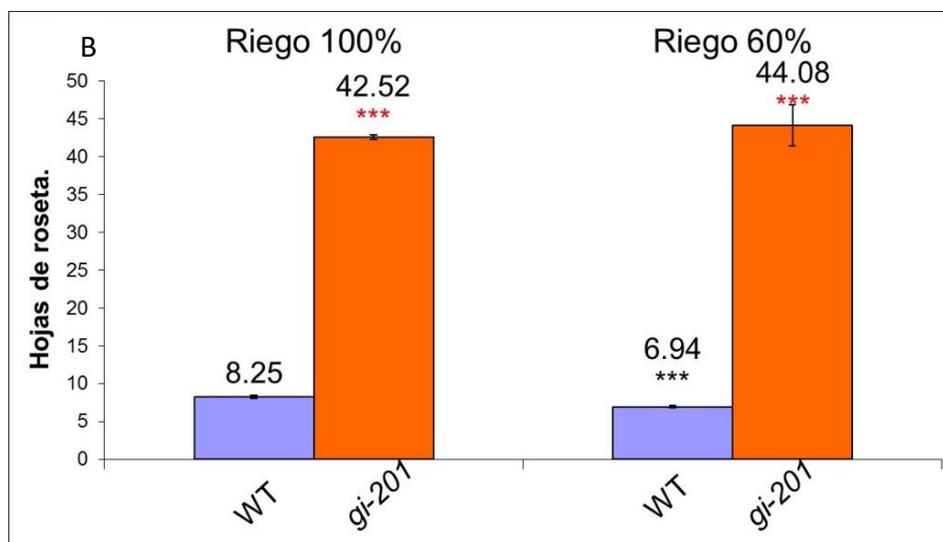


Figura 12: La sequía (60% de riego) retarda aún más la floración de las plantas *gi-201* al compararlo con la condición control (100% de riego). A) Tiempo de floración en días postsiembra (dps). B) Número de hojas producidas al momento de la floración. Las barras representan error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron con prueba de t de una cola. *(en rojo) son las diferencias entre genotipos y *(en negro) diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 25-32$ plantas)

Adicional al experimento del tiempo de floración de las plantas *gi-201*, se cuantificó el potencial hídrico del sustrato y encontramos que justo antes del riego, para que el sustrato alcanzara el 60% de agua, las macetas tenían aproximadamente el 27% de agua debido a la evaporación, por lo que su potencial hídrico alcanzó hasta -12.23 MPa en este punto (Figura 13A). Lo que nos indica que, aun cuando se trató de mantener constante la cantidad de riego de cada grupo de plantas, las fluctuaciones en el potencial hídrico son grandes entre un riego y el siguiente.

Para imponer el estrés salino a las plantas, utilizamos el riego con NaCl 100 mM y metromix como sustrato. En este caso sólo observamos que el potencial hídrico disminuyera con respecto al control y este se mantuvo relativamente constante (Figura 13B). De esta forma, establecimos que ambos sistemas de crecimiento para los experimentos posteriores imponían una restricción en la disponibilidad de agua.

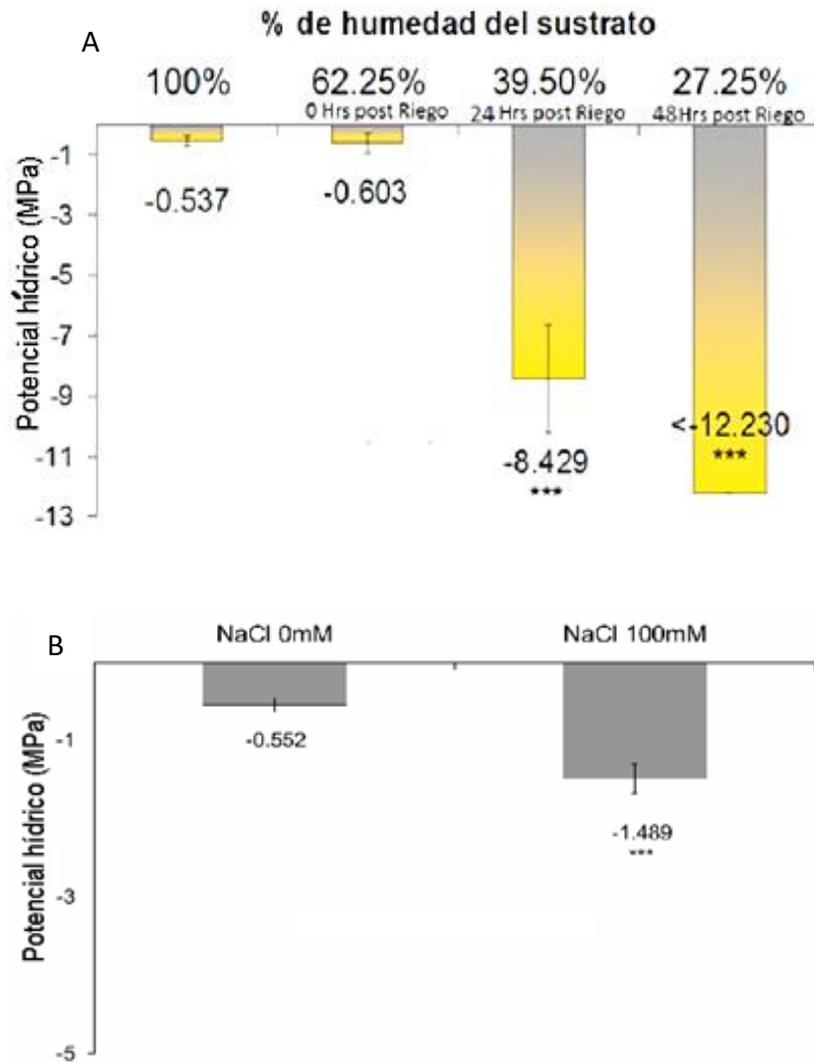


Figura 13: Disminución del potencial hídrico del sustrato con estrés. A) El contenido de agua para las plantas control se mantuvo al 100%, mientras que para las plantas en estrés se restringió el contenido de agua al 60%. Sin embargo, entre cada riego llegaban a perder más agua y por lo tanto el potencial hídrico disminuía drásticamente. B) Las plantas control se les regó con agua de la llave, mientras que las tratadas se les adicionó NaCl 100 mM. Las barras corresponden al error estándar, las diferencias significativas se obtuvieron con ANOVA de una vía en (A) y prueba de t de una cola en (B). (***) $p < 0.001$ para tres mediciones independientes).

Análisis de la expresión de genes conocidos que participan en la transición a la floración, en condiciones de estrés hídrico por medio de bases de datos de microarreglos

Se analizó el cambio en la expresión de *XAL1*, *XAL2*, *AGL19*, *AGL24*, *GI*, *CO*, *FT*, *SOC1* y *FUL* (que se sabe participan en la transición a la floración) en respuesta al estrés osmótico, salino o sequía mediante el uso de las plataformas: AtGeneExpress, TileViz, GEO y BAR Toronto. A pesar de que los resultados de microarreglos se obtuvieron mediante aplicaciones drásticas de estrés por periodos cortos de tiempo, es factible que estas nos sirvan como indicativo del efecto del estrés abiótico en genes relacionados con el tiempo de floración, dándonos un indicio de qué mutantes utilizar para fines de este trabajo.

De los genes analizados, encontramos que todos cambian su expresión en condiciones de estrés abiótico y el sentido de la regulación depende del tipo de estrés y del órgano analizado (Tabla 4).

Tabla 4: Cambio en la expresión de genes involucrados en el tiempo de floración bajo condiciones de estrés en bases de datos de microarreglos.

Gen	Osmótico		Sequía		Salino	
	Roseta	Raíz	Roseta	Raíz	Roseta	Raíz
<i>XAL1</i>	↑1.417x	↓5.01x	-	-	-	-
<i>AGL 19</i>	↑1.884x	↑2.842x	-	-	↑1.455x	↑2.299x
<i>SOC1</i>	-	↓2.158x	↓1.613x	-	-	-
<i>FUL</i>	↑2.771x	↑1.586x	↓2.096x	-	↑2.783x	-
<i>XAL2</i>	-	↑2.699x	-	-	↓1.470x	-
<i>AGL24</i>	↓2.252x	-	-	-	↓1.883x	-
<i>GI</i>	↑1.913x	↑1.805x	↑2.036x	↑1.334x	↑1.721x	↑1.593x
<i>CO</i>	↑1.499x	↑1.406x	-	↓1.184x	↑1.603x	↑1.733x
<i>FT</i>	↓5.015x	↑1.358x	↓2.648x	↓1.191x	↑1.793x	-

El análisis de las bases de datos indica que *GI* es regulado positivamente por las tres condiciones de estrés (Tabla 4), lo que es congruente con el papel de *GI* en sequía, previamente demostrado por Riboni y colaboradores (2013).

XALI es un factor de transcripción del tipo MADS-box involucrado en la transición a la floración bajo condiciones de día largo y además es un gen que participa en el desarrollo de la raíz (Tapia-López *et al.*, 2008). Estas características lo hacen un buen candidato para el estudio del estrés hídrico y el tiempo de floración, ya que la raíz es el órgano que percibe el estrés hídrico. En la Tabla 4 se puede ver que *XALI* es el gen que se reprime más fuertemente en la raíz bajo condiciones de estrés osmótico, pero en la parte aérea se activa en respuesta a estrés osmótico, esto podría indicar que es posible una alteración en el tiempo de floración en plantas *xall* en condiciones de estrés hídrico.

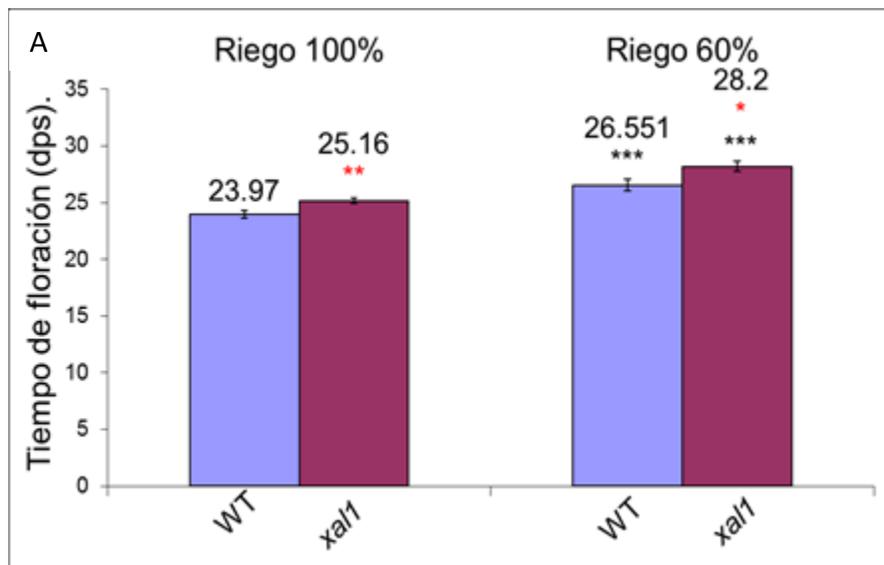
AGL19, otro factor de transcripción del tipo MADS-box, podría tener un efecto en el tiempo de floración en condiciones de estrés hídrico, ya que se ha reportado que las plantas mutantes en *AGL19* presentan un fenotipo de floración tardía en condiciones de vernalización (Schönrock *et al.*, 2006). Este gen, a diferencia de *XALI*, muestra una regulación consistente entre la parte aérea y la raíz, ya que en ambos órganos ocurre una inducción de su expresión bajo condiciones de estrés osmótico y salino (Tabla 4). Puesto que *AGL19* participa en la floración en respuesta a la vernalización y el frío prolongado disminuye la disponibilidad de agua, lo hacen un buen candidato para su estudio en condiciones de estrés osmótico.

Para este trabajo decidimos empezar por comparar el tiempo de floración y la descendencia de los mutantes *xall* y *agl19* con las plantas silvestres en estrés hídrico y salino.

Efecto de la sequía en el tiempo de floración de plantas silvestres, *xal1* y *agl19*

La restricción del riego al 60% de agua, causó un leve retraso en la transición a la floración en términos del número de días post-siembra al momento de la floración de las plantas silvestres (Col-0) (Figura 14A) pero el número de hojas de roseta no cambió con respecto al control (Figura 14B).

La proporción en el retraso en el tiempo de floración entre *xal1* y las plantas silvestres en condiciones de día largo (Tapia-López *et al.*, 2008) se mantuvo cuando las plantas fueron sometidas a sequía (Figura 14), es decir, que el fenotipo de floración tardía prevaeciente del mutante es la respuesta a fotoperiodo de día largo. El número de hojas no aumentó, incluso se redujo en las plantas *xal1* que se estresaron, aunque existe un ligero incremento con respecto a las plantas silvestres estresadas (Figura 14B). Por lo tanto, este gen MADS-box no participa en la regulación del tiempo de floración en respuesta a sequía en la intensidad y duración analizada en este trabajo.



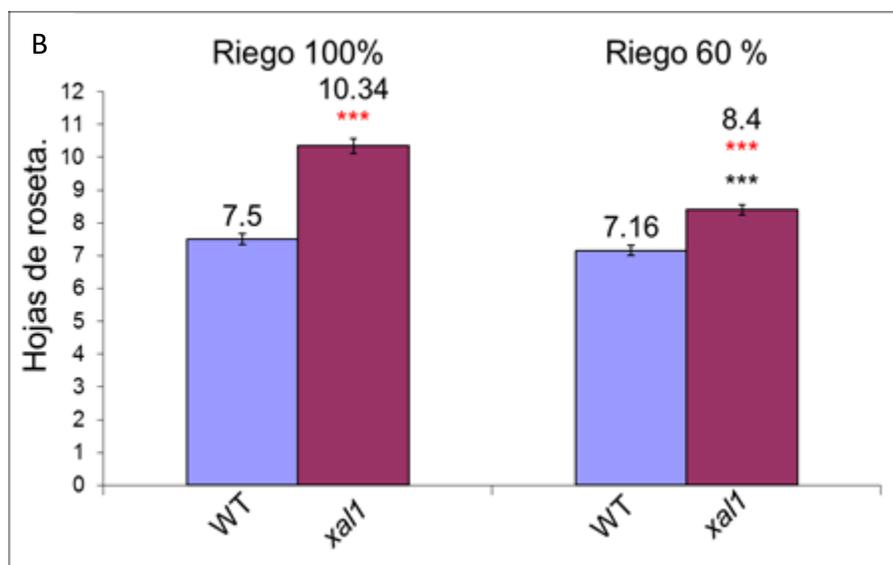


Figura 14: Tiempo de floración de *xal1* en estrés hídrico. A) *xal1* florece tardíamente en día largo en plantas bien irrigadas y este tiempo no se incrementó en sequía. B) El número de hojas producidas al momento de la floración se redujo en ambos genotipos. Las barras representan error estándar, las diferencias significativas se obtuvieron con una prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos y * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 15-23$ plantas)

Para el análisis de *AGL19* en la floración en respuesta al estrés hídrico, se analizaron dos alelos mutantes en este gen, debido a que se ha observado que el gen *AGL19* posee *splicing alternativo* que influye en el fenotipo de floración (datos de David Cruz sin publicar). Tal como se ha demostrado anteriormente, las plantas *agl19* no cambian su tiempo de floración en día largo cuando están bien irrigadas (Schönrock *et al.*, 2006). Sin embargo, bajo estrés hídrico se observó que las plantas *agl19 Salk_000234C* son de floración tardía tanto en el número de días post-siembra, como en las hojas producidas al momento de la floración con respecto a las plantas silvestres en estrés (Figura 15). Sin embargo, nuevamente observamos que el número de hojas producidas bajo estrés es menor al de las plantas bien irrigadas. El alelo GK579F07 tuvo un fenotipo más débil que el alelo *Salk_000234C*.

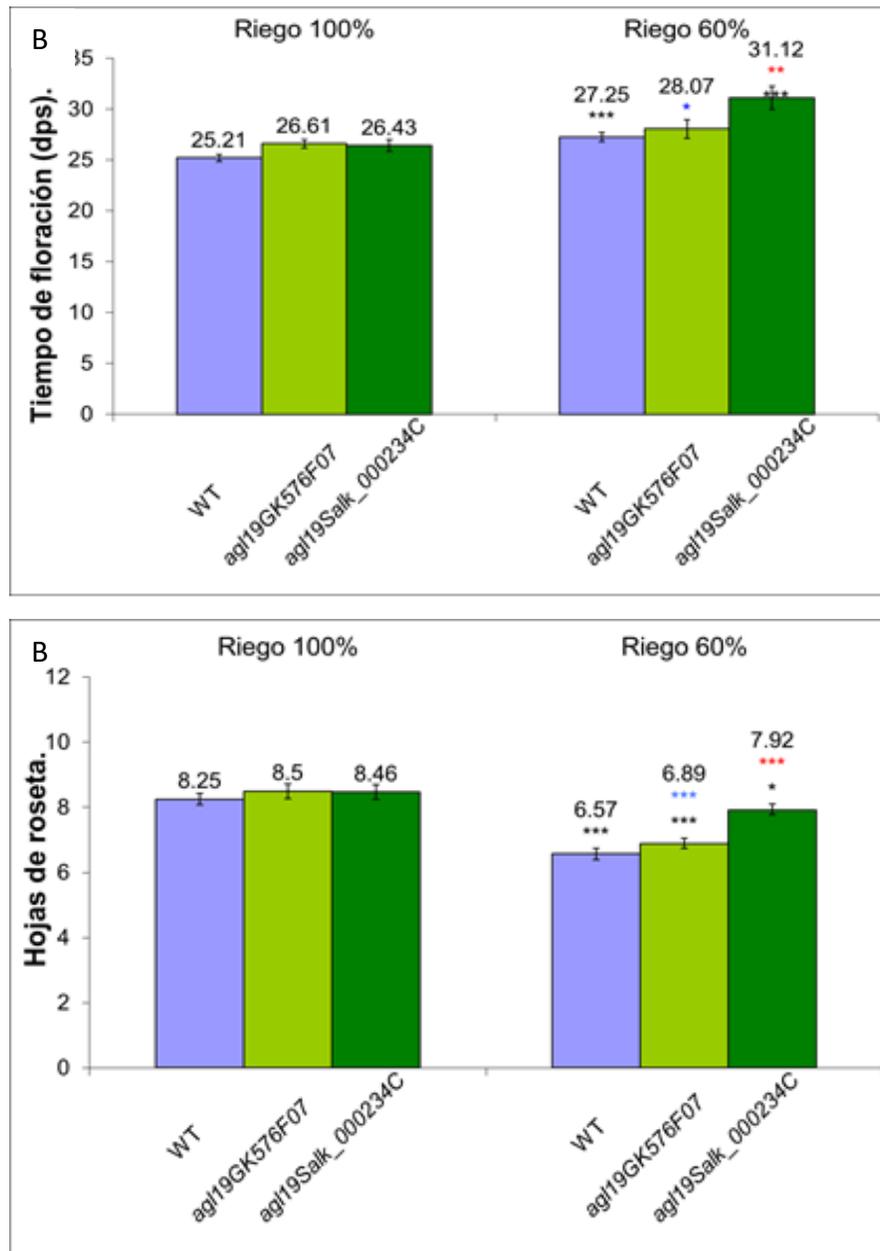


Figura 15: Retraso del tiempo de floración de *agl19* en estrés hídrico. A) *agl19* (Salk_000234C) tardó más días en florecer que las plantas silvestres (WT) y *agl19* (GK576F07). B) en el mismo sentido el número de hojas producidas al momento de la floración fue mayor en las plantas *agl19* (Salk_000234C) que en los otros genotipos. Las diferencias significativas se obtuvieron con prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos, * (en azul) son las diferencias entre alelos, * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 26-28$ plantas)

Para verificar si existen diferencias en los transcritos de *AGL19* entre los 2 alelos analizados, se realizó una RT-PCR semicuantitativa. Se observó que el transcrito completo de *AGL19* no se encuentra en ninguno de los alelos (Figura 16A), pero cuando se amplificó el extremo 5' del RNA por arriba del sitio de la inserción, se encontró que, tanto la banda correspondiente a exones como un *splicing* alternativo que incluye el intrón 2 del gen, se expresan más fuertemente en el alelo GK579F07 que en el alelo Salk_000234 (Figura 16B). Lo que posiblemente puede explicar las diferencias en el fenotipo de floración observado.

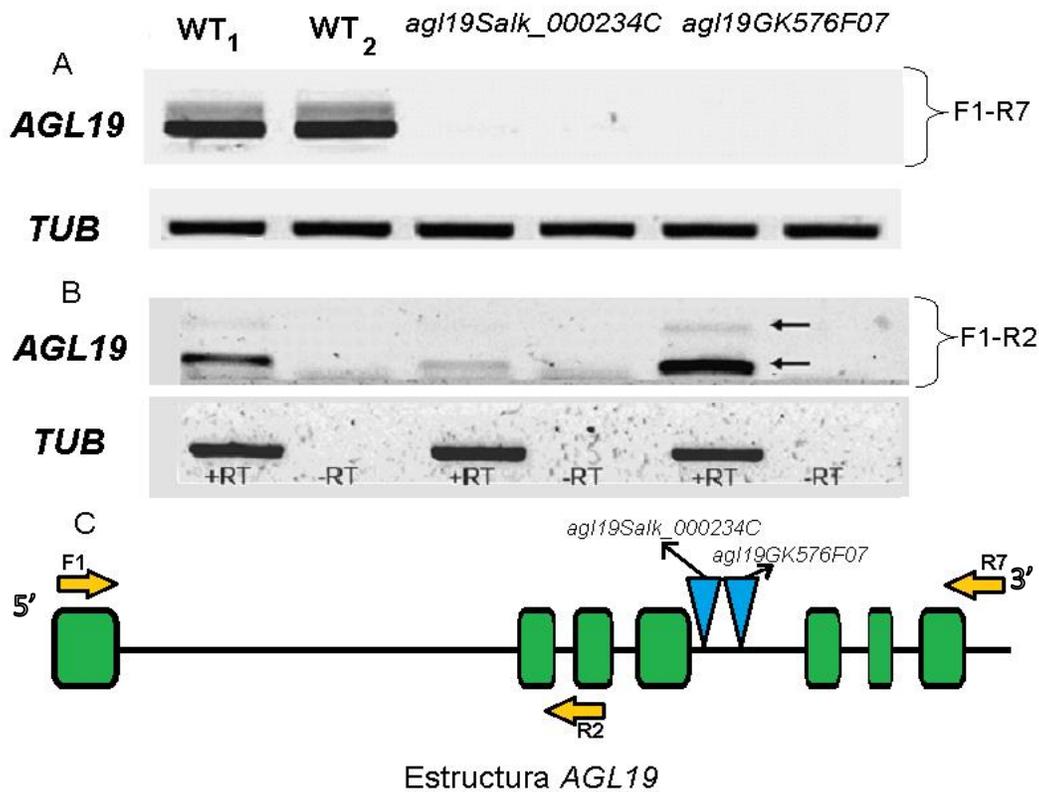
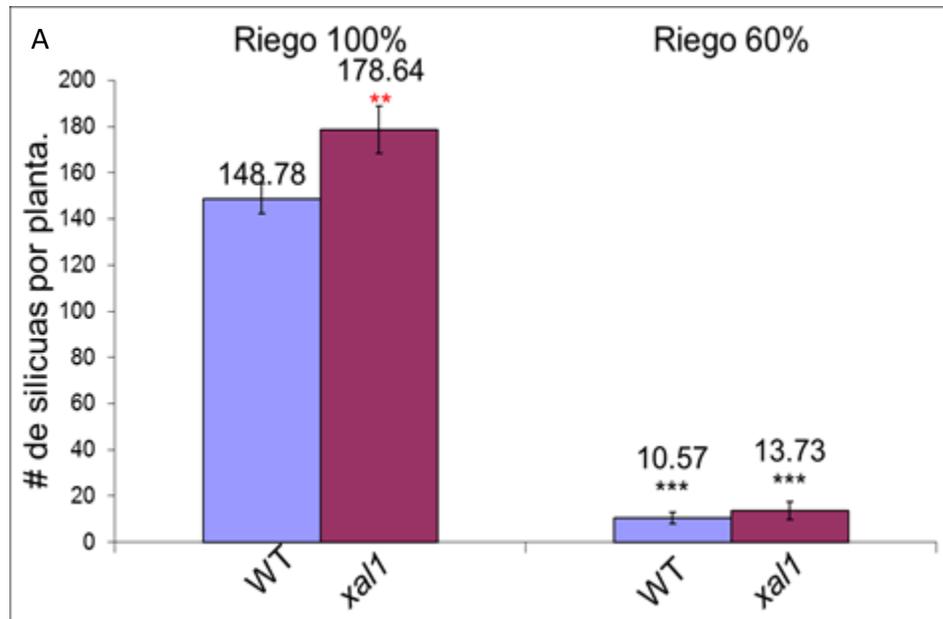


Figura 16: A) Ensayo de RT-PCR en el que se muestra que no hay expresión del mRNA completo de *AGL19* (primers F1 y R7) en ambos alelos mutantes Salk_00234 y GK576F07. El alelo GK576F07 tiene al menos una forma de *splicing* alternativo de *AGL19*. En este ensayo donde sólo se amplificó el extremo 5' (primers F1 y R2) se muestran controles sin reverso-transcriptasa (-RT) para demostrar que las bandas observadas provienen del RNA y no del DNA (B). La *TUBULINA* (*TUB*) se utilizó como control de carga en ambos geles. En C) se muestra la estructura del gen, el sitio de ambas inserciones y la localización de los oligonucleótidos.

Efecto de la sequía en la descendencia de plantas silvestres, *xal1* y *agl19*

Para determinar los efectos de la sequía en la descendencia, se midieron y cuantificaron las silicuas producidas por las plantas silvestres y mutantes. En las plantas silvestres ambos parámetros mostraron una disminución bajo condiciones de sequía, siendo el número de silicuas el más afectado (Figura 17).

En condiciones control las plantas *xal1* son capaces de producir un mayor número de silicuas que las plantas silvestres (Figura 17A). Este dato es interesante, ya que se desconoce el papel de *XALI* en la fructificación. De igual forma, *XALI* regula negativamente el tamaño de las silicuas producidas en condiciones de sequía, ya que las plantas *xal1* son capaces de producir silicuas más grandes que las plantas silvestres (Figura 17B).



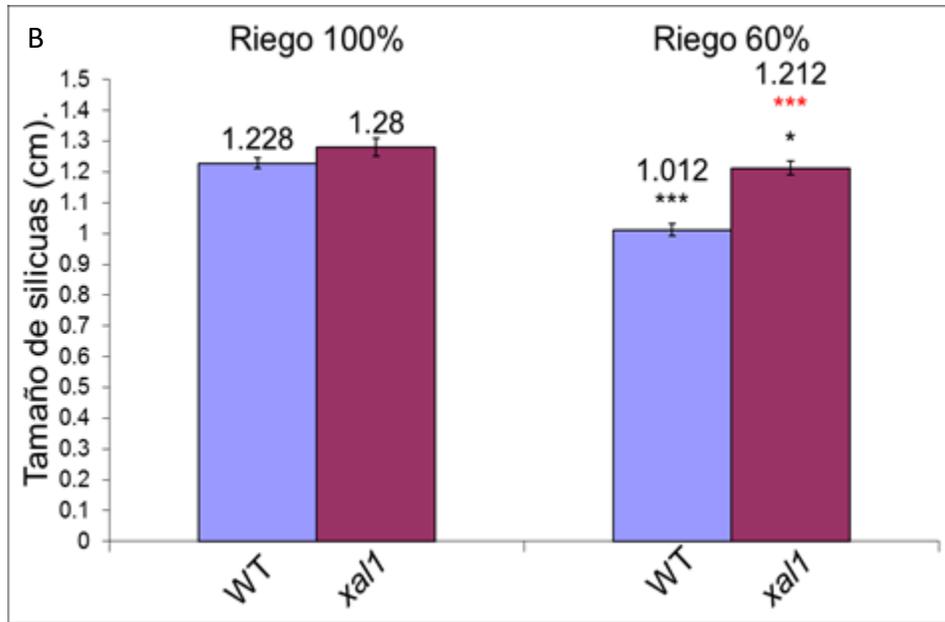


Figura 17: Efecto del estrés hídrico en el número y tamaño de las silicuas. A) En el mutante *xal1* se producen más silicuas en condiciones control, pero en sequía las plantas silvestres y *xal1* producen de forma similar muy pocas silicuas. B) En sequía, las plantas *xal1* tienen silicuas más largas que las plantas silvestres. Las barras indican error estándar y las diferencias significativas se obtuvieron con la prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos, * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 14-28$ plantas).

De forma interesante, cuando se analizó al mutante en *AGL19* (Salk_00234) en comparación con las plantas silvestres, se encontró que el mutante es capaz de producir mayor número de silicuas y más grandes que las plantas silvestres, pero esto solamente en condiciones de sequía (Figura 18). Los que nos indica que *AGL19* actúa como un regulador negativo durante la fructificación en condiciones de sequía.

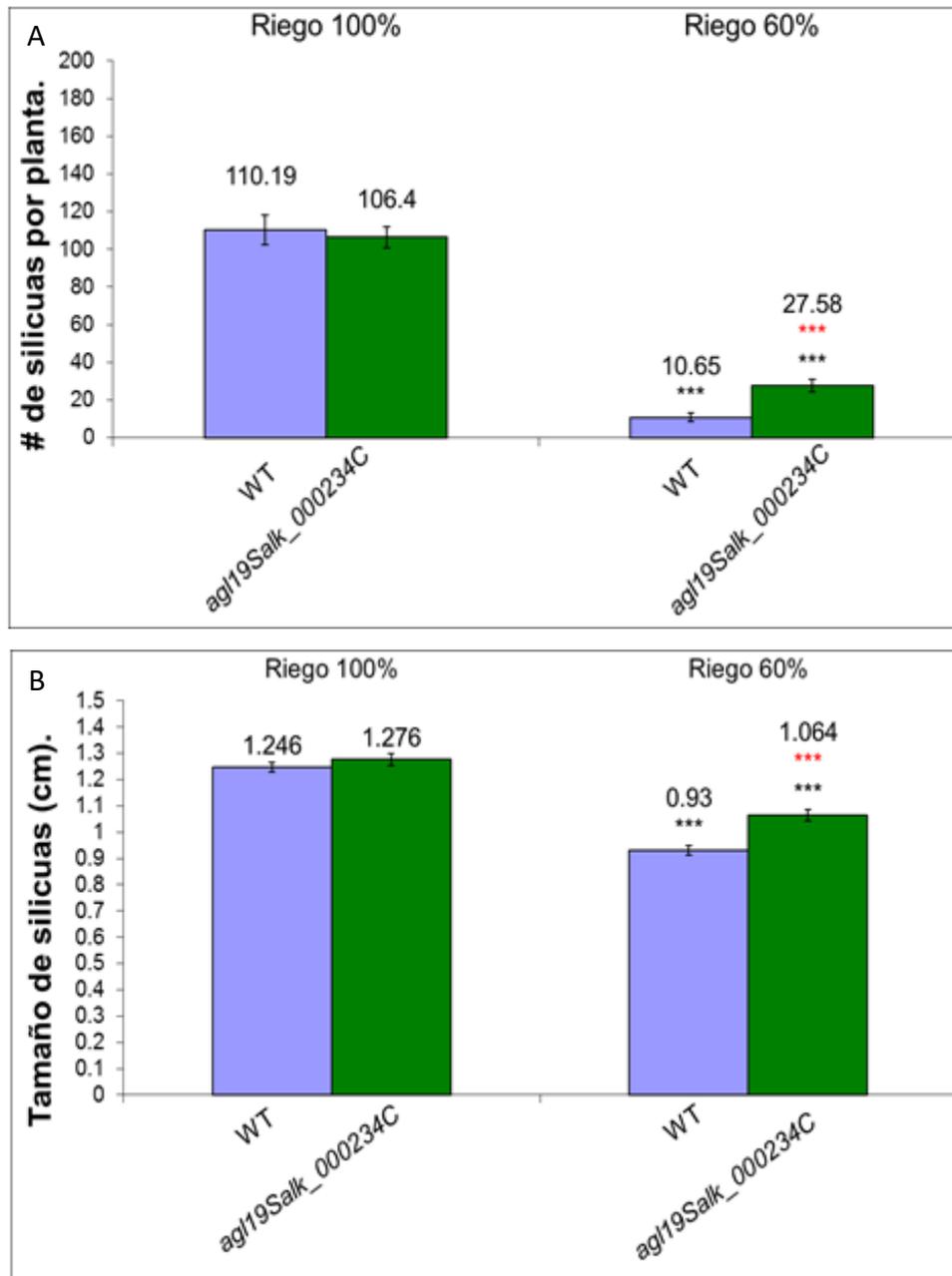


Figura 18: En sequía, *AGL19* reprime la producción y tamaño de silicuas. A) Las plantas *agl19* (Salk_000234C) producen mayor número de silicuas en sequía. B) Las silicuas del mutante *agl19* son significativamente más grandes que las de las plantas silvestres en estrés hídrico. Las diferencias significativas se obtuvieron con la prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos, * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 14-28$ plantas).

El retraso del tiempo de floración en las plantas silvestres causado por la sequía parece no causar un aumento en la descendencia, ya que la cantidad y el tamaño de las silicuas se redujo drásticamente (Figuras 17 y 18). Sin embargo, el retraso en la floración aumenta en cierta medida la producción de semillas en los mutantes, por lo que es posible que *XAL1* y *AGL19* sean parte de la red de regulación que modula tanto el tiempo de floración y la producción de semillas en respuesta al estrés por sequía.

Efecto de la sequía en el desarrollo vegetativo de plantas silvestres, *xall* y *agl19*

Los efectos de la sequía en el tiempo de floración son sutiles, pero su efecto es claro al desacelerar el desarrollo vegetativo (Figura 19A y B). Cuando se obtuvo el área de las rosetas desde etapas tempranas de la aplicación del estrés, se observó en todos los casos, que el estrés hídrico redujo el crecimiento vegetativo (Figura 19). Sin embargo, es interesante notar que la magnitud de la reducción en el crecimiento de la roseta es proporcionalmente menor en las plantas *xall* crecidas en estrés hídrico con respecto a las bien irrigadas (Figura 19C), mientras que *agl19* se comportó de forma muy similar a las plantas silvestres (Figura 19D).

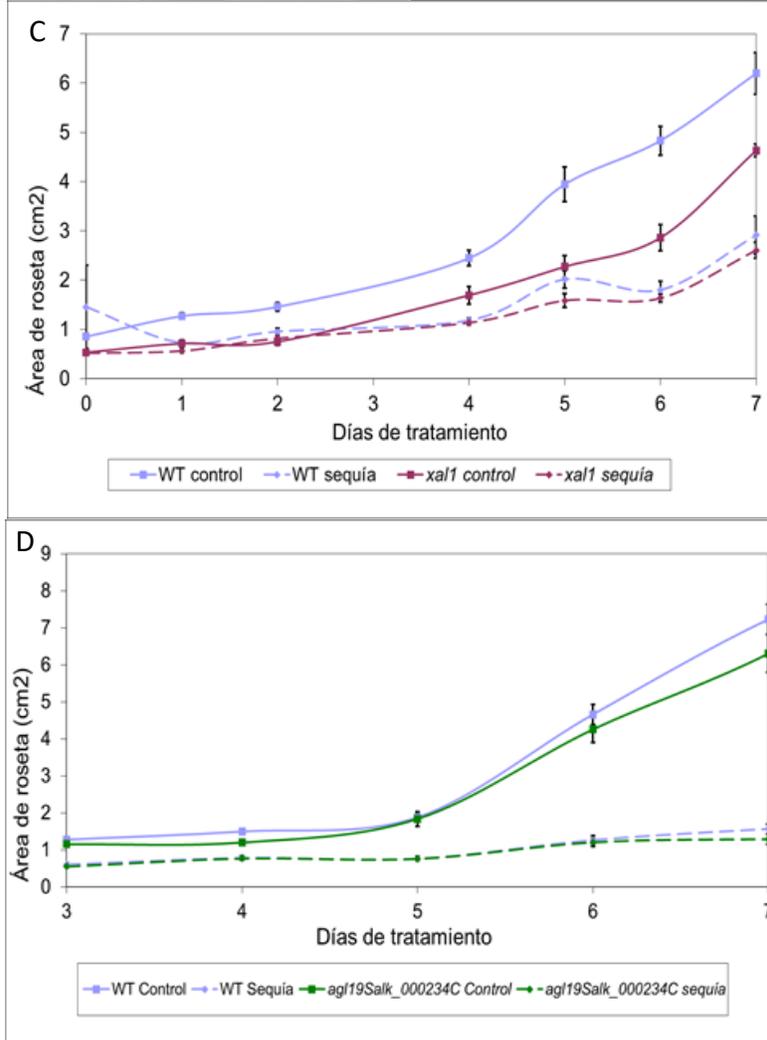
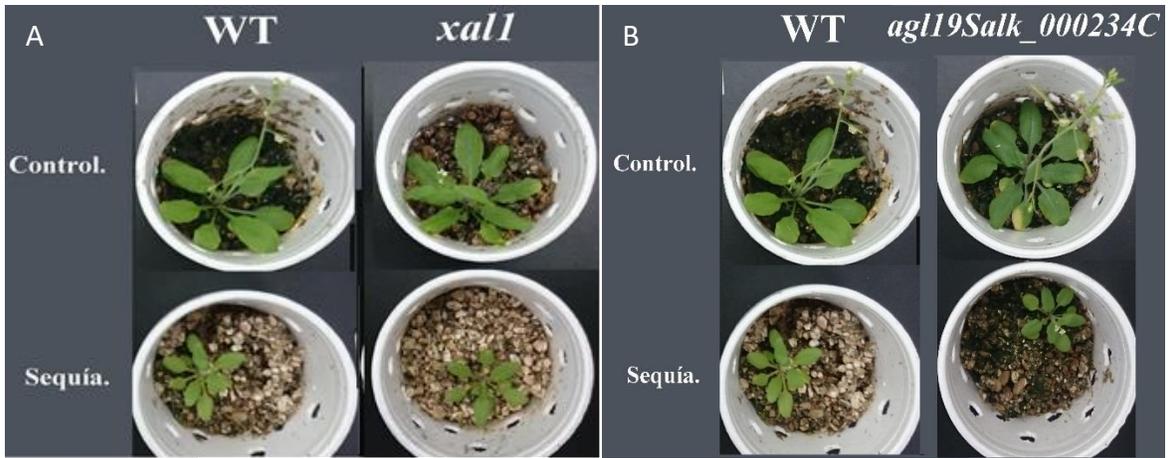


Figura 19: La sequía afecta negativamente el crecimiento vegetativo. A y B) La sequía redujo el área de la roseta en todos los genotipos. C) Proporcionalmente las plantas *xal1* se ven menos afectadas por el estrés hídrico que las plantas silvestres (WT). D) *agl19* tiene un comportamiento similar a las plantas WT cuando están bien irrigadas y en sequía. Las barras indican error estándar; n = 10-15 plantas.

Efecto de la salinidad en el tiempo de floración de las plantas silvestres, *xal1* y *agl19*

Al igual que lo observado previamente con el estrés hídrico, el estrés salino también retrasó la floración de las plantas silvestres (Figura 20A) y de forma similar, no hubo la concomitante producción de hojas como uno esperaría (Figura 20B). *xal1* tuvo un fenotipo de floración tardía en salinidad con respecto a las plantas *xal1* bien irrigadas, sin embargo, se mantuvo la misma proporción de este retraso con respecto a las plantas silvestres en ambas condiciones de crecimiento (Figura 20A). Por lo que, una vez más, el fenotipo preponderante es el de floración tardía debido al fotoperiodo de día largo. Estos resultados nos indican que *XAL1* no participa en la regulación del tiempo de floración en respuesta al estrés osmótico, o bien esas pequeñas diferencias pueden deberse a la redundancia funcional con otros MADS-box.

Previamente se observó que *agl19* (Salk_000234) tuvo una floración tardía en respuesta a la sequía (Figura 15), por lo que este alelo se usó para observar la respuesta del tiempo de floración de las plantas en condiciones de salinidad. Los resultados muestran que las plantas *agl19* (Salk_000234) siguieron el mismo patrón observado en las plantas silvestres: un retraso leve en el tiempo de floración y una reducción en la producción de hojas de roseta (Figura 20), este resultado indica que *AGL19* participa en la regulación del tiempo de floración en sequía, pero no en salinidad, sugiriendo que tiene una función específica en dicho proceso.

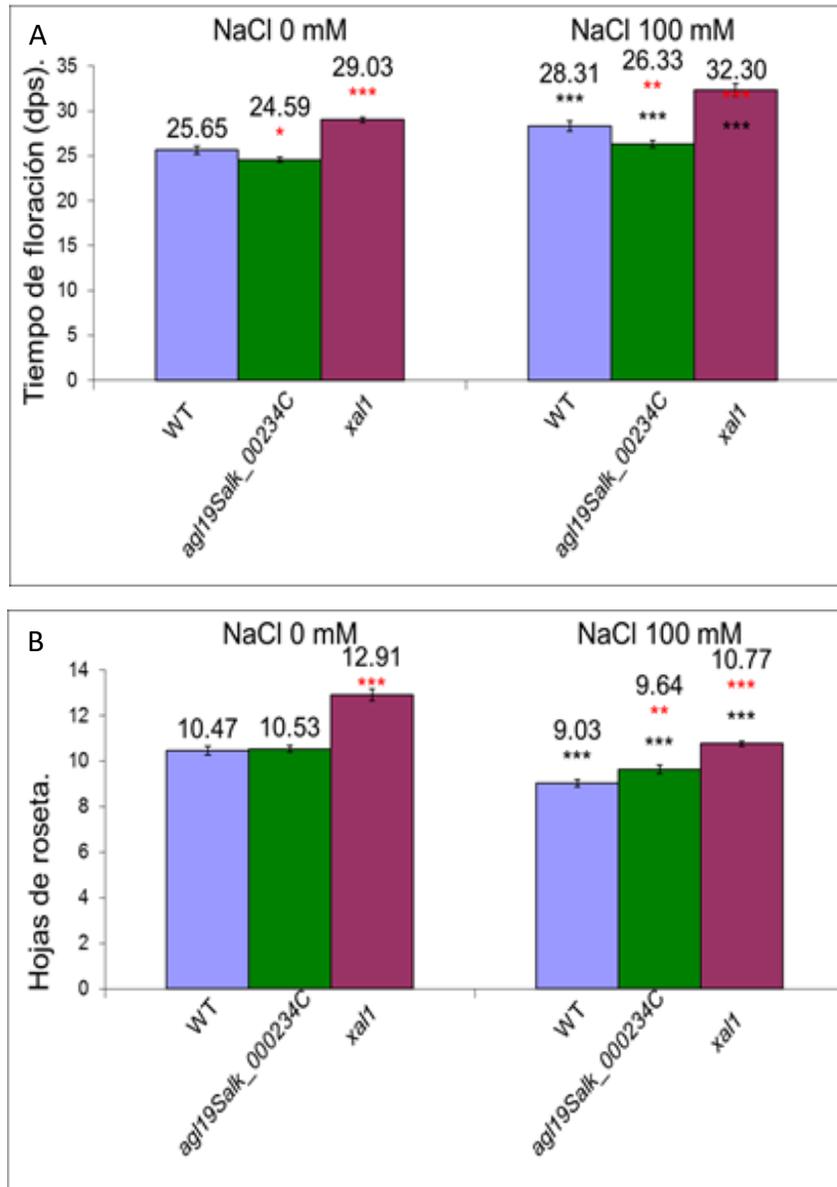


Figura 20: Efecto del estrés salino en la floración. A) El riego con NaCl 100 mM causó un retraso en el tiempo de floración de todas las plantas con respecto a las plantas control. Sin embargo, ese retraso fue proporcional al observado en las plantas silvestres (WT) para todos los genotipos analizados. B) Todas las plantas produjeron menos hojas de roseta en salinidad. Las barras representan el error estándar, las diferencias significativas se obtuvieron con una prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 13-33$ plantas)

Efecto de la salinidad en la descendencia de plantas silvestres, *xal1* y *agl19*

Al igual que en la sequía, la producción de silicuas se vio fuertemente afectada en salinidad (Figura 21). Es interesante ver que nuevamente las plantas *xal1* son capaces de producir silicuas más grandes que las plantas silvestres en la condición control, pero sobre todo bajo el estrés (Figura 21B), lo cual nos indica cierta resistencia. Por otra parte, el número de silicuas en condiciones de salinidad no es significativamente diferente que la observada en plantas silvestres (Figura 21A). Esto pudiera indicar que *XAL1* participa en el desarrollo de la silicua mas no en su producción bajo condiciones de salinidad.

Las plantas *agl19* no mostraron una diferencia en el tiempo de floración con respecto a las plantas silvestres (Figura 20), ni tampoco en la producción y tamaño de las silicuas (Figura 21), cabe aclarar que el dato mostrado en la figura 21A donde existe una menor producción de silicuas en las plantas *agl19* en condiciones control se pensó que se pudo deber a que las plantas tuvieron algún estrés, por lo que se repitió el experimento en condiciones control y se observó que las plantas *agl19* producen un número similar de silicuas que las plantas silvestres (dato no mostrado). Este resultado confirma que el efecto observado de *AGL19* podría ser específico para el estrés hídrico.

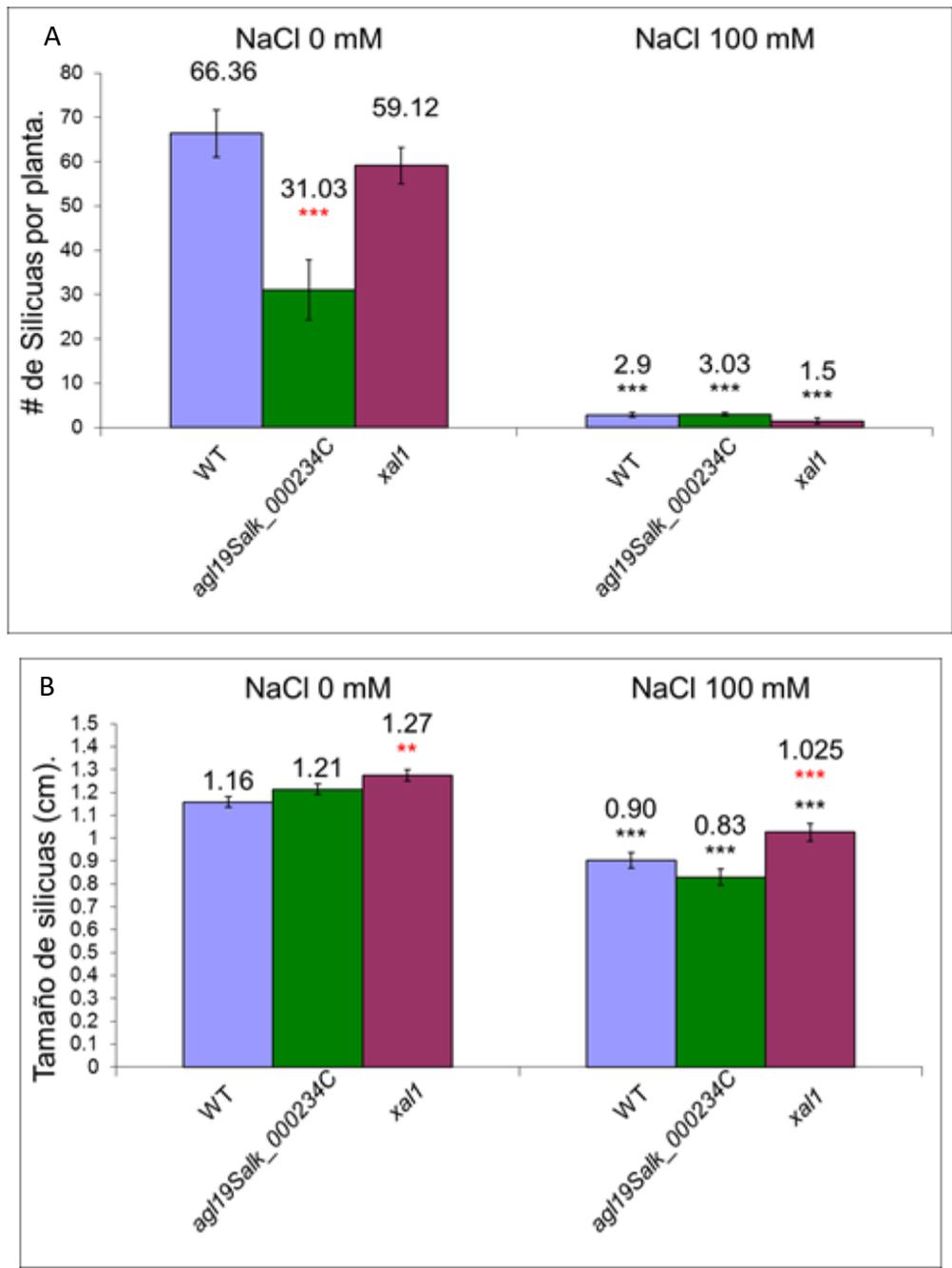
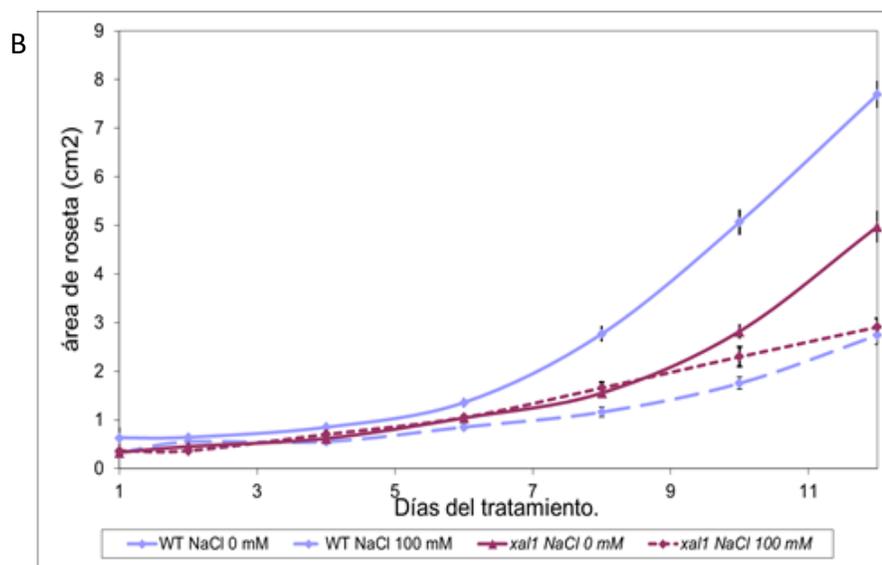


Figura 21: La salinidad disminuyó fuertemente el número (A) y el tamaño de las silicuas (B). Las plantas *xal1*, mostraron resistencia al estrés al ser capaces de producir silicuas más grandes (B). Las diferencias significativas se obtuvieron con prueba de t de una cola. * (en rojo) son las diferencias entre genotipos, * (en negro) son las diferencias entre tratamientos (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; $n = 13-34$ plantas).

Efecto de la salinidad en el desarrollo vegetativo de plantas silvestres, *xal1* y *agl19*

El efecto del estrés salino en el desarrollo vegetativo es evidente en todos los genotipos analizados (Figura 22A). En la Figura 22B y C, se observa cómo al inicio el crecimiento de las plantas sometidas al riego con NaCl 100 mM no tienen una disminución tan drástica como en sequía, pero conforme avanza el tratamiento se hace más evidente. Las plantas *xal1*, una vez más, mostraron menor afectación por el estrés comparadas con las plantas sin tratamiento (Figura 22B).



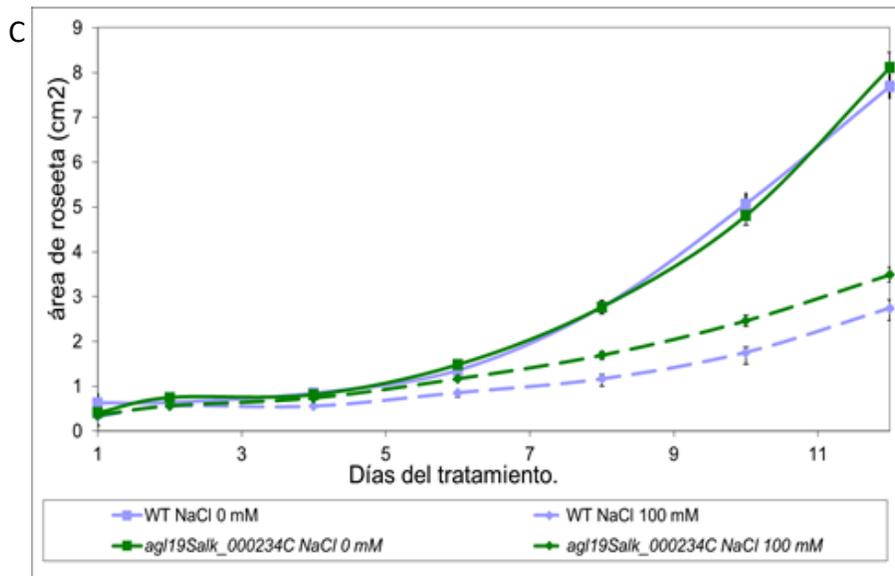


Figura 22: A) El crecimiento de la roseta disminuyó al someter las plantas WT, *xall* y *agl19* (Salk_000234C) a riego con NaCl 100 mM. B) El efecto es menos notorio en plantas *xall* en comparación con las plantas WT. C) Las plantas WT y *agl19* tienen un crecimiento similar en la condición control y en estrés salino. Las barras representan error estándar (n = 10-20 plantas).

Discusión

Plasticidad del tiempo de floración en respuesta al estrés hídrico y salino

La transición a la floración es un proceso altamente regulado que coordina las señales ambientales con las señales fisiológicas y del desarrollo de la planta. De esto depende, en parte, el éxito reproductivo de las plantas. Por ejemplo, en aquellas plantas con polinización cruzada, las plantas que florecen simultáneamente dentro de la misma población elevan la probabilidad de fertilización. En el caso de *Arabidopsis thaliana* que se autopoliniza, las condiciones ambientales están relacionadas con el éxito en la viabilidad de la descendencia y por lo tanto la floración se da en condiciones propicias para su desarrollo, por ejemplo: el fotoperiodo de día largo, el aumento de la temperatura en primavera y la suficiencia en los recursos energéticos (*i.e.* la trehalosa), condiciones importantes que permiten sustentar la floración y la posterior producción de semillas (Eskins, 1992; Johanson *et al.*, 2000; Blázquez *et al.*, 2003; Seo, 2009; Kumar *et al.*, 2012; Fornara y Coupland, 2009; Wang, 2009; Corbesier *et al.*, 1998; Wahl, 2013; Blázquez *et al.*, 1998; Domalgaska *et al.*, 2010; D'Aloia *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Cuando las plantas son sometidas al estrés hídrico, la primera respuesta es evadirlo mediante la reducción del potencial de la raíz, pero si el estrés persiste, la planta ajusta su metabolismo, principalmente reduciendo la fotosíntesis, para llegar a un uso eficiente del agua (Bray, 1997). Algunos estudios en diferentes especies de plantas muestran que la floración se induce en respuesta a la sequía, evadiendo así el estrés y asegurando la reproducción antes de que el estrés aumente e impida por completo el desarrollo de la planta (Tabla 1; Wada y Takeno, 2010).

Al parecer también existe esta evasión en la floración en *Arabidopsis* la cual es mediada por GI, una proteína que induce la transición a la floración por fotoperiodo de día largo y por estrés hídrico (Riboni *et al.*, 2013). Sin embargo, durante el estrés salino lo que se observa es un retraso en la floración de las plantas silvestres (Ryu *et al.*, 2014). En los resultados del presente trabajo se encontró que el estrés hídrico y salino retrasan el tiempo de floración, pero el número de las hojas de roseta se mantiene igual o incluso disminuye en las plantas sometidas a estrés (Figuras 12, 14, 15 y 20). Cabe señalar que en los trabajos previos (Riboni *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2014), sólo consideraron el parámetro de número de hojas de roseta al momento de la floración, pero no el número de días post-siembra. Por lo tanto, nuestros resultados del número de hojas concuerdan con los datos publicados para sequía (Riboni *et al.*, 2013) pero no así con los publicados para salinidad (Ryu *et al.*, 2014). Una posible explicación a la menor producción de hojas de roseta observada bajo estos dos tipos de estrés, es que, *Arabidopsis* (ecotipo Columbia) reasigna los recursos para que el meristemo apical aéreo transite al estado reproductivo, mientras que el crecimiento vegetativo cesa por la restricción de la fotosíntesis y por esto el tiempo de floración, en términos de número de hojas, es un parámetro que nos indica una floración temprana, mientras que los días indican una floración tardía, ya que la restricción de recursos causada por los diferentes tipos de estrés aumenta el tiempo en el que se generan los recursos necesarios para sustentar la floración. Aun así, no tenemos una explicación a la discrepancia entre nuestros datos y los de Ryu y col. (2014), a menos que se deba a las diferencias metodológicas entre los trabajos.

Las implicaciones biológicas del ajuste del tiempo de floración, ante condiciones de sequía o salinidad, podrían estar enfocadas a que la planta florezca pese a la restricción en

sus recursos. Es probable que la respuesta observada en *Arabidopsis* se vea orientada a florecer pese al estrés, debido a que es una especie con un ciclo de vida corto que se reproduce rápidamente (Fornara y Coupland, 2009; Wang *et al.*, 2009), lo que nos lleva a pensar que ante una situación que podrían llevar a la muerte de *Arabidopsis*, esta priorice su reproducción. En plantas perennes con un ciclo de vida largo, la respuesta ante la sequía o salinidad tal vez podría estar dirigida a mantener un crecimiento vegetativo tal que permitiera tener la cantidad óptima de recursos energéticos para sostener la producción de semillas más eficientemente, y de ser así podría existir una diferencia entre las estrategias que mantienen la reproducción dependiendo de la historia de vida de cada planta.

Como se expuso en el párrafo anterior, la plasticidad del tiempo de floración ante la sequía o la salinidad, podría depender de la fenología y características biológicas de las plantas, pero es evidente que existe una respuesta en el proceso de la floración ante el estrés hídrico o salino. Cabe destacar que tanto la sequía como la salinidad causaron la misma tendencia en el tiempo de floración de *Arabidopsis* e incluso la misma intensidad (Figuras 12, 14, 15 y 20), lo que nos puede hablar de que la señal que propició una floración tardía y una menor producción de hojas es común para ambos tipos de estrés. Si bien la sequía desarrollada en este trabajo implica un estrés más constante que la salinidad, la cual aumenta su intensidad en el tiempo, es posible que el estímulo responsable del tiempo de floración bajo estas condiciones se de en etapas tempranas de la aplicación del estrés, lo que podría explicar el por qué se observa la misma respuesta del tiempo de floración en ambas condiciones.

***AGL19* como regulador positivo de la transición a la floración en respuesta a sequía**

Los MADS-box regulan diversos procesos del desarrollo en las plantas, entre los cuales se encuentra la floración (Smyth, 1995; Lee *et al.*, 2000; Álvarez-Buylla *et al.*, 2000; Simpson, 2004; Shönrock *et al.*, 2006; Tapia-López *et al.*, 2008; Amasino, 2010; Torti y Fornara, 2012; Smaczniak *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Balanza *et al.*, 2014; Pérez-Ruiz *et al.*, 2015). Sin embargo, se desconocía si tienen alguna función en la floración en respuesta al estrés. Para ahondar en dicho papel se llevó a cabo el análisis de las bases de datos de microarreglos, con las que se analizó si la expresión de algunos genes MADS-box que participan en floración, también podía variar en respuesta al estrés osmótico, hídrico o salino (Tabla 4). Para este trabajo se analizó el fenotipo de *xal1* y *agl19*, aunque no se pueden descartar otros genes como *FUL* y *XAL2* que también se inducen por este tipo de estrés abiótico (Tabla 4).

Después de ver los tiempos de floración (en días y número de hojas) de los mutantes, los resultados indican que *XALI* no modula la transición a la floración en respuesta a sequía (Figura 14) o salinidad (Figura 20). En cambio, se observó que es necesario de *AGL19* para inducir la floración en condiciones de estrés hídrico (Figura 15) y no así en salinidad, ya que el fenotipo de floración de las plantas *agl19* sigue el mismo comportamiento que las plantas silvestres (Figura 20). Este resultado sugiere que a pesar de que la señal inductora de la floración puede ser similar en ambos tipos de estrés, o que la respuesta en el tiempo de floración sea muy parecida entre ambos tipos de estrés, el estrés salino, además de la disminución del agua, impone un estrés iónico (Hirt, 2010; Huang *et al.*, 2012) y por lo tanto la respuesta ante este tipo de estrés, puede afectar el tiempo de

floración por otra vía independiente de *AGL19*, es decir que existe especificidad a nivel de la regulación transcripcional, dependiendo del estrés que se trate.

En los microarreglos analizados, *AGL19* es regulado positivamente por el estrés osmótico y salino, pero sorprendentemente no por sequía (Tabla 4), aunque es importante notar que los datos de los microarreglos se obtienen en periodos cortos de tiempo, máximo 24 horas, por lo que es posible que se requiera de un tiempo prolongado del estrés hídrico para que se induzca su expresión. Como se pudo observar en los ensayos de floración, sólo en sequía el mutante *agl19* (Salk_000234) tiene un fenotipo de floración tardía con respecto a las plantas silvestres (Figura 15). *AGL19* induce la floración en vernalización, durante el cual se eliminan las marcas epigenéticas que reprimen a *AGL19* permitiéndole a las plantas florecer (Shönrock et al., 2006), por lo tanto, es factible que un proceso similar ocurra durante la sequía. De hecho, durante la vernalización existe una disminución progresiva del agua disponible, generando un estrés hídrico.

AGL19 induce la expresión de *LFY* y *API* (por mecanismos aún desconocidos), para poder inducir la floración en respuesta a la vernalización (Shönrock et al., 2006). En el futuro será interesante establecer si *AGL19* tiene blancos similares en la red de regulación de la transición a la floración ante estímulos como la vernalización y la sequía.

El papel del tiempo de floración en la descendencia bajo condiciones de sequía y salinidad

Para que las plantas puedan florecer en estrés, es posible que se requiera de una reasignación de los recursos, lo que puede causar la disminución del desarrollo vegetativo, tal y como lo observamos (Figuras 19 y 22). Esta reasignación permite asegurar la

producción de descendencia como una estrategia para evadir el estrés antes de que las condiciones lleven a la muerte a la planta (Riboni *et al.*, 2013; Franks, 2011; Versules y Jurger, 2011). Sin embargo, nosotros no observamos que la disminución en el crecimiento de las plantas, así como el retraso en la transición a la floración en condiciones de sequía o salinidad, confiriera una ventaja en términos de la cantidad y tamaño de las silicuas producidas. Aun así, aunque la productividad bajo estrés no aumentó con respecto a las plantas sin tratamiento, si encontramos cierta mejora en los mutantes que retardan un poco más su floración con respecto a las plantas silvestres bajo estrés.

La fructificación es un proceso del desarrollo con una alta demanda de recursos energéticos, tanto para el desarrollo embrionario, como para que la semilla acumule substancias de reserva antes de la latencia (Baud *et al.*, 2002). Por lo anterior, es de esperarse que bajo estrés osmótico sea más difícil su desarrollo. Si bien el tiempo de floración bajo las condiciones de estrés no confirió ventaja aparente en términos cuantitativos de la producción de silicuas, es probable que la reasignación de recursos favorezca la viabilidad de las semillas producidas lo que podría verse culminado en semillas más aptas, con un mayor porcentaje de germinación. Para analizar esto, se podría comparar la germinación de las semillas producidas por plantas silvestres y el mutante *agl19* que produjo más vainas y de mayor tamaño que las plantas silvestres en estrés hídrico, transgeneracionalmente.

El papel de *XALI* en el desarrollo del fruto

Se sabe que *XALI* participa en procesos como el desarrollo de la raíz y la transición a la floración (Tapia-López *et al.*, 2008). En el presente trabajo, observamos que las plantas *xal1* producen silicuas más grandes, particularmente en estrés hídrico y salino.

Bajo condiciones de estrés no se observaron cambios en el tiempo de floración de las plantas *xal1* (Figuras 14 y 20), sin embargo, estas plantas fueron capaces de producir silicuas más grandes. Una posibilidad es que el desarrollo más lento de *xal1* (Figuras 19 y 22) le permita reasignar los nutrientes de forma más eficiente que las plantas silvestres. Otra posibilidad es que *XALI* sea un represor del desarrollo del fruto, de forma que le permita a la planta modular el tamaño de las silicuas, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes.

El tiempo de floración de las plantas *agl19* mejora la producción de silicuas en sequía

En el presente trabajo, encontramos que *AGL19* induce la floración en respuesta a la sequía, y la pregunta es si esto pudiera estar vinculado a la mayor producción de silicuas observada en el mutante.

Originalmente habíamos hipotetizado que si alguno de los genes MADS-box inducen la floración evadiendo el estrés, el retraso en la floración en los mutantes, permitiría una mayor producción de semillas. Esto podría ser cierto en el caso de *agl19* con respecto a las plantas silvestres crecidas en sequía, aunque como discutimos anteriormente la producción de silicuas no supera al de las plantas bien irrigadas (Figura 18). Esto querría decir que, en plantas silvestres *AGL19* se puede requerir para limitar la producción de

silicuas en su número y tamaño bajo condiciones de sequía, y probablemente este papel sea importante para que las semillas tengan una mejor asignación de recursos, de tal forma que sean capaces de sobrevivir eficientemente.

Es importante indagar como *AGL19* modula el tiempo de floración y su relación en la producción de silicuas, ya que este MADS-box podría ser importante para integrar la percepción de condiciones ambientales adversas como la vernalización (Shönrock *et al.*, 2006) y la sequía (este trabajo) para modular procesos del desarrollo como la floración y la fructificación para brindar una ventaja a *Arabidopsis* bajo condiciones estresantes.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede observar que la forma en la que *Arabidopsis* responde ante un estrés hídrico o salino para afinar la reproducción es complejo, ya que ocurren cambios desde el desarrollo vegetativo, el tiempo de floración y la producción de silicuas. Es importante notar que en este trabajo se estudió una especie con un ciclo de vida corto la cual fue sometida a un estrés constante hasta el fin de su ciclo de vida, pero es muy posible que la compleja respuesta descrita para esta situación pueda variar en función de la especie analizada o de la duración e intensidad del estrés, lo que podría resultar en una gran variedad de estrategias encaminadas a mejorar la producción y adecuación de las semillas ante condiciones ambientales estresantes.

Conclusiones

- Las plantas silvestres de *Arabidopsis* (ecotipo Columbia) afrontan el estrés por sequía y salinidad retrasando el tiempo de floración. Sin embargo, se reduce drásticamente su crecimiento y la producción de silicuas.
- En condiciones de sequía *AGL19* induce la floración, mientras que *XALI* no afecta el tiempo de floración bajo este estrés.
- *AGL19* y *XALI* no regulan el tiempo de floración en condiciones de salinidad
- Es probable que *XALI* actúe como un regulador negativo del desarrollo de las silicuas en condiciones estresantes.
- *AGL19* regula negativamente la producción y el tamaño de silicuas en sequía.
- El fenotipo de floración tardía en plantas silvestres bajo condiciones de sequía y salinidad no confiere una ventaja en la producción de silicuas.
- Por lo observado en las plantas *xal1* y *agl19*, es posible que la floración tardía confiera una mejora en el tamaño de silicuas bajo condiciones de sequía.

Perspectivas

En el presente trabajo se montaron los sistemas de estrés hídrico y salino tales que permiten analizar el tiempo de floración y la descendencia. Dichas metodologías se pueden utilizar en el futuro para estudiar el tiempo de floración y la descendencia de diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* o también para el estudio de otros mutantes en genes MADS-box que participan en la floración.

Para ahondar en la participación de *AGL19* en el tiempo de floración y descendencia bajo condiciones de sequía, se podría analizar el fenotipo de plantas *35S::AGL19* bajo estas condiciones y también comparar la viabilidad de las semillas de las plantas silvestres y mutantes que crecieron bajo el estrés.

Para distinguir si el retraso en el tiempo de floración de las plantas crecidas en condiciones de estrés hídrico o salino tiene un efecto directo en la producción de silicuas, o si el efecto del estrés sobre la producción de semillas es independientemente del tiempo de floración, se requiere plantear una metodología donde el estrés al que se sometan las plantas sea temporal y una vez que las plantas florezcan se elimine el estrés, manteniéndolas en las condiciones control hasta el final del experimento.

Bibliografía

- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Chouhuet H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J. and Harberd N. (2006). Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals. *Science*, **311**: 91-94.
- Alvarez-Buylla E., Liljegren S., Pelaz S., Gold S., Burgeff C., Ditta G., Vergara-Silva F. and Yanofsky M. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal*, **24**: 457-466
- Alvarez-Buylla E., Benítez M., Corvera-Poiré A., Cador Á., de Folter S., Gamboa de Buen A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-Miranda F., Pérez-Ruiz R., Piñeyro-Nelson A. and Sánchez-Corrales Y. (2010). Flower Development. *The Arabidopsis Book*, **8**: e0127. doi: 10.1199/tab.0127
- Amasino R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, **61**: 1001-1013.
- Andrés F. and Coupland G. (2012). The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews*, **13**: 627-639.
- Araus J., Slafer E., Reynolds M. and Royo C. (2002). Plant Breeding and Drought in C3 Cereals: What Should We Breed For?. *Annals of Botany*, **89**: 925-940.
- Apse, M., Aharon G., Wayne A. Snedden W. and Blumwald E. (1999). Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in *Arabidopsis*. *Science*, **285**: 1256-1258
- Balanzá V., Martínez-Fernández I. and Ferrándiz C. (2014). Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *Journal of Experimental Botany*, **65**: 1193-1203.
- Baud S., Boutin J., Miquel M., Lepiniec L. and Rochat C. (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 151-160.
- Blázquez M., Green R., Nilsson O., Sussman M. and Weigel D. (1998). Gibberellins promotes flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *The Plant Cell*, **10**: 791-800.
- Blázquez, M., Ahn J. and Weigel D., (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*, *Nature genetics*, **33**: 168- 171.
- Blum A., (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*, **112**: 119-123.

- Blümel M., Nadine Dally N. and Jung C.**, (2015). Flowering time regulation in crops-what did we learn from Arabidopsis?. *Current Opinion in Biotechnology* **32**:121–129.
- Boyer J. and Kramer P.** (1995). Water relations of plants and soil. *Academic Press*, U.S.A. 495 pp.
- Bray E.** (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, **2**: 48-54.
- Cain M., Bowman W. and Hacker S.** (2011). Ecology, 2a edición, *Sinauer Associates*, U.S.A., 648 pp.
- Capotilla G., Schmid M. and David Posé D.** (2014). Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*, **66**: 59-69.
- Chinnusamy V., Jagendorf A. and Zhu J.** (2005) Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science*, **45**: 437-448.
- Cline W.** (2008). Global Warming and Agriculture. *Finance & Development*, **45(1)**: 23-27.
- Corbesier, L., Lejeune P. and Bernier G.** (1998). The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta*, **206** : 131-137.
- D'Aloia M., Bonhomme D., Bouché F., Tamseddak K., Ormenese S., Torti S., Coupland G. and Périlleux C.** (2011). Cytokinin promotes flowering of Arabidopsis via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *the plant journal*, **65**: 972-979
- Dodd I. and William, D.** (2004). Hormones and the regulation of water balance, en: **Davies, P.**, Plant hormones biosynthesis, signal transduction, action!. *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands. págs. 519-548.
- Domagalska M., Sarnowska E., Nagy F. and Davis S.** (2010). Genetic Analyses of Interactions among Gibberellin, Abscisic Acid, and Brassinosteroids in the Control of Flowering Time in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, **5(11)**: e14012.
- Eskins, K.** (1992). Light-quality effects on Arabidopsis development. Red, blue and far-red regulation of flowering and morphology. *Physiologia plantarum*, **86**: 439-444.
- FAO** (2015) <http://www.fao.org/seeds/es/>
- Fornara, F. and Coupland G.** (2009). Plant phase transitions make a SPLash. *Cell*, **138**: 625-627.
- Franks, S., Sim S. and Weis A.** (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 1278-1282.

-**Franks, S.** (2010). Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*, *New phytologist*, **190**: 249-257.

-**Guo, H., Yang H., Mockler T. and Lin C.** (1998). Regulation of flowering time by Arabidopsis receptors. *Science*, **279**: 1360-1363.

-**Han, P., García-Ponce B., Fonseca-Salazar G., Alvarez-Buylla E. and Yu H.** (2008). *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a FT-independent photoperiod pathway. *The Plant Journal*, **55**: 253-265.

-**Hirt, H.** (2010). *Plant Stress Biology From Genomics to Systems Biology*, 1a reimpression, Wiley-Blackwell, Alemania. 274 pp.

-**Holl, F. & Heynhold, G.** (1842). *Flora von Sachsen*, **1**: 538

-**Huala, E. and Suxxes I.** (1993). Determination and cell interaction in reproductive meristems. *The Plant Cell*, **5**: 1157-1165.

-**Huang, G. Ma S., Bai L., Zhang L., Ma H., Jia P., Liu J., Zhong M. and Guo Z.** (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Bio Rep*, **39**: 969-987

-**Ivey, C. and Carr, D.** (2011). Test for the joint evolution of maintaining system and drought escape in *Mimulus*. *Ann. Bot. (Lond)*, **109**: 583-598.

-**Ji, H., Liu L., Li K., Xie Q., Wang Z., Zhao X. and Li X.** (2014). PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and outgrowth of lateral roots in wheat. *Journal of experimental Botany*, **65(17)**: 4863-4872.

-**Johanson, U., West J., Lister C., Michaels S., Amasino R. and Dean C.** (2000). Molecular Analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science*, **290**: 344-347.

-**Kardailsky, I., Shukla V., Ahn J., Dagenais N., Christensen S., Nguyen J., Chory J., Harrison M. and Weigel D.** (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, **286**: 1962-1965.

-**Kilian, J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weigl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. and Harte K.** (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*, **50**: 347-363.

-**Kim S., Kim S. and Park C.** (2007). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Planta*, **226**: 647-654.

-**Kim, W., Latrasse D., Servet C. and Zhou D.** (2013). Arabidopsis histone deacetylase HDA9 regulates flowering time through repression of AGL19. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **432**: 394-398.

-**Komeda, Y.** (2004). Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**: 521-35.

-**Kreps, J., Wu Y., Chang H., Zhu T., Wang X. and Harper J.** (2002). Transcriptome changes for arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, **130**: 2129-2141.

-**Kumar S., Lucyshyn D., Jaeger K., Alós E., Alvey E., Harberd N. and Wigge P.** (2012) Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, **484**: 242-245.

-**Kwon Y., Park M., Kim S, Baldwin I. and Park C.** (2014) Alternative splicing and nonsense-mediated decay of circadian clock genes under environmental stress conditions in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, **14**: 136

-**Lee H., Suh S., Park E., Cho E., Ahn J., Kim S., Lee J., Kwon Y. and Lee I.** (2000). The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, **14**: 2366-2376.

-**Mauseth, J.** (2014) Botany: an introduction to plant biology 5th edition. *Jones & Bartlett Learning*. U.S.A. 696 pp.

-**McClung, R.** (2006) Plant circadian rhythms. *The Plant Cell*, **18**: 792-803.

-**Meyerowitz, E. and Somerville, C.** (1994) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America, 1300 pp.

-**Mizoguchi T., Wright L., Fujiwara S., Cremer F., Lee K., Onouchi H., Mouradov A., Fowler S., Kamada H., Putterill J. and Coupland G.** (2005). Distinct roles of GIGANTEA in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **17**: 2255-2270.

-**Money N.** (1989) Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols. *Plant Physiol.* **91**: 766-769.

-**Pérez-Ruiz R., Berenice García-Ponce B., Marsch-Martínez N., Ugartechea-Chirino Y., Villajuana-Bonequi M., de Folter S., Azpeitia E., Dávila-Velderrain J., Cruz D.,**

Garay-Arroyo G., Sánchez M., Estévez J. and Álvarez E. (2015) *XAANTAL2 (AGL14)* Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Molecular Plant*, **8**: 796-813

-Riboni M., Galbiati M., Tonelli C. and Conti L. (2013). *GIGANTEA* enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1*. *Plant Physiology*, **162**: 1706-1719.

-Ryu J., Park C. and Seo P. (2011). The floral repressor BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) modulates flowering initiation under high salinity in Arabidopsis. *Mol. Cell.*, **32**: 295-303.

-Ryu J., Leea H., Seo P., Jungc J., Ahnd J. and Parka C. (2014). The Arabidopsis floral Repressor BFT Delay Flowering by Competing with FT for FD Binding, under High Salinity. *Molecular Plant*, **7(2)**: 377-287.

-Sánchez D., Garay-Arroyo A., Sánchez M., Estévez-Palmas J. and Álvarez-Buylla E. (2015). *XAANTAL2 (AGL14)* Is an Important Component of the Complex Gene Regulatory Network that Underlies Arabidopsis Shoot Apical Meristem Transitions. *Molecular Plant*, **8**: 796-813

-Sawa M. and Steve K. (2011). *GIGANTEA* directly activates Flowering Locus T in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, **18(28)**: 11698-11703.

-Shönrock N., Bouveret R., Leroy O., Borghi L., Köhler C., Grissem W. and Hennig L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator *AGL19* in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes & Development*, **20**: 1667-1678

-Seo E., Lee H., Jeon J., Park H., Kim J., Noh Y. and Lee I. (2009). Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene *SOC1* and its upstream negative regulator *FLC*. *The plant cell*, **21**: 3185-3197.

-Sherrad M. and Maheranli H. (2006). The adaptive significance of drought escape in *Avena barbara*, an annual grass. *Evolution*, **60**: 2478-2489.

-Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58(2)**: 221-227.

-Simpson G. (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**: 570-574.

-Skirycz A., De Bodt S., Obata T., De Clercq I., Claeys H., De Rycke R., Andriankaja M., Van Aken O., Van Breusegem F., Fernie A. and Inzé D. (2010). Developmental stage specificity and the role of mitochondrial metabolism in the response of Arabidopsis leaves to prolonged mild osmotic stress. *Plant Physiology*, **52**: 226-244.

- Smaczniak C., Immink R., Angenent G. and Kaufmann K.** (2012). Developmental and evolutionary diversity of plant MADSdomain factors: insights from recent studies. *Development*, **139**: 3081-3098.
- Smyth D.** (1995). Origin of the cauliflower. A mutant gene that is responsible for generating cauliflower-like heads in the model laboratory plant *Arabidopsis* has been cloned, and the same gene has been shown to be mutant in edible cauliflowers. *Current Biology*, **5(4)**: 361-363.
- Srikanth A. and Schmid M.** (2011). Regulation of flowering: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life science*, **68**: 2013-2037.
- Sung S. and Amasino R.** (2004). Vernaliation and epigenetics: how plants remember winter. *Current opinion in plant biology*, **7**: 4-10.
- Tapia-López R., García-Ponce B., Dubrovsky J., Garay-Arroyo A., Pérez-Ruíz R., Kim S., Acevedo F., Pelaz S. and Alvarez-Buylla E.** (2008). An AGAMOUS-related MADS-Box gene, *XALI (AGL12)*, regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **146**: 1182-1192.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2010). Plant physiology. 5th Edition. *Sinauer associates*. U.S.A. 782 pp.
- Tocquin P., Corbesier L., Havelange A., Pieltain A., Kurtem E., Bernier G. and Périlleux C.** (2003). A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, **3**: 2.
- Tocquin P., Ormenese S., Pieltain A., Detry N., Bernier G. and Périlleux C.** (2006). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to long-term CO₂ enrichment and nitrogen supply is basically a matter of growth rate adjustment. *Physiologia Plantarum*, **128**: 677-688.
- Torti S. and Fornara F.** (2012). AGL24 acts in concert with *SOC1* and *FUL* during *Arabidopsis* floral transition. *Plant signaling and Behavior*, **7**: 1251-1254
- van der Weele C., Spollen W., Sharp R. and Baskin T.** (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany*, **51(350)**: 1555-1562.
- Verslues P. and Juenger T.** (2011). Drought, metabolites, and *Arabidopsis* natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**: 240-245.
- Wada K. and Takeno K.** (2010). Stress-induced flowering. *Plant Signaling and Behavior*, **5(8)**: 944-947.

-**Wang J., Czech B. and Weigel D.** (2009). miR156-Regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, **138**: 738-749.

-**Wang Y., Li L., Ye T., Lu Y., Chen X. and Wu Y.** (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, **64**(2): 675-684.

-**Wahl V., Ponnu J., Schlereth A., Arrivault S., Langenecker T., Franke A., Feil R., Lunn J., Stitt M. and Schmid M.** (2013). Regulation of flowering by Trehalose-6-Phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **339**: 704-707.