



*EFECTOS GENÉTICOS Y MEDIO
AMBIENTALES EN LA ESTRUCTURA
FENOTÍPICA DE ANTIRRHINUM*

*Técnicas Avanzadas en Investigación
Agrario y Alimentario*

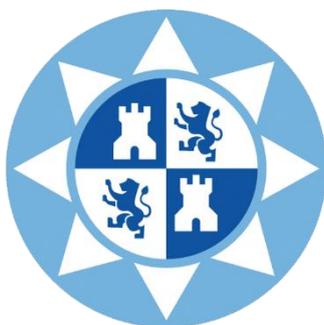


Autora: Raquel Alcantud Rodríguez

Directora: Julia Weiss

Co-director: Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Cartagena (2020)



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y
BIOTECNOLOGÍA AGRARIA**

Tesis doctoral

**EFFECTOS GENÉTICOS Y MEDIO AMBIENTALES EN LA
ESTRUCTURA FENÓTÍPICA DE *ANTIRRHINUM***

Raquel Alcantud Rodríguez

Directora: Dra. Julia Weiss

Co-director: Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Cartagena, 2020

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. Francisco de Asís Artés Hernández, Presidente de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Efectos genéticos y medio ambientales en la estructura fenotípica de *Antirrhinum*”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D^a. Raquel Alcantud Rodríguez, bajo la dirección y supervisión de la Dra. Julia Weiss y del Dr. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines.

En reunión de la Comisión Académica, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director/a de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

- ✓ Evaluación positiva del plan de investigación y documento de actividades por el Presidente de la Comisión Académica del programa (**RAPI**).

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ✓ Ciencias
Ciencias Sociales y Jurídicas
Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a _10__de___JUNIO_ de 2020

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

Fdo:  FRANCISCO DE ASÍS|
ARTÉS|HERNÁNDEZ
2020.06.12 12:18:17
+02'00'

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

*Para Antonio y mis hijos,
Raquel, Antonio, Marcelo, José y Marcos.*

INDICE GENERAL

RESUMEN	15
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	23
1.- LA PLANTA MODELO “ <i>ANTIRRHINUM MAJUS</i> ”	23
1.1.- Botánica, origen y distribución	
1.2.- Espacio fenotípico en el género <i>Antirrhinum</i>	
2.- CONTROL SOBRE EL TAMAÑO Y NÚMERO DE ÓRGANOS LATERALES COMO BASE DE LA PLASTICIDAD FENOTÍPICA	26
2.1.- Control genético sobre el tamaño de órganos laterales en plantas	
2.2.- Control ambiental sobre el tamaño de órganos laterales en plantas	
2.3.- Control sobre el número de órganos laterales en plantas	
3.-CONTROL SOBRE CARACTERÍSTICAS FLORALES	35
3.1. Control sobre características relacionados con la interacción flor- polinizador	
3.2. Control sobre características relacionados con el valor ornamental	
4.- REVELACIÓN DE REDES REGULADARES DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE ANÁLISIS TRANSCRIPTOMICO	41
OBJETIVOS	55
CAPÍTULO 1 – Mantenimiento de meristemas, rutas de auxinas, ácido jasmónico y ácido abscísico como mecanismo para la plasticidad fenotípica en <i>Antirrhinum majus</i> 57	
1.1.- Resumen	57
1.2.- Introducción.....	58
1.3.- Material y Métodos	60
1.4.- Resultados	63
1.5.- Discusión	73
1.6.- Referencias	77
1.7.- Información suplementaria.....	80
CAPÍTULO 2 – Los rasgos florales de importancia ornamental y reproductiva son sensibles a la temperatura en <i>Antirrhinum majus</i>	85
2.1.- Resumen.....	85
2.2.- Introducción.....	85
2.3.- Material y Métodos.....	89
2.4.- Resultados	92
2.5.- Discusión.....	103
2.6.- Referencias	108
2.7.- Información suplementaria.....	112

CAPÍTULO 3 – Mecanismos genéticos controlando efectos de estrés de temperatura sobre características florales en *Antirrhinum majus*

Respuesta transcriptómica de la flor de <i>Antirrhinum majus</i> a estrés por temperatura .	115
3.1.- Resumen.....	115
3.2.- Introducción.....	116
3.3.- Material y Métodos	119
3.4.- Resultados y Discusión	121
3.5.- Conclusión.....	131
3.6.- Referencias	132
3.7.- Información suplementaria.....	135

COMUNICACIONES A CONFERENCIAS	138
AGRADECIMIENTOS.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Mutantes en el tamaño floral de <i>Antirrhinum majus</i>	25
Figura 2. Representación esquemática del flujo de trabajo para el análisis de la expresión génica diferencial.....	44

Capítulo 1

Figura 1. Cinética de crecimiento de plantas control y plantas en hacinamiento.....	65
Figura 2. Análisis cuantitativo de expresión de genes involucrados en el mantenimiento de meristemos, división celular y polaridad de órganos en meristemos de inflorescencias bajo condiciones de hacinamiento.....	67
Figura 3. Vías biológicas basadas en GO con un aumento significativo en la expresión génica en plantas en hacinamiento. .	69
Figura 4. Análisis cuantitativo de expresión de genes implicados en la señalización y síntesis de auxina, JA y de ABA.	71
Figura 5. Análisis filogenético de AmJAZ1 y AmMYB21.	72
Figura S1. Análisis filogenético de AmTAR2.....	81
Figura S2. Análisis filogenético de <i>A.majus</i> OPCL1	82

Capítulo 2

Figura 1. Estadios de floración de <i>Antirrhinum majus</i> línea 165E. Rango de estadios de floración desde –IV (antes de la apertura de la flor) hasta es estadio V (día 5 después de la apertura de la flor).	90
Figura 2. Vista frontal, posterior y lateral de las flores de <i>Antirrhinum majus</i> mantenidas durante el desarrollo de inflorescencia a temperaturas bajas, altas y estándar, así como la aparición de células de pétalos cónicas y planas.	93

Figura 3. Contenido total de antocianinas en pétalos de flores de <i>Antirrhinum majus</i> cultivadas en temperatura baja, alta y estándar..	93
Figura 4. Diagrama de caja y bigote del contenido de clorofila en hojas apicales, medianas y basal en condiciones estándar y en condiciones de temperatura alta y baja.	94
Figura 5. Peso fresco (g) de las flores de <i>Antirrhinum majus</i> mantenidas durante el desarrollo de inflorescencia en condiciones estándar en comparación con los regímenes de temperatura más alta y más baja.	95
Figura 6. Parámetros de la flor bajo temperaturas estándar, altas y bajas.	95
Figura 7. Análisis de componentes principales del peso floral y parámetros florales.	96
Figura 8. Diagrama de caja y bigote de la longitud del pedicelo en flores cultivadas en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura.	97
Figura 9. Diagrama de caja y bigote del número de flores en inflorescencias de <i>Antirrhinum majus</i> línea 165E en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura.	98
Figura 10. Porcentaje de viabilidad del polen en flores cultivadas en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura.	99
Figura 11. Emisión total de VOCs a los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, frío y calor.	101
Figura 12. Principales VOCs emitidos en los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, de frío y calor.	102
Figura 13. Comparación de principales VOCs emitidos frente a no emitidos en los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, de frío y calor.	103

Capítulo 3

Figura 1. Expresión de AmCYC3Da y AmH4 en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	123
Figura 2. Expresión de AmEXP and AmBPE en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	124
Figura 3. Expresión de AmANT en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	126
Figura 4. Expresión de AmCHS en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	127
Figura 5. Expresión de AmMIXTA en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	129
Figura 6. Expresión de AmBAMT en flores de <i>Antirrhinum majus</i> a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas.	130

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Genes involucrados en el control sobre el crecimiento a través de la proliferación celular en diferentes zonas de órganos laterales.....	29
Tabla 2. Genes involucrados en el control sobre el crecimiento a través la expansión celular en diferentes zonas de órganos laterales.....	30
Tabla 3. Ejemplos del efecto de diferentes condiciones medio ambientales sobre el tamaño de órganos laterales.....	32
Tabla 4. Ejemplos del efecto de diferentes factores de estrés abiótico y biótico sobre el número de órganos laterales	34

Capítulo 1

Tabla 1. Efecto del hacinamiento sobre el crecimiento vegetativo en <i>Antirrhinum majus</i>	64
Table 2. Comparación de parámetros florales entre plantas control y plantas crecidas en hacinamiento. Los valores representan milímetros.	66
Table 3. Los genes relacionados con la auxina en <i>Antirrhinum</i> y los cambios en el patrón de expresión bajo el hacinamiento	70
Tabla S1. Genes expresados diferencialmente y nivel de expresión diferencial en meristemas bajo condición de hacinamiento frente a plantas control (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726321/#S1)	80
Tabla S2. GO (gene ontology) términos de los genes con expresión diferencial significativa	80
Tabla S3. Información sobre cebadores usados para la PCR cuantitativa	83

Capítulo 2

Tabla 1. Análisis del área celular de pétalos de flores de <i>A.majus</i> bajo condiciones estándar, frío y calor.	96
Tabla 2. Parámetros de calidad de semillas – porcentaje de germinación y número y peso de semillas	99
Tabla S1. Niveles de significancia en las diferencias entre plantas cultivadas bajo temperatura estándar versus temperatura alta y baja con respecto a (A) clorofila en hojas (B) longitud de pedúnculo (D) viabilidad del polen (F) peso de flor (G) mediciones de parámetros florales112	

Tabla S2 Área integrada del pico y porcentajes relativos de VOCs emitidos por flores cultivadas bajo temperatura estándar, frío y calor.	113
---	-----

Capítulo 3

Table 1. Información sobre cebadores utilizados para la qPCR.....	120
---	-----

Tabla S1. Expresión relativa (ER) y niveles de significancia (valor p) de los genes <i>AmCYCD3a</i> , <i>AmH4</i> , <i>AmEXP</i> , <i>AmBPE</i> , <i>AmANT</i> , <i>AmCHS</i> , <i>AmMIXTA</i> y <i>AmBAM</i> en pétalos de <i>A. majus</i> a altas y bajas temperaturas frente a temperatura estándar y a 0 DAF frente a 3 DAF en base de comparación grupal con el programa REST (Pfaffl et al., 2002)	135
--	-----

Tabla S2. Expresión relativa (ER) y niveles de significancia (valor p) de los genes (<i>AmCYCD3a</i> , <i>AmH4</i> , <i>AmEXP</i> , <i>AmBPE</i> , <i>AmANT</i> , <i>AmCHS</i> , <i>AmMIXTA</i> y <i>AmBAM</i> en pétalos de <i>A. majus</i> a 0 DAF frente a 3 DAF a temperatura estándar, calor y frío en base de comparación grupal con el programa REST (Pfaffl et al., 2002).	135
--	-----

RESUMEN

El desarrollo de plantas está altamente afectado por las condiciones ambientales. El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos al estrés abiótico como temperatura, espacio, luz y sombra ha aumentado en los últimos años y se buscan estrategias biotecnológicas para conseguirlo. El cambio climático va a tener un gran impacto en la actividad agrícola y en la productividad de los ecosistemas orgánicos (Rosenzweig *et al.*, 2014). Las diferencias fenotípicas en *Antirrhinum majus* pueden revelar como se adapta y responde a un conjunto complejo de señales ambientales. Hoy nos enfrentamos a un desafío para mejorar las plantas y prepararnos para todos los cambios que ya se están produciendo, lo que exigirá multitud de esfuerzos de diferentes ciencias y conocimientos tradicionales y modernos.

Dependiendo de las circunstancias, las plantas muestran variabilidad en el desarrollo vegetativo y reproductivo. El grado de variabilidad parece depender de la plasticidad fenotípica de la especie y del órgano. El objetivo de esta tesis fue el análisis del nivel de plasticidad fenotípica de la especie *Antirrhinum majus* bajo diversas condiciones ambientales y el examen de la base génica de estos cambios. El crecimiento de plantas en condición de hacinamiento resulta en una situación de competencia intra-específica. Observamos que, bajo estas condiciones, *Antirrhinum majus* muestra un desacoplamiento entre el tamaño y número de los órganos laterales con una disminución en el tamaño de la hoja y un aumento en el número de hojas, mientras que las flores mantuvieron un tamaño robusto pero una reducción en el número. A pesar de estos cambios, el hacinamiento no pareció afectar determinados aspectos del desarrollo de los meristemas apicales de inflorescencia según lo indicado por la expresión estable de los genes *ROA*, *HIRZ* (mantenimiento de meristemo), *CYCD3a*, *CYCD3b*, *HISTONE H4* (ciclo celular) o *GRAM* (polaridad de órganos). Sin embargo, un análisis transcriptómico del tejido de meristemo de inflorescencia mostró una serie de genes sobre-expresados, pertenecientes a la ruta de síntesis y / o señalización de ácido jasmónico y abscísico (*AmJAZ1*, *AmMYB21*, *AmOPCL1* y *AmABA2*) mientras que genes implicados en la síntesis de auxinas no se vieron afectados (*AmTAR2*, *AmANT*). Basado en los resultados fenotípicos y transcriptómicos, proponemos la hipótesis de que el SAM robusto y una señalización de auxina estable permiten un tamaño floral homogéneo, mientras que los cambios en la señalización de JA y ABA pueden ser responsables de la disminución del tamaño de la hoja y del número de órganos laterales.

Un tamaño robusto de la flor es de gran importancia con respecto a la reproducción de la especie ya que afecta a la interacción flor-polinizador. Otras características florales que juegan un papel para la atracción de polinizadores, la propagación y también para el valor ornamental, incluyen el tamaño, la arquitectura, el color, la fragancia y la viabilidad del polen. Analizamos la plasticidad de estos caracteres en *Antirrhinum majus* en respuesta a temperaturas variables, un aspecto especialmente importante considerando el cambio en el clima global. La mayoría de los rasgos cambiaron en dirección opuesta dependiendo de si se aplicó el régimen de frío o calor. Mientras temperaturas bajas (15/5 °C) frente a temperaturas estándar (22/15 °C) produjeron una mayor pigmentación de pétalos, un aumento en el tamaño floral, una reducción en el número de flores y una mayor viabilidad del polen, las temperaturas altas (30/23 °C) resultaron en flores más pálidas y más pequeñas, un número de flores estable y una reducida viabilidad del polen. En ambos casos se observó tanto una reducción en la cantidad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs, volatile organic compounds) emitidos como cambios en el perfil de VOCs durante la apertura floral. Los resultados muestran que el nivel de plasticidad fenotípica depende del tipo de cambio ambiental. Mientras la condición de hacinamiento provoca cambios en el número pero no en el tamaño de flores, los cambios en temperatura si afectan el tamaño floral y, en caso de temperaturas bajas, también el número de flores. Estos cambios pueden, en combinación con las otras características florales, tener consecuencias de gran alcance tanto con respecto a la interacción planta-polinizador como para el valor ornamental de *Antirrhinum majus*.

Considerando los cambios en los caracteres florales anteriormente mencionados y teniendo en cuenta los resultados transcriptómicos bajo hacinamiento, analizamos la expresión de una serie de genes marcadores: del ciclo celular (*AmCYCD3a* y *AmH4*), de expansión celular (*AmEXP* y *AmBP*), señalización de auxinas (*AmANT*), síntesis de antocianinas (*AmCHS*), desarrollo de células cónicas (*AmMIXTA*) y síntesis del volátil metilbenzoato (*AmBAMT*). Mientras la expresión de genes que controlan la expansión no se alteró significativamente, *AmH4*, un marcador de síntesis de ADN, se regulaba negativamente a temperaturas más altas y más bajas, indicando un efecto de temperatura sobre la división celular y por lo tanto sobre el número de células. La producción de pétalos más grandes a temperaturas más bajas podría deberse a un mayor período de división celular. La pigmentación intensa de pétalos a bajas temperaturas se puede explicar por el aumento en la expresión de *AmCHS*, mientras que la reducida pigmentación a altas temperaturas no se vio relacionada con cambios en la expresión de

AmCHS, señalando a un efecto sobre enzimas de degradación de antocianinas. Las temperaturas adversas provocaron una disminución significativa en la expresión de *AmMIXTA*, un gen que controla la formación de células cónicas. Éstas juegan un papel en la atracción de polinizadores y en la producción de volátiles. El gen *BAMT* (*Benzoic acid Carboxymethyl Transferase*), involucrado en la síntesis de metibenzoato, uno de los principales compuestos de VOCs en *A. majus*, se expresa en células cónicas. Sin embargo, la expresión de *BAMT* no se alteró significativamente, indicando posibles cambios al nivel pos-traducciona1 de *BAMT* o en el flujo metabólico.

SUMMARY

Plant development is highly affected by environmental conditions. The interest in improving the tolerance of crops to abiotic stress such as temperature, space, light and shade has increased in recent years and biotechnological strategies are sought to achieve it. Climate change will have a great impact on agricultural activity and the productivity of organic ecosystems (Rosenzweig *et al.*, 2014). Phenotypic differences in *Antirrhinum majus* can reveal how it adapts and responds to a complex set of environmental signals. Today we face a challenge to improve plants and prepare for all the changes that are already taking place, which will require a multitude of efforts from different traditional and modern sciences and knowledge.

Depending on the circumstances, plants show variability in the vegetative and reproductive development. The degree of variability seems to depend on the phenotypic plasticity of the species and / or the organ. The objective of this thesis was to analyze the level of phenotypic plasticity of the species *Antirrhinum majus* under various environmental conditions and the examination of the genetic basis of these changes. The growth of plants under crowding conditions results in a situation of intraspecific competition. We observed that under these conditions, *Antirrhinum majus* shows a decoupling between the size and number of the lateral organs with a decrease in the size of the leaf and an increase in the number of leaves, while the flowers maintained a robust size but showed a reduction in the number.

Despite these changes, crowding did not appear to affect certain aspects of the development of the apical meristems as indicated by the stable expression of the genes *ROA*, *HIRZ* (meristem maintenance), *CYCD3a*, *CYCD3b*, *HISTONE H4* (cell cycle) or *GRAM* (organ polarity). However, a transcriptomic analysis of the inflorescence meristem tissue showed a series of overexpressed genes, belonging to the routes of synthesis and / or signaling of jasmonic and abscisic acid (*AmJAZ1*, *AmMYB21*, *AmOPCL1* y *AmABA2*) while genes involved in the synthesis of auxins were not affected (*AmTAR2*, *AmANT*). Based on the phenotypic and transcriptomic results, we propose the hypothesis that robust SAM and stable auxin signaling allows a homogeneous floral size, while changes in the signaling of JA and ABA may be responsible for the decrease in leaf size and the number of lateral organs.

A robust flower size is of great importance with respect to the reproduction of the species since it affects the flower-pollinator interaction. Other floral characteristics, which play a

role for pollinator attraction, propagation and also as ornamental value, include the size, architecture, color, fragrance and viability of the pollen. We analyzed the plasticity of these characters in *Antirrhinum majus* in response to variable temperatures, an especially important aspect considering the change in the global climate. Most features changed in the opposite direction depending on whether a cold or heat regime was applied. While low temperatures (15/5 °C) versus standard temperatures (22/15 °C) produced a stronger petal pigmentation, an increase in floral size, a reduction in the number of flowers and an increased pollen viability, high temperatures (30/23 °C) resulted in paler and smaller flowers, reduced pollen viability, while flower number was stable.

In both cases, a reduction in the amount of emitted volatile organic compounds (VOCs) was observed as well as changes in the VOC profile during the floral opening. The results show that phenotypic plasticity depends on the type of environmental change. While the crowding condition caused changes in the number but not in the size of flowers, changes in temperature affected the floral size and, in case of low temperatures, also the number of flowers. These changes may, in combination with the other floral traits, have far-reaching consequences both with respect to the plant-pollinator interaction and for the ornamental value of *Antirrhinum majus*.

Considering the changes in the floral characters mentioned above and taking into account the transcriptomic results under crowding condition, we analyzed the expression of a series of marker genes of the cell cycle (*AmCYCD3a* y *AmH4*), cell expansion (*AmEXP* y *AmBP*), auxin signaling (*AmANT*), anthocyanin synthesis (*AmCHS*), conical cell development (*AmMIXTA*) and the synthesis of the volatile methylbenzoate (*AmBAMT*). While the expression of genes that control cell expansion was not significantly altered, *AmH4*, a DNA synthesis marker, was downregulated at higher and lower temperatures, indicating a temperature effect on cell division and therefore on the number of cells. The production of larger petals at lower temperatures might be due to a longer period of cell division. Intense pigmentation of petals at low temperatures can be explained by the increase in *AmCHS* expression, while reduced pigmentation at high temperatures was not correlated with changes in *AmCHS* expression, pointing to a temperature control over anthocyanin degrading enzymes or other enzymes in the pathway.

Adverse temperatures caused a significant decrease in the expression of *AmMIXTA*, a gene that controls the formation of conical cells, which play a role in the attraction of pollinators and in the production of volatiles. The *BAMT* (Benzoic acid Carboxymethyl Transferase) gene, involved in the synthesis of methylbenzoate, one of the main VOC

compound in *A. majus*, is expressed in conical cells. However, the expression of *BAMT* was not significantly altered, indicating possible changes on the post-translational level of BAMT.

INTRODUCCIÓN

1.- LA PLANTA MODELO “*ANTIRRHINUM MAJUS*”

1.1.- Botánica, origen y distribución

Antirrhinum majus pertenece al Phylum: Magnoliophyta, Clase: Equisetopsida, Orden: Lamiales, Familia: Plantaginaceae. Es una planta perenne, normalmente de un tamaño de alrededor 50 cm, pero que puede alcanzar un tamaño de hasta 1 metro o más. Las hojas tienen una forma lanceolada típicamente de 2 a 6 cm de largo. Durante la fase vegetativa, las plantas muestran una filotaxis vegetativa doble decusada. Plantas silvestres poseen un tallo principal y varias ramas laterales.

La de floración en *A.majus* es inducida por días largos de forma facultativa, lo que significa que no requieren un fotoperiodo exacto antes de que se activen para florecer (Adams *et al.*, 2003). Las inflorescencias tienen una forma de espiga alargada. Las flores tienen un tamaño de 3 a 4.5 cm de largo, de forma zigomórfica, formando dos labios que se abren cuando los lados de la flor están comprimidos, de ahí viene el nombre común “boca del dragón”. El cambio de la fase vegetativa a la fase generativa se caracteriza por la aparición de entrenudos cortos y una filotaxis espiral (Mizzotti *et al.*, 2014). El primer gen requerido para el inicio de la vía de desarrollo floral es el gen *FLORICAULA (FLO)* (Bradley *et al.*, 1996b). Los órganos flores se dividen en sépalos, pétalos, estambres y un staminodium, y un pistilo. Cada flor está asociada con una bráctea, una hoja especializada. Mutantes homeóticos en el desarrollo floral tanto de *Arabidopsis* como de *Antirrhinum* han proporcionado conocimientos sobre los mecanismos reguladores moleculares del desarrollo de los órganos florales. El modelo ABC describe como tres genes actúan en dominios superpuestos para que cada verticilo tenga una combinación distinta de funciones genéticas, de esta manera controlando la identidad de órganos en cada espiral (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990; Coen *et al.*, 1991).

La mayoría de las plantas silvestres tienen flores de color púrpura rosado con áreas amarillas y blancas donde se tocan los dos labios. Las flores amarillas también se pueden encontrar en la naturaleza en los países mediterráneos, pero es más probable que sean cultivares naturalizados.

El género *Antirrhinum* es originaria de la región mediterránea desde Portugal en el oeste hasta Turquía y Siria en el este. El rango de distribución de este género se extiende hacia el sur en partes del norte de África y hacia el norte hasta el sur de Francia. *Antirrhinum majus* tiene su distribución natural en la zona de los Pirineos (Vargas *et al.*, 2009).

Antirrhinum sirve ya desde hace tres décadas como sistema modelo para la genética molecular y del desarrollo (Schwarz-Sommer *et al.*, 2003). Se identificaron varios genes florales clave por primera vez en *Antirrhinum*, incluido el gen que controla la forma de las células epidérmicas de pétalos (*MIXTA*) (Glover y Martin, 1998), genes que controlan el color de las flores (*ROSEA* y *VENOSA*) (Schwinn *et al.*, 2006), el gen *SLF*, una proteína F-box en el S-locus que confiere autoincompatibilidad (Lai *et al.*, 2002), y miembros de los factores de transcripción MADS (*DEFICIENS*, *GLOBOSA*) (Sommer *et al.*, 1990; Tröbner *et al.*, 1992) y TCP (*CYCLOIDEA*) (Luo *et al.*, 1996). La disponibilidad de transposones activos endógenos (*Tam1*, *Tam2*, *Tam3*, *Tam4* y *Tam11*) han contribuido a la identificación de genes florales homeóticos (Nacken *et al.*, 1991; Hehl *et al.*, 1991; Luo *et al.*, 1991). En 2019, se publicó un ensamblaje genómico casi completo de *A. majus* cultivar JI7 (*A. majus* cv. JI7), que comprende 510 Megabases (Mb) de secuencia genómica y que contiene 37,714 genes codificadores de proteínas anotados (Li *et al.*, 2019).

1.2.- Espacio fenotípico en el género *Antirrhinum*

Los ancestros más cercanos de *Antirrhinum majus* son nativos de la región del Mediterráneo occidental, principalmente la península Ibérica. El tradicional género *Antirrhinum* abarca un grupo monofilético con aproximadamente 28 especies y subespecies reconocidas y tradicionalmente asignadas a los tres subsecciones morfológicas o clados: Kicksiella, *Antirrhinum* y *Streptosepalum* (Webb, 1971; Sutton, 1988). Las especies evolucionaron de un ancestro común, probablemente en los últimos 4 millones de años (Gübitz *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2009). Aunque estas especies son morfológicamente diversas, polinizaciones artificiales entre todas las especies forman híbridos fértiles. Sin embargo, se propone que los híbridos retienen un fenotipo similar a uno de sus parentales mediante una selección simultánea en múltiples loci (Wilson and Hudson, 2011).

Existen varias filogenias descritas para el género *Antirrhinum* basadas en diferentes tipos de marcadores moleculares como genes de cloroplastos (Vargas *et al.*, 2009; Carrió and Güemes, 2014; Liberal *et al.*, 2014) el gen nuclear *CYCLOIDEA* (Gübitz *et al.*, 2003) o marcadores nucleares tipo AFLP (Wilson and Hudson, 2011). Otro análisis filogenético fue realizado basado en los perfiles de los volátiles emitidos por las flores, constituidos

por 24 principales compuestos. Los diferentes árboles filogenéticos coinciden en agrupar *A. meonanthum* y *A. braun-blanquetii* en un solo clado, separado del resto de las especies. Diferentes especies pueden coincidir en parámetros específicos como el color, el perfume o el tamaño floral. Sin embargo, actualmente no es posible inferir si los fenotipos similares podrían haber evolucionado varias veces dentro del género o si originan de ancestros comunes (Wilson y Hudson, 2011).

Un componente principal de variación entre especies es la variación en el tamaño de las hojas y los pétalos, dos parámetros positivamente correlacionados y dependiendo del mismo QTL (Feng *et al.*, 2009). Hojas y flores más grandes se encuentran en especies de la subsección *Antirrhinum*, que incluye *A. majus*. La subsección *Kickxiella* incluye especies con hojas y flores más pequeños e incluye *Antirrhinum charidemi*, endémico del desierto costero seco de Cabo de Gata en el sureste de España. Las hojas y flores de esta especie miden una décima de *A. majus*. Las dos especies de la subsección *Streptosepalum* tienen un tamaño intermedio entre las otras dos subsecciones (Rothmaler, 1956; Webb, 1971; Sutton, 1988; Feng *et al.*, 2009). Además de la variación de tamaño entre especies, también hay variaciones como resultado de mutaciones (Stubbe, 1966). Mutantes de *A. majus* exhaustivamente analizados y afectados en el tamaño floral incluyen *formosa*, *compacta*, *compacta ähnlich*, *Nitida*, *nana* y *Grandiflora* (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009a; Delgado-Benarroch *et al.*, 2009b; Schwarz-Sommer *et al.*, 2010).



Figura 1 Mutantes en el tamaño floral de *Antirrhinum majus* a) silvestres (derecho), *Nitida* (izquierda) b) tres (derecho), *Grandiflora* (izquierda) c) silvestres (derecho), *compacta* (izquierda).

Aunque las líneas de laboratorio de *A. majus* son autógamias, la polinización de insectos promueve los cruzamientos. Otros especies son alógamas y la autoincompatibilidad en *Antirrhinum* está controlado por el multi-alélico locus “S” (Xue *et al.*, 1996), que codifica una ribonucleasa llamada S RNasa, responsable del rechazo de polen por el pistilo. Por otro lado, la autoincompatibilidad en el polen depende de la expresión del gen “*Sp*”, una proteína F-box (Lai *et al.*, 2002). Especies alógamas de *Antirrhinum* incluyen *A.*

hispanicum, *A. glutinosum*, *A. molle* and *A. latifolium*. Los principales polinizadores de todos estas especies son abejas, debido a la necesidad de una cierta fuerza para abrir la corola cerrada (Vargas *et al.*, 2010). *Bombus terrestris* es el principal visitante, aunque existen otras interacciones especializadas. Existe una cierta discordancia entre el tamaño del insecto visitando flores de diferentes especies y el tamaño de la flor (Vargas *et al.*, 2010).

El espacio fenotípico del color de la flor en el género *Antirrhinum* varía entre magenta profundo en *Antirrhinum majus* debido a la síntesis del flavonoide “cianidina” en las vacuolas de células del pétalo (Glover y Martin, 1998) y flores amarillas debido a la síntesis del flavonoide “aurona” (Ono *et al.*, 2006) El primer paso en la síntesis del pigmento rojo depende del enzima chalcona sintasa, codificado por el gen *NIVEA* y la mutación en el locus *NIVEA* da como resultado plantas con flores blancas (Wienand *et al.*, 1982). Otros dos genes afectando la síntesis de pigmentos rojos en *Antirrhinum* son el locus *PALLIDA* (PAL), el gen regulador *DELILA* (DEL) (Almeida *et al.*, 1989) y los genes *ROSEA1*, *ROSEA2*, and *VENOSA* (Schwinn *et al.*, 2006) que afectan la intensidad y patrón de pigmentación floral. La síntesis de auronas está controlada por la expresión del gen aureusidin sintasa (*AmASI*), que codifica para la enzima clave en la biosíntesis de aurona a partir de chalcona (Ono *et al.*, 2006).

Con respecto al espacio fenotípico de los volátiles emitidos por flores de nueve especies diferentes, se observó que las diferencias no relacionan con vías específicas de síntesis, lo que indica un papel clave de los perfiles de olor como mezclas. Entre todas las especies se encontraron 75 VOCs diferentes. Mientras todas las especies emiten benzaldehído, acetofenona, ocimeno, y 2-etil-1-hexanol, los VOCs básicos del género *Antirrhinum*, otros VOCs son específicos de cada especie, como 1,4-dimethoxybenzeno en *A. braun-blanquetii* o nerolidol en *A. braun-blanquetii* y *A. latifolium* (Weiss *et al.*, 2016).

2.- CONTROL SOBRE EL TAMAÑO Y NÚMERO DE ÓRGANOS LATERALES COMO BASE DE LA PLASTICIDAD FENOTÍPICA

Tanto el tejido del tallo principal como los órganos aéreos laterales, hojas y flores y ramas laterales, se producen a partir del SAM (shoot apical meristem), que consiste en células no-diferenciadas con alta actividad mitótica. Los órganos laterales se forman a partir de primordios iniciados en el meristemo apical del tallo, a través de la división y expansión celular. En este proceso intervienen diferentes hormonas caracterizado por una bajada en

la señalización de citoquinina en el SAM, lo que permite la diferenciación, un aumento local de auxina que promueve el crecimiento (Reinhardt *et al.*, 2000), el control de crecimiento relacionado con la señalización de giberelinas (Araújo y Fernie, 2012) y la señalización de ácido jasmónico requerida para la maduración de la flor (Widemann *et al.*, 2016).

En la producción de primordios laterales en *Antirrhinum* están involucrados una serie de genes: *ROSULATA (ROA)*, el ortólogo de *WUSCHEL (WUS)* de *Arabidopsis*, con la función de mantener células no-diferenciadas en el centro quiescente, justo por debajo del SAM (Widemann *et al.*, 2016). El equilibrio entre células pluripotentes y células diferenciadas está controlado por el sistema de señalización por retroalimentación entre *WUS* y *CLAVATA3 (CLA3)* en *Arabidopsis* (Schoof *et al.*, 2000). En los meristemas de *Antirrhinum majus* se expresan los genes *HIRZINA (Hirz)* y *INVAGINATA (INA)*, genes homeóticos *KNOX* con similitud al gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* de *Arabidopsis*, con la función de mantener la identidad meristemática de las células en el SAM (Endrizzi *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001; Golz *et al.*, 2002). Otros genes meristemáticos son *GRAMINIFOLIA (GRAM)*, un factor de transcripción “Yabby” con la función de promover el crecimiento lateral y el destino celular abaxial y los genes *HISTONA H4, CICLINAD3A Y CICLINAD3B (H4, CYCD3A, CYCD3B)* que se expresan en el SAM y en órganos laterales y sirven como marcadores de la división celular (Gaudin *et al.*, 2000; Groot *et al.*, 2005).

Durante el crecimiento vegetativo, el SAM da lugar a las hojas y el tallo pero tras la transición a la floración, inducido por el gen *FLORICAULA (FLO)* en *Antirrhinum*, el ortólogo de *LEAFY* en *Arabidopsis*, el SAM se convierte en un meristemo de inflorescencia (MI) (Coen *et al.*, 1990). El MI puede desarrollarse de diferentes maneras, según la especie, para formar inflorescencias con diferentes arquitecturas. En especies como *Arabidopsis* y *Antirrhinum*, el meristemo apical es indeterminado (es decir, crece indefinidamente) y genera en su periferia meristemas laterales en forma de espiral que termina el desarrollo formando una flor, que resulta en una arquitectura de inflorescencia en espiga (Hake, 2008).

Los órganos laterales del mismo tipo dentro del mismo organismo pueden cambiar de tamaño y forma durante el desarrollo, una característica llamada heteroblástia (Costa *et al.*, 2012) El programa de desarrollo que conduce al tamaño final del órgano y el número de órganos tiene una cierta plasticidad y puede ser modulado por señales medioambientales, incluido el fotoperiodo, la temperatura y estrés abiótico. El grado de

plasticidad en el tamaño y el número de los órganos laterales parece ser determinado por una combinación de identidad de órgano, la especie en estudio y el tipo de condiciones ambientales.

2.1.- Control genético sobre el tamaño de órganos laterales en plantas

El crecimiento en órganos laterales empieza con divisiones celulares, seguido por un crecimiento basado en la expansión celular durante etapas de desarrollo más tardías (Reale *et al.*, 2002; Laitinen *et al.*, 2005; Anastasiou *et al.*, 2007; Kazama *et al.*, 2010). Tanto proliferación como expansión pueden ser afectados por condiciones de estrés, como estrés hídrico. Se ha demostrado en hojas de casava, que si este estrés persiste durante fases tardías del desarrollo, resulta en una disminución en el tamaño del órgano debido a una reducción en la división y no en la expansión de las células, indicando que la expansión es un proceso poco flexible (Alves y Setter, 2004).

La iniciación del desarrollo del órgano lateral requiere la activación local por auxinas. Inhibidores del transporte de auxinas inhiben la formación de hojas en *Arabidopsis* y el mutante *pin-formed1-1*, que confiere una mutación en una proteína de transporte de auxina, está bloqueado en la formación de flores en los ápices de inflorescencia (Reinhardt *et al.*, 2000).

Aguas abajo de la señal de auxina, la promoción de la proliferación celular depende de una cascada de actividades génicas, que empieza con la expresión del gen *ARGOS*, inducido por auxina. Las plantas transgénicas que expresan el cADN de *ARGOS* en sentido o anti-sentido muestran órganos aéreos agrandados o reducidos, respectivamente (Hu *et al.*, 2003). *ARGOS* a su vez aumenta la expresión de *AINTEGUMENTA*, un factor de transcripción *APETALA 2*. La pérdida de la función de *AINTEGUMENTA* reduce el tamaño de todos los órganos laterales al disminuir el número de células (Mizukami y Fischer, 2000). Silenciamiento y sobreexpresión de este gen en *Petunia* y *Antirrhinum* indican que este gen afecta tanto la división como la expansión celular y que la expresión difiere entre el tubo y limbo del pétalo (Manchado-Rojo *et al.*, 2014).

La sobreexpresión o silenciamiento de una serie de otros genes, identificado en diferentes plantas modelo, mostraron un papel en el control sobre el crecimiento a través de la proliferación celular en diferentes zonas de órganos laterales (Tabla 3.1).

Tabla 1. Genes involucrados en el control sobre el crecimiento a través de la proliferación celular en diferentes zonas de órganos laterales.

Nombre del Gen	Función	Planta
Genes que promueven la proliferación celular		
<i>GROWTH REGULATION FACTOR 5 (AtGRF5)</i> (Horiguchi <i>et al.</i> , 2005)	Factor de Transcripción. Su sobreexpresión induce la promoción y / o el mantenimiento de la actividad de proliferación celular en primordios de hoja.	Arabidopsis
<i>ANGUSTIFOLIA/GRF INTERACTING FACTOR 1 (AN3/GIF1)</i> (Horiguchi <i>et al.</i> , 2005)	Homologo del co-activador transcripcional humano <i>SYT</i> . Tiene efectos similares a <i>AtGRF 5</i> (Horiguchi <i>et al.</i> , 2005).	Arabidopsis
<i>JAGGED (JAG)</i> y <i>NUBBIN (NUB)</i> (Dinneny <i>et al.</i> , 2006)	Factores de transcripción tipo “Zinc-finger”, expresados en regiones de crecimiento de los órganos laterales. El doble mutante muestra fenotipos de crecimiento reducido en estambres, carpelos y hojas.	Arabidopsis
<i>ERECTA (ER)</i> y <i>ERECTA LIKE 1 y 2</i> (Shpak <i>et al.</i> , 2004)	“Receptor-like kinases”, involucrados en la comunicación entre células y la coordinación de crecimiento. Mutantes muestran una arquitectura densa de la inflorescencia.	Arabidopsis
<i>TARGET OF RAPAMYCIN (TOR)</i> (Menand <i>et al.</i> , 2002)	Involucrado en la señalización de luz y nutrición y la biogénesis de ribosomas. Está conservado en animales y eucariotas como gen central de coordinación.	Arabidopsis
<i>EPIDERMAL FACTOR PATTERNING LIKE 4 (EPLF4)</i> y <i>EPFL6/CHALLAH</i> (Uchida <i>et al.</i> , 2012)	Ligandos peptídicos, localizados en la epidermis. Interactúan con el retículo endoplasmático y afectan el desarrollo de la inflorescencia.	Arabidopsis
<i>KLUH (KLU)</i> (Anastasiou <i>et al.</i> , 2007; Eriksson <i>et al.</i> , 2010)	Un citocromo P450. Previene la detención prematura de la proliferación y mantiene la simetría de la flor.	Arabidopsis
<i>EBP 1</i> (Horváth <i>et al.</i> , 2006)	Homologo de ERBPB-3 EPIDERMAL GROWTH-FACTOR RECEPTOR-BINDING PROTEIN (EBP1) en humanos, una proteína nuclear de unión a dsRNA. Promueve la proliferación celular, influye en el umbral de tamaño celular antes de la división y acorta el periodo de actividad meristemática temprana durante el desarrollo del órgano.	Arabidopsis
Genes que reprimen la proliferación celular		
<i>CINCINNATA (CIN)</i> (Nath <i>et al.</i> , 2003)	Clase II de “TCP like genes”. Inhibe la proliferación de células en hojas pero lo promueve en pétalos.	<i>Antirrhinum</i>
<i>PEAPOD 1 and 2</i> (White, 2006)	El doble mutante muestra mayor proliferación interior en el margen de la hoja, dando lugar a hojas acampanadas.	Arabidopsis

microRNA miR396 (Rodríguez <i>et al.</i> , 2010)	Antagoniza el patrón de expresión del factor de transcripción <i>GRF</i> y se acumula preferentemente en las partes distales de la lámina de la hoja debido a la atenuación de la proliferación celular.	Arabidopsis
GRANDIFLORA (GRAF) (Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009b)	Limita la división celular en una manera específica del órgano (estambres y estilo)	<i>Antirrhinum</i>
AUXIN RESPONSE FACTOR2 (ARF2) (Schruff <i>et al.</i> , 2006)	Media la expresión génica en respuesta a la auxina y funciona en la detención del crecimiento.	Arabidopsis
BIG BROTHER (BB) (Disch <i>et al.</i> , 2006)	Una E3 ubiquitina ligasa. Limita el crecimiento de órganos florales y del tallo, restringiendo el periodo de crecimiento por proliferación. Probablemente marca importantes estimuladores de crecimiento para la degradación proteasomal.	Arabidopsis
FORMOSA (FO) (Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009a)	Regula específicamente el tamaño floral mediante la inhibición de la división celular y esta inhibición está relacionada con una regulación negativa de <i>AmANT</i> .	<i>Antirrhinum</i>

Al igual que la división celular, el control genético sobre la expansión celular se puede dividir en factores promotores y limitantes que controlan el crecimiento celular a través de diferentes mecanismos (Tabla 3.2). Varios de estos genes controlan tanto la división como la expansión celular, dependiendo del órgano o del tipo de células (Delgado-Benarroch, 2010).

Tabla 2. Genes involucrados en el control sobre el crecimiento a través la expansión celular en diferentes zonas de órganos laterales.

Nombre del Gen	Función	Planta
Genes que promueven la expansión celular		
α-EXPANSIN GENE <i>PhEXP1</i> (Zenoni <i>et al.</i> , 2011)	Una regulación negativa del gen provoca células más pequeñas y reduce el tamaño de los pétalos. Se ha propuesto que expansinas participan en el ensamblaje de pared celular a través de sus efectos sobre la síntesis o deposición de celulosa.	Petunia
GROWTH REGULATION FACTOR 1,2,3 <i>(AtGRF1,2,3)</i> (Kim <i>et al.</i> , 2003)	El triple mutante afecta el nivel de expansión celular y el tamaño de cotiledones y hojas.	Arabidopsis
ARGOS LIKE (ARL) (Hu <i>et al.</i> , 2006)	Su sobreexpresión resulta en órganos más grandes con células más grandes,	

	posiblemente a través la señalización de brasinosteroides.	
FORMOSA (FO) (Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009a)	Activa la expansión celular en células cónicas del pétalo y en el estambre.	<i>Antirrhinum</i>
COMPACTA ÄHNLICH (COA) (Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009b)	Promueve la expansión celular en regiones específicas del pétalo.	<i>Antirrhinum</i>
DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE 1 (DAD1) or DELAYED DEHISCENCE 1 (Sanders, 2000; Ishiguro, 2001)	Genes involucrados en la síntesis de ácido jasmónico. Afecta etapas tardías en el crecimiento floral.	Arabidopsis
Genes de identidad de órgano COMPACTA (CO), DEFICIENS (DEF), GLOBOSA (GLO) (Manchado-Rojo <i>et al.</i> , 2012)	Los mutantes de la función “B” muestran una reducción en el tamaño de la flor con reducción en el tamaño celular de diferentes zonas y órganos (p.e. <i>co</i> afecta el pétalo y estambre)	
Genes que reprimen la expansión celular		
GRANDIFLORA (GRAF) (Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009b)	Limita la expansión celular en pétalos.	<i>Antirrhinum</i>
BIG PETAL (BPE) (Varaud <i>et al.</i> , 2011)	El gen tiene dos formas que resultan de un corte alternativo de exones. <i>BPEup</i> limita la expansión celular en toda la planta <i>BPEp</i> solo en pétalos. Ácido jasmónico controla la expresión de <i>BPEp</i> (Brioude <i>et al.</i> , 2009).	Arabidopsis
MYB21 y MYB24 (Reeves <i>et al.</i> , 2012)	Factores de transcripción, activados durante fases tardías del desarrollo del pétalo, requerido para el crecimiento de pétalos y estambres. Inhiben la señalización de ácido jasmónico y de esta manera terminan el crecimiento.	Arabidopsis
AUXIN RESPONSE FACTOR ARF6 and ARF8 (Nagpal <i>et al.</i> , 2005)	Interactúa con <i>BPEp</i> , limitando la expansión en pétalos durante estadios tardíos. Respuesta relacionada con cambios en la expresión de genes de respuesta a auxinas	Arabidopsis

Otro proceso claramente asociado con la expansión celular es el aumento en el nivel de poliploidía, un resultado de la endoreduplicación, que incluye la replicación de ADN sin división celular (Sugimoto-Shirasu *et al.*, 2002).

Los procesos de división y expansión celular, que dan lugar al tamaño y la forma final del órgano, está controlado por factores genéticos, pero también por factores físicos, como la propiedad de la pared celular, la presión hidrostática y las células circundantes.

Estas fuerzas limitan el crecimiento de células individuales. Sin embargo, existe un proceso de coordinación compensatoria, que coordina el tamaño al nivel del órgano independiente de las células individuales (Kaplan y Hagemann, 1991), aumentando la división en caso de una reducida expansión y viceversa. Un ejemplo es el mutante *coan* (*compacta ähnlich*) de *Antirrhinum majus*, caracterizado por una división celular reducida en flores y compensados por el aumento de la expansión celular en células cónicas de los pétalos (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009b). Desde una perspectiva evolutiva, la compensación es una característica de aptitud ventajosa, especialmente en relación con el tamaño floral, que juega un papel clave en la polinización.

2.2.- Control ambiental sobre el tamaño de órganos laterales en plantas

Las plantas ajustan su tamaño en respuesta a señales nutricionales que incluyen luz, agua, nutrientes, o señales físicas como cambios en el área de hojas debido a herbívoros.

La tabla 2.3 muestra ejemplos que indican el efecto de diferentes señales ambientales sobre el tamaño de órganos laterales en plantas modelo y diferentes cultivos, donde el estudio de efectos ambientales sobre la cosecha es crucial. En el proceso de respuesta al estrés intervienen diferentes hormonas como el ácido abscísico (Sharp, 2002), el etileno (Sharp, 2002; Chang *et al.*, 2013) y giberelinas (Achard *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012).

Tabla 3. Ejemplos del efecto de diferentes condiciones medio ambientales sobre el tamaño de órganos laterales.

Condición	Efecto
Cambio en el fotoperiodo	En <i>Antirrhinum majus</i> , hojas subtendiendo las flores son un orden de magnitud más grandes en días cortos comparado con días largos (Bradley <i>et al.</i> , 1996a).
Diferentes tipos de estrés (agua, sequía, temperatura, luz)	Diferentes cultivos muestran un aumento en ácido abscísico y al mismo tiempo se retarda el crecimiento. El aumento de ABA probablemente tiene la función de reducir la producción de etileno (Sharp, 2002).
Cambios en cantidad de etileno	La sobreproducción de etileno reduce el número y el tamaño de células, resultando en órganos más pequeños. Un defecto en la percepción resulta en órganos más grandes (Chang <i>et al.</i> , 2013).
Frío	Afecta la activación de <i>C-REPEAT-BINDING FACTOR genes</i> (CBF). CBFs activan la síntesis de GA ₂ oxidasa, resultando en una reducción de giberelinas activas. <i>CBF1</i> confiere tolerancia al frío pero también retrasa el crecimiento (Achard <i>et al.</i> , 2008).

Sequia	Los genes <i>DREB</i> (dehydration-responsive element-binding protein), son factores de transcripción, activados bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. En tomate, el gen <i>SIDREB</i> está activado bajo estrés hídrico y regula niveles de giberelinas, restringiendo la expansión de las hojas y el alargamiento de los entrenudos (Li <i>et al.</i> , 2012).
Nutrición deficitaria	Falta de nitrógeno y de calcio reduce el área de hojas en la planta ornamental <i>Spatiphyllum</i> (Yeh <i>et al.</i> , 2000)
Defoliación	En <i>Antirrhinum majus</i> , la defoliación artificial produce plantas más bajas. Las hojas restantes incrementan en tamaño (Bayo-Canha <i>et al.</i> , 2007).
Sombra	En <i>Arabidopsis</i> (Cookson y Granier, 2006) y en soja (Wu <i>et al.</i> , 2017), el cultivo bajo sombra reduce el tamaño de las hojas al inhibir la proliferación y el expansión de las células.

2.3.- Control sobre el número de órganos laterales en plantas

Los órganos laterales se originan a partir de un grupo de células iniciales dentro de los flancos del SAM en caso de hojas o el meristemo floral en caso de flores. El número de órganos laterales es un factor flexible y puede variar sobre todo en respuesta a condiciones ambientales, pero también controlado por factores genéticos. El fenotipo de floración tardía, un rasgo bajo control genético, está acompañado por un aumento en el número de hojas antes de la floración. Hasta 35 genes están descritos en *Arabidopsis* que afectan el tiempo de floración y por lo tanto el tiempo de crecimiento vegetativo, incluido genes del reloj circadiano, los genes *CONSTANS (CO)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)* y genes involucrados en la percepción del señal de vernalización *VRN1* y *2*. Se trata realmente de una integración de señales internas y señales medioambientales (Putterill *et al.*, 2004). Mutantes semi-dominantes de *roa* en *Antirrhinum majus* no pueden producir suficientes células madre indiferenciadas y desarrollan solo dos, una o ninguna hoja (Kieffer *et al.*, 2006).

La plasticidad de plantas con respecto a la producción de órganos laterales y en respuesta a diferentes condiciones ambientales, incluyendo factores de estrés biótico y abiótico, mayoritariamente se expresan como un cambio en el tamaño, y no en el número de órganos laterales. Sin embargo, existen ejemplos que muestran cambios en el número de hojas o flores. En *Antirrhinum majus* se observa una separación de efectos sobre órganos vegetativos y generativos en respuesta a defoliación artificial, lo que provoca un cambio en el número de flores pero no en el tamaño de flores, mientras que afecta al tamaño de hojas (Bayo-Canha *et al.*, 2007). Se propone que esta diferencia resulta de

diferentes programas genéticos controlando el crecimiento de órganos vegetativos y de órganos florales (Juenger et al., 2005).

Tabla 4. Ejemplos del efecto de diferentes factores de estrés abiótico y biótico sobre el número de órganos laterales.

Condición	Efecto
Sequía	En variedades de patata, sequía moderada reduce el número de hojas hasta 25% (Deblonde y Ledent, 2001) Falta de riego durante la fase reproductiva de garbanzo reduce la producción de flores en aproximadamente dos tercios (Fang et al., 2010).
Defoliación	En <i>Antirrhinum majus</i> , la defoliación artificial produce una reducción en el número de flores, pero no en el tamaño (Bayo-Canha et al., 2007).
Nutrición deficitaria	Falta de nitrógeno reduce el número de hojas en la planta ornamental <i>Spatiphyllum</i> (Yeh et al., 2000).
Temperaturas altas	En trigo y cebada, el número de hojas emergentes incrementa hasta llegar a una temperatura óptima, seguido por una reducción a temperaturas elevadas (Cao y Moss, 1989). En <i>Pelargonium</i> , el número de flores en la inflorescencia disminuye de 9 a 3,8 flores conforme incrementa la temperatura media de 12 a 29°C (Anderson, 2007) El aumento de la temperatura nocturna aumenta el número de flores en soja (Zheng et al., 2002)
Contaminación con arsénico	Contaminación con arsénico provoca una reducción en el número de hojas en <i>Brassica</i> (Niazi et al., 2017).
Sombra	La reducción en el número de hojas en <i>Arabidopsis</i> bajo condiciones de sombra está asociada con una reducción en la tasa de inicio de la hoja y la duración de la fase de producción de la hoja (<u>Cookson and Granier, 2006</u>).

3.- CONTROL SOBRE CARACTERISTICAS FLORALES

Pocas plantas se usan al mismo tiempo como modelos genéticos y como ornamental floral comercial. Entre ellas podemos encontrar Petunia (Gerats y Vandenbussche, 2005) que tiene una inflorescencia cimosa y boca de dragón (*Antirrhinum majus*) (Schwarz-Sommer *et al.*, 2003) que tiene una inflorescencia en forma de espiga.

Los modelos genéticos sirven para clonar genes, para estudiar perfiles de expresión génica en mutantes y en respuesta a condiciones ambientales o para estudiar el desarrollo vegetativo y floral. El estudio del desarrollo floral y la floración incluye el estudio de la interacción entre polinizadores y flores. Este último tiene relevancia para la conservación de especies de plantas y insectos y para el mantenimiento y aumento de la productividad de una planta. Además, el conocimiento obtenido en la planta modelo puede ser transferido a otros cultivos importantes. El análisis del desarrollo floral también es un aspecto importante en la mejora de ornamentales e incluye características como el tiempo de floración, el número, tamaño y la arquitectura floral y de la inflorescencia, el color de flores, la senescencia floral o la fragancia (Noman *et al.*, 2017), lo que también es relevante para la producción de perfumes (Ruíz-Ramón *et al.*, 2014). Otros caracteres como objeto de la mejora ornamental incluyen la altura de planta, el número, tamaño y color de hojas, la ramificación o el control y la regulación de la respuesta al gravitropismo. Lo último es relevante para la flor cortada durante el almacenamiento y el transporte horizontal (Philosoph-Hadas *et al.*, 1995). A continuación, se describe los factores genéticos y medioambientales que afectan las características florales mencionados anteriormente con excepción del tamaño y el número de flores, que se trató en el párrafo anterior (2.1-3).

3.1. Control sobre características relacionados con la interacción flor-polinizador

La interacción entre plantas y otros organismos está mediada por un conjunto complejo de rasgos entre los cuales el color y la emisión de compuestos químicos juega un papel clave. Pero existen otros rasgos, como el tamaño y la arquitectura floral, la forma de las células en los pétalos o la composición del néctar y polen, que establecen una relación específica entre la especie vegetal y el polinizador y pueden ser afectados por condiciones medio ambientales.

Los polinizadores se orientan en parte por el color para ubicar las flores. El color de las flores se debe principalmente a las estructuras químicas de diferentes pigmentos, como las antocianinas y los carotenoides. Las abejas recolectoras de néctar son las principales polinizadoras descritas del género de *Antirrhinum*, porque tienen cuerpos suficientemente fuertes para abrir la corola cerrada. Seis tipos de abejas cuentan por más del 90% de visitas de insectos a *Antirrhinum charidemi*, *Antirrhinum graniticum*, y *Antirrhinumbraun-blanquetii* (Vargas *et al.*, 2010). Estas son *Rhodanthidium sticticum*, una abeja solitaria, es el principal polinizador de *A. microphyllum* (Torres *et al.*, 2003) y *Bombus terrestres* es el principal visitante a flores de *A. majus pseudomajus* y *A. majus striatum* con flores de color magenta y amarillo, respectivamente (Suchet *et al.*, 2010). Un análisis de relaciones entre grupos de polinizadores y el espectro de colores demostró asociaciones consistentes entre el tipo de polinizador y ciertos colores donde las abejas se asociaron con flores de color púrpura, hormigas con flores UV-amarillas (reflejan luz ultra violeta) y verdes, avispas y dípteros se asociaron principalmente con flores UV-amarillas, coleópteros con flores blancas y amarillas y lepidópteros con flores rosas (Reverté *et al.*, 2016). En caso de *Antirrhinum*, las diferentes especies visitadas principalmente por abejas varían en color entre rosa, magenta y amarillo, demostrando que las asociaciones de plantas y polinizadores basadas en el color no son muy estrictas y dependen del contexto de otros rasgos. Sin embargo, se ha demostrado que efectos medioambientales que afectan el color de las flores, también afectan a la atracción de insectos (Haneklaus, 2005). El principal efecto ambiental sobre el color de pétalos es la temperatura. Se ha observado en varias especies, que temperaturas altas reducen el contenido de pigmento en pétalos debido a una expresión reducida de genes de síntesis de antocianinas (*chalcona sintasa (CHS)*, *flavanone 3-hidroxiylasa (F3H)* y *dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) MYB12*) mientras temperaturas bajas llevan a una epidermis más gruesa y un color más oscuro (Chen *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2011; Zhao and Tao, 2015). Estrés de salinidad, o cambios en las concentraciones de potasio, fosfato, silicio o sodio pueden afectar el color de pétalos, en parte a través de cambios en el pH de las células, que pueden cambiar la saturación de los colores o provocar un cambio espectral entre más amarillo a más azul (Reezi *et al.*, 2009). En *Brassica napus L.*, la deficiencia de azufre cambia el color de pétalos de amarillo intenso a amarillo pálido o blanco y este cambio afecta a la atracción de abejas (Haneklaus, 2005).

La mayoría de las angiospermas tienen células epidérmicas de forma cónica en los pétalos. Estas células intervienen en el color, el reflejo, la temperatura, la humectabilidad del pétalo, la producción de aroma y el agarre del polinizador en la superficie de la flor (Whitney *et al.*, 2011). La función de las células cónicas como intensificador del color de pétalo y el agarre de los insectos se ha estudiado profundamente en el sistema *Antirrhinum majus* /abejorro (Glover y Martin, 1998) (Dyer *et al.*, 2007). La formación de células cónicas está controlado por el gen *MIXTA* y los pétalos de mutantes de *mixta* aparecen ligeramente más pálidas y menos aterciopeladas (Noda *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el gen de uno de los enzimas clave en la producción de volátiles en *Antirrhinum*, ácido benzoico carboxil metil transferasa, se expresa en las células cónicas y un mutante en el desarrollo floral de *Antirrhinum majus*, *compacta (co)*, muestra una reducción en el área de células cónicas, un reducido nivel de expresión de *MIXTA* y una reducción en la emisión de volátiles (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). Las observaciones en *Antirrhinum* demuestran la importancia de la forma de células de pétalos para la atracción de polinizadores. La formación de las células cónicas no parece ser afectada por condiciones ambientales.

Los visitantes de las flores esperan una recompensa en forma de néctar y/o polen y tanto la cantidad como la calidad de estas recompensas pueden afectar el atractivo de la flor. El polen requiere recursos de la planta madre para madurar, germinar e iniciar el crecimiento. Diferentes factores ambientales pueden afectar la cantidad de polen producida por cada flor, pero también su viabilidad y por lo tanto la producción de semillas. Factores como la fertilidad del suelo (Lau *et al.*, 1995), daños de hoja por herbívoros (Quesada *et al.*, 1995) o temperaturas bajas pueden afectar el rendimiento de polen (Yeaman *et al.*, 2014). En caso de *Antirrhinum*, se ha demostrado que temperaturas muy bajas y muy altas reducen la viabilidad del polen en *Antirrhinum tortuosum* (Alaimo *et al.*, 1997). La cantidad y composición del néctar producido depende del genotipo y del medioambiente. Factores como el suministro de agua (Leiss and Klinkhamer, 2005), la humedad atmosférica (Butler, 1945), o temperaturas durante el día y la noche (Jakobsen y Krijánsson, 1994; Petanidou y Smets, 1996), pero también la edad de la flor, pueden afectar la producción de néctar. El mutante *mixta* de *Antirrhinum majus* no produce células cónicas en los pétalos. Se propone que células cónicas mejoran la capacidad para absorber la luz y calor, generando una diferencia detectable en el

microclima intrafloral, lo que puede explicar un aumento en la secreción de néctar en plantas silvestres frente al mutante *mixta* (Comba *et al.*, 2000).

En la mayoría de las flores, el aroma floral está emitido por pétalos y estambres (Petanidou and Smets, 1996; Dudareva *et al.*, 1996; Scalliet *et al.*, 2006). Los perfumes florales producidos contienen una gran variedad de VOCs haciéndolos muy complejos. Las flores de rosas producen hasta 500 diferentes tipos de VOCs (Spiller *et al.*, 2010) y más que 1700 compuestos diferentes fueron identificados en el aroma de flores (Knudsen *et al.*, 2006). Se ha estudiado el control genético y medioambiental en varias especies. Con respecto al control genético, varios genes segregan como *loci* mendelianos singulares con genes responsables para la producción de un VOC singular, como es el caso de nerol, acetato de nerilo, y acetato de geranilo en rosas (Spiller *et al.*, 2010) o metil benzoato en *Antirrhinum majus* (Ruiz-Hernández *et al.*, 2017). Otros VOCs, como ocimeno, metilcinamato o acetofenona, segregan según un patrón mendeliano con 2 genes y simples interacciones epistáticas en *Antirrhinum majus* (Ruiz-Hernández *et al.*, 2017). En Petunia, se han identificado tres factores de transcripción, *EMISSION OF BENZENOIDS I and II (EOBI; EOBII)* and *ODORANT1 (ODO1)*, que actúan y interactúan como reguladores generales de la emisión de volátiles, activando genes de la ruta de shikimato (*ODO1*) y genes estructurales de la ruta de fenilpropanoides (*EOB I y II*) (Spitzer-Rimon *et al.*, 2012). Otro regulador principal es *PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1 (PAP1)*, un factor de transcripción tipo MYB de Arabidopsis, que activa toda la gama de genes implicados en la biosíntesis de ácidos fenólicos y compuestos flavonoides (incluidas las antocianinas) en la ruta biosintética de los flavonoides en varias especies de plantas (Mitsunami *et al.*, 2014), pero también activa la producción de compuestos de volátiles tipo fenilpropanoides y terpenoides en flores de rosa (Zvi *et al.*, 2012).

Como mencionamos anteriormente, otro factor genético que determina tanto la cantidad como la composición del perfume es el desarrollo de células cónicas en el pétalo, que a su vez depende de la expresión del gen *MIXTA* en *Antirrhinum majus* (Manchado-Rojo *et al.*, 2012). Aparte de los factores genéticos, la cantidad y composición de volátiles emitidos depende también del estado de apertura de la flor (Eran Pichersky, 1994; Dudareva *et al.*, 1998; Ruiz-Ramon *et al.*, 2014), si la flor está polinizada o no, (Rodríguez-Saona *et al.*, 2011), la hora del día controlado por el ritmo circadiano

(Kolossova *et al.*, 2001; Schuurink *et al.*, 2006) o la temperatura (Sagae *et al.*, 2008; Cna'ani *et al.*, 2015). En *Antirrhinum majus* y con respecto a la emisión de volátiles en función de la edad de la flor, se ha observado, que el perfil de volátiles es relativamente conservado durante diferentes fases de la apertura floral (Weiss *et al.*, 2016), mientras que la cantidad de volátiles disminuye hacia la senescencia de la flor.

La arquitectura floral de las diferentes especies de *Antirrhinum* se caracteriza por tener una corola cerrada. La simetría zigomórfica de las flores de *Antirrhinum* está controlada por los factores de transcripción *CYCLOIDEA (CYC)* y *DICHOTOMA (DICH)*, que se expresan en los órganos florales dorsales (Gübitz *et al.*, 2003). Otro genes que controlan la arquitectura floral en *Antirrhinum majus* son los genes “caja MADS” que controlan el desarrollo de órganos florales según el modelo ABC, incluyendo *SQUAMOSA (SQUA)* de función “A” que controla el desarrollo de sépalos y pétalos, *DEFICIENS (DEF)* y *GLOBOSA (GLO)* de función “B”, que afectan el desarrollo de pétalos y estambres y *PLENA (PLE)* de función “A” que afecta el desarrollo de estambres y estigma (Saedler *et al.*, 2001). Junto con su función de coordinación de la identidad de los órganos, los genes DEF, GLO y SQUA juegan un papel en determinar el número de órganos que aparecen en los verticilos florales (Egea-Cortines *et al.* 1999). Los genes *COMPACTA (CO)* y *COMPACTA ÄHNLICH (COÄ)* afectan la expansión del lóbulo del pétalo. Una característica de los mutantes *co* y *coä* son los estambres sobresalientes por encima de los pétalos reducidos (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009b). Entre los factores ambientales que afectan la arquitectura floral destacan el nivel de radiación y la temperatura como en caso de la especie ornamental *Sandersonia aurantaiaca*, donde estos factores afectan a la forma de la flor y la longitud del pedicelo (Catley *et al.*, 2002).

3.2. Control sobre características relacionados con el valor ornamental

La mayoría de las características florales con importancia para la interacción entre flor-polinizador también son importantes en términos del valor ornamental, como el color, el tamaño y la forma de la flor, el número de flores y la emisión de volátiles, mencionados anteriormente. Otros aspectos, influidos tanto por factores genéticos como medio ambientales, son la arquitectura de la inflorescencia, la senescencia de la flor cortada y la respuesta al gravitropismo de la inflorescencia en flor cortada.

Existen dos tipos de arquitectura de inflorescencia, determinado y indeterminado. Mientras la planta modelo *Petunia* tiene una inflorescencia determinada, la inflorescencia indeterminada de *Antirrhinum*, donde el SAM nunca se convierte en un meristemo floral, esta controlada por el gen *CENTRORADIALIS* (Bradley *et al.*, 1996b). Mutaciones en este gene convierten la inflorescencia en determinada. Otro aspecto de la arquitectura de la inflorescencia, aparte del número de flores, es la posición de las flores, que muestra una enorme variabilidad entre especies y se presenta en forma de racimo en espiga en el caso de *Antirrhinum*. Se ha observado en *Arabidopsis*, que la posición erecta de las flores está controlado por los genes *ERECTA* y *KNAT1* y mutantes muestran flores orientados hacia abajo debido a una pérdida de clorénquima en los nodos (Douglas *et al.*, 2002). Con respecto a efectos ambientales, se ha observado en *Euphorbia nicaeensis*, que tres morfotipos diferentes de inflorescencia se desarrollan en función de la densidad de la cubierta vegetal y la disponibilidad de sustratos (Samman *et al.*, 2001).

La senescencia de las flores es un proceso de desarrollo programado genéticamente e incluye el marchitamiento de las flores, el desprendimiento de las partes de las flores y la pérdida de colores. El proceso está acompañado secuencialmente de una pérdida de la permeabilidad de la membrana, un aumento del nivel de enzimas oxidativas, una disminución del nivel de enzimas protectoras y la pérdida de ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y orgánulos. Los productos hidrolizados se transportan a otros tejidos en fase de crecimiento (Tripathi y Tuteja, 2007). La senescencia puede ser desencadenada por estreses bióticos y abióticos como la polinización (ten Have y Woltering, 1997; O'Neill, 1997), sequía, calidad de luz, calor, la invasión por patógenos o predadores, mediado por la evolución del etileno en flores sensibles al etileno, y a través de niveles elevados de ABA en flores insensibles a etileno (Tripathi y Tuteja, 2007). El etileno también desencadena la senescencia de flores cortadas. Las flores cortadas de *Antirrhinum* son sensibles al etileno, y su calidad en florero es relativamente corta (Asrar, 2012). Otro problema de la flor cortada de *Antirrhinum* es la respuesta negativa al gravitropismo durante el transporte horizontal de los tallos de flores cortadas. El proceso involucra una reorientación de amiloplastos inducida por la gravedad, cambios en la concentración de calcio citosólico, la sobreexpresión de genes de respuesta a auxinas, la distribución asimétrica de auxina y de etileno, lo que finalmente provoca un crecimiento diferencial y la flexión del tallo (Philosoph-Hadas *et al.*, 1995; Philosoph-Hadas *et al.*, 2001).

4.- REVELACIÓN DE REDES REGULADORAS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

El análisis transcriptómico es una técnica esencial que nos permite entender la función de los genes en diferentes tejidos, fases de desarrollo o en respuesta a condiciones ambientales de un organismo. Existen varios enfoques de alto rendimiento de análisis transcriptómico que han surgido a partir de los años noventa y que posibilitaron a comprender la identidad y la abundancia de cada molécula de ARN en una célula dada bajo una condición específica.

El primer método desarrollado fue el método de ESTs (expressed sequence tags – etiquetas de secuencias expresadas) (Adams *et al.*, 1992). Se trata de fragmentos de secuencias de ARNm de una genoteca de cADN, derivadas de reacciones de secuenciación singulares realizadas sobre uno o los dos extremos de genes expresados (Parkinson and Blaxter, 2009). Las desventajas iniciales de este método consistieron en el alto costo de secuenciación y la semi-cuantitatividad de los datos (Hrdlickova *et al.*, 2017). Los altos costes fueron reducidos a través del uso del método SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), que consiste en solo secuenciar 15 - 21 pares de bases de los ESTs (Velculescu *et al.*, 1995). Los EST polimórficos se pueden utilizar como marcadores en la creación de mapas de ligamiento como el mapa de *A. majus*, basado en la segregación de marcadores en la población F2 de un cruce entre dos líneas puras de laboratorio, Sippe 50 y 165E (Bey *et al.*, 2004; Schwarz-Sommer *et al.*, 2010).

Los ESTs fueron superados a mediados de la década de 1990 por las micromatrices, un método basado en herramientas para el monitoreo directo de gran número de secuencias de ARNm en paralelo. Este enfoque cuantitativo se basa en la hibridación de transcritos marcados con fluorescencia en micromatrices (microarrays) de alta densidad que contienen decenas de miles de oligonucleótidos sintéticos. Las sondas se unen a la superficie sólida de las matrices mediante impresión o síntesis *in situ*. Las desventajas se encuentran en el hecho de que, al diseñar las sondas de micromatrices, se necesita información de secuencia a priori. Además, la hibridación cruzada y las señales de fondo pueden disminuir la especificidad o la sensibilidad de algunos genes (Lockhart *et al.*, 1996; Hrdlickova *et al.*, 2017). Las micromatrices con sondas basadas en la secuencia de ESTs de *A. majus*, representando genes únicos de tejidos vegetales y/o de órganos florales, fueron usadas por ejemplo para revelar el perfil global transcriptómico del

mutante *cinnata* (*cin*) frente al silvestre (Das Gupta *et al.*, 2014) o para caracterizar el perfil de expresión durante el desarrollo tardío del pétalo (Bey *et al.*, 2004).

Desde la primera década de este milenio, la secuenciación de ARN mediante la secuenciación masiva (Deep sequencing) con los métodos de secuenciación de la nueva generación (NGS-New generation sequencing) se utilizan cada vez más para el análisis transcriptómico. Las ventajas de este método son la generación de una cantidad de datos sin precedentes en poco tiempo y con menos ruido de fondo en comparación con las micromatrices. La generación de información de secuencia permite la detección de genes desconocidos y nuevas isoformas de transcritos que no se encuentran en una micromatriz (Hrdlickova *et al.*, 2017). En general, los pasos de RNA-seq consisten en retro-transcribir una población de ARN en ADNc, seguido por la unión de adaptadores y la secuenciación de cada molécula con un método de secuenciación masiva para obtener secuencias cortas de un extremo o de ambos extremos con una longitud de 30-400 pb, dependiendo de la tecnología de secuenciación de ADN utilizada. La interpretación de las secuencias generadas consiste en un ensamblaje en contigs y una alineación con un genoma de referencia o transcritos de referencia, o un ensamblaje *de novo* para producir un mapa de transcripción que contenga la estructura transcripcional y / o el nivel de expresión para cada gen (Wang *et al.*, 2009). Un aspecto importante es la profundidad de la secuenciación del exoma, que se refiere al número de lecturas que cubren cada posición. Un aumento en la profundidad aumenta la probabilidad de encontrar transcritos raros (Cai *et al.*, 2012).

Los datos generados mediante análisis de micromatrices o RNAseq a partir de muestras de diferentes tejidos, estadios de desarrollo o tratamientos posibilitan un análisis de transcriptómica comparativa, es decir la detección de genes expresados diferencialmente y por lo tanto la identificación de redes de señalización claves entre estos genes. En caso de *A. majus*, este abordaje se ha aplicada, entre otros, para entender el control genético de la transición del estado vegetativo al generativo, caracterizado por un cambio en la filotaxis (Wang *et al.*, 2017).

El procesamiento de los datos generados depende del tipo de análisis mediante micromatrices o RNA seq y también de si el genoma del organismo analizado ya está secuenciado y anotado. En caso de *Antirrhinum majus* existe solo una anotación parcial y la anotación de genes por lo tanto requiere la búsqueda de ortólogos en genomas alternativos, como *Arabidopsis* o tomate, usando secuencias traducidas y la aplicación

TBlastN. Pasos aguas abajo incluyen una anotación funcional, por ejemplo mediante el programa Blast2GO (Götz *et al.*, 2008), que permite determinar la identidad biológica del gen, su función molecular, función biológica, la ubicación subcelular y sus dominios de expresión dentro de la planta. Adicionalmente, los genes diferencialmente expresados pueden ser calificados en rutas metabólicas mediante la base de datos (KEGG) (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes resource) (<http://www.kegg.jp/> or <http://www.genome.jp/kegg/>). Otra anotación funcional mediante “g:profiler” en base de “Gene ontology”, permite identificar rutas metabólicas y enlaces de unión de factores de transcripción o crear mapas de interacción destacadas entre genes (Reimand *et al.*, 2007). Los datos de expresión se pueden depositar en la base de datos GEO (Gene Expression Omnibus), un repositorio público internacional para el almacenamiento y la libre distribución de datos de expresión génica, obtenidos con métodos de análisis de alto rendimiento (Clough y Barrett, 2016).

La confirmación de la expresión diferencial se realiza mediante una PCR cuantitativa donde se identifica el número de ciclo de la PCR en el cual la intensidad de emisión de un fluoroforo aumenta con respecto al ruido de fondo. Este número de ciclo se llama ciclo umbral (Ct: threshold cycle). El posterior análisis de la curva de disociación permite la confirmación de la homogeneidad de los amplicones. La presencia de un solo pico indicará una amplificación específica. Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente realizado a continuación de la PCR, obteniéndose una gráfica que corresponde con la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Cada fragmento amplificado tiene una T_m (melting temperature) característica, que depende principalmente de la longitud del fragmento y de su composición en nucleótidos. Para obtener una cuantificación relativa de la expresión génica en todas las muestras, los datos obtenidos de la qPCR deben normalizarse contra un gen de referencia. Estos genes se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo. La expresión de este no puede ser modificada por las condiciones de estudio o por la respuesta a un tratamiento experimental. El gen usado como gen de referencia para el cálculo de la expresión normalizada en caso de *A. majus* es el gen *UBIQUITINA LIGASA* (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009; Manchado-Rojo *et al.*, 2012; Manchado-Rojo *et al.*, 2014).

Extracción de ARN de diferentes tratamientos/órganos/estadios de desarrollo

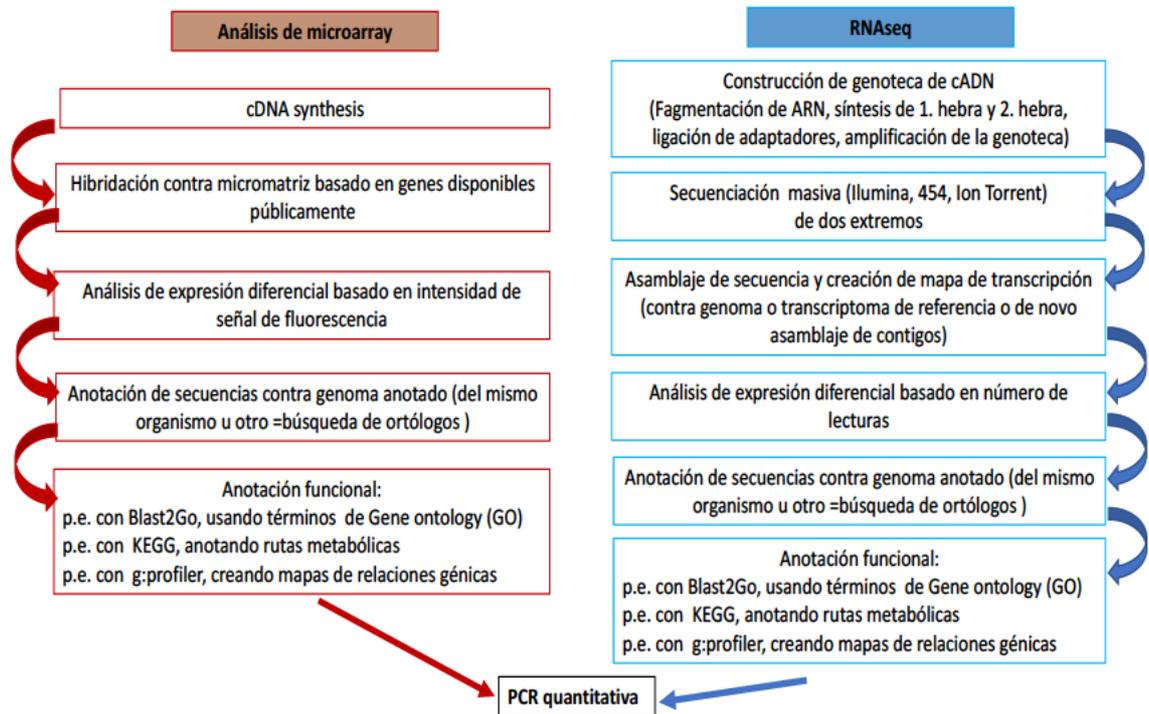


Figura 2 Representación esquemática del flujo de trabajo para el análisis de la expresión génica diferencial.

REFERENCIAS

- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. and Genschik, P.** (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell*, **20**, 2117–2129.
- Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C. and Venter, J.C.** (1992) Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*, **355**, 632–634.
- Adams, S.R., Munir, M., Valdés, V.M., Langton, F.A. and Jackson, S.D.** (2003) Using Flowering Times and Leaf Numbers to Model the Phases of Photoperiod Sensitivity in *Antirrhinum majus* L. *Ann Bot*, **92**, 689–696.
- Alaimo, M.G., Melati, M.R. and Scialabba, A.** (1997) Pollen grain stereostructure, viability and germination; correlation with temperature of *Antirrhinum tortuosum* Bosc. *Acta Botanica Gallica*, **144**, 171-181,.
- Almeida, J., Carpenter, R., Robbins, T.P., Martin, C. and Coen, E.S.** (1989) Genetic interactions underlying flower color patterns in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.*, **3**, 1758–1767.
- Alves, A.A.C. and Setter, T.L.** (2004) Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Annals of botany*, **94**, 605–13.
- Anastasiou, Elena., Kenz, Sabine., Gerstung, Moritz., MacLean, Daniel., Timmer, Jens., Fleck, Christian. and Lenhard, Michael.** (2007) Control of Plant Organ Size by KLUH/CYP78A5-Dependent Intercellular Signaling. *Developmental Cell*, **13**, 843–856.
- Anderson, N.O.** (2007) *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*, Springer Science & Business Media.
- Araújo, W.L. and Fernie, A.R.** (2012) Systems Biology of Gibberellin Induced Plant Cell Growth. *Front Plant Sci*, **3**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410372/> [Accessed May 10, 2019].
- Asrar, A.-W.A.** (2012) Effects of some preservative solutions on vase life and keeping quality of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) cut flowers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, **11**, 29–35.
- Bayo-Canha, A., Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2007) Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but not floral size in *Antirrhinum majus*. *Scientia Horticulturae*, **113**.
- Bey, M., Stuber, K., Fellenberg, K., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H., Saedler, H. and Zachgo, S.** (2004) Characterization of *Antirrhinum* petal development and identification of target genes of the class B MADS box gene DEFICIENS. *Plant Cell*, **16**, 3197–3215.
- Bradley, D., Carpenter, R., Copley, L., Vincent, C., Rothstein, S. and Coen, E.** (1996a) Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature*, **379**, 791.
- Bradley, D., Vincent, C., Carpenter, R. and Coen, E.** (1996b) Pathways for inflorescence and floral induction in *Antirrhinum*. *Development*, **122**, 1535–1544.
- Brioudes, F., Joly, C., Szécsi, J., Varaud, E., Leroux, J., Bellvert, F., Bertrand, C. and Bendahmane, M.** (2009) Jasmonate controls late development stages of petal growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **60**, 1070–80.
- Butler, C.G.** (1945) The Influence of Various Physical and Biological Factors of the Environment on Honeybee Activity. An Examination of the Relationship between Activity and Nectar Concentration and Abundance. *Journal of Experimental Biology*, **21**, 5–12.

- Cai, G., Li, H., Lu, Y., Huang, X., Lee, J., Müller, P., Ji, Y. and Liang, S.** (2012) Accuracy of RNA-Seq and its dependence on sequencing depth. *BMC Bioinformatics*, **13**, S5.
- Cao, W. and Moss, D.N.** (1989) Temperature Effect on Leaf Emergence and Phyllochron in Wheat and Barley. *Crop Science*, **29**, 1018–1021.
- Carrió, E. and Güemes, J.** (2014) The effectiveness of pre- and post-zygotic barriers in avoiding hybridization between two snapdragons (*Antirrhinum* L.: Plantaginaceae). *Bot J Linn Soc*, **176**, 159–172.
- Carvalho, S.M.P., Abi-Tarabay, H. and Heuvelink, E.** (2005) Temperature affects *Chrysanthemum* flower characteristics differently during three phases of the cultivation period. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **80**, 209–216.
- Catley, J.L., Brooking, I.R., Davies, L.J. and Halligan, E.A.** (2002) Temperature and irradiance effects on *Sandersonia aurantiaca* flower shape and pedicel length. *Scientia Horticulturae*, **93**, 157–166.
- Chang, C., Schaller, G.E. and Resnick, J.S.** (2013) Ethylene. In *eLS*. American Cancer Society. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0020099.pub2> [Accessed May 10, 2019].
- Chen, L., Sun, Z.F., Li, M., Xu, K. and Yang, X.** (2000) Quality evaluation standard of cut flower and the influence of growth conditions before harvest on cut flower. *North. Hortic.*, **1**, 40–42.
- Clough, E. and Barrett, T.** (2016) The Gene Expression Omnibus database. *Methods Mol Biol*, **1418**, 93–110.
- Cna'ani, A., Mühlemann, J.K., Ravid, J., Masci, T., Klempien, A., Nguyen, T.T.H., Dudareva, N., Pichersky, E. and Vainstain, A.** (2015) *Petunia* × *hybrida* floral scent production is negatively affected by high-temperature growth conditions. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 1333–1346.
- Coen, E.S., Doyle, S., Romero, J.M., Elliott, R., Magrath, R. and Carpenter, R.** (1991) Homeotic genes controlling flower development in *Antirrhinum*. *Development*, **113**, 149–155.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G. and Carpenter, R.** (1990) *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell*, **63**, 1311–1322.
- Comba, L., Corbet, S.A., Hunt, H., Outram, S., Parker, J.S. and Glover, B.J.** (2000) The role of genes influencing the corolla in pollination of *Antirrhinum majus*. *Plant, Cell and Environment*, **23**, 639–647.
- Costa, M.M.R., Yang, S., Critchley, J., Feng, X., Wilson, Y., Langlade, N., Copsey, L. and Hudson, A.** (2012) The genetic basis for natural variation in heteroblasty in *Antirrhinum*. *New Phytol.*, **196**, 1251–1259.
- Das Gupta, M., Aggarwal, P. and Nath, U.** (2014) CINCINNATA in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. *New Phytol.*, **204**, 901–912.
- Deblonde, P.M.K. and Ledent, J.F.** (2001) Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *European Journal of Agronomy*, **14**, 31–41.
- Delgado-Benarroch, L.** (2010) Sizing up the flower. In M. Yaish and M. Yaish, eds. *The Flowering Process and its Control in Plants: Gene Expression and Hormone Interaction*. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost., pp. 199-216.

- Delgado-Benarroch, L., Causier, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009a) FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*. *Planta*, **229**, 1219–1229.
- Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009b) The mutants compacta ähnlich, Nitida and Grandiflora define developmental compartments and a compensation mechanism in floral development in *Antirrhinum majus*. *Journal of Plant Research*, **122**.
- Dinneny, J.R., Weigel, D. and Yanofsky, M.F.** (2006) NUBBIN and JAGGED define stamen and carpel shape in *Arabidopsis*. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 1645–55.
- Disch, S., Anastasiou, E., Sharma, V.K., Laux, T., Fletcher, J.C. and Lenhard, M.** (2006) The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls *Arabidopsis* organ size in a dosage-dependent manner. *Current biology : CB*, **16**, 272–9.
- Douglas, S.J., Chuck, G., Dengler, R.E., Pelecanda, L. and Riggs, C.D.** (2002) KNAT1 and ERECTA Regulate Inflorescence Architecture in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **14**, 547–558.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. and Pichersky, E.** (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *The Plant cell*, **8**, 1137–48.
- Dudareva, N., Raguso, R.A., Wang, J., Ross, J.R. and Pichersky, E.** (1998) Floral scent production in *Clarkia breweri*. III. Enzymatic synthesis and emission of benzenoid esters. *Plant physiology*, **116**, 599–604.
- Dyer, A.G., Whitney, H.M., Arnold, S.E.J., Glover, B.J. and Chittka, L.** (2007) Mutations perturbing petal cell shape and anthocyanin synthesis influence bumblebee perception of *Antirrhinum majus* flower colour. *Arthropod-Plant Interactions*, **1**, 45–55.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin, J.Z. and Laux, T.** (1996) The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *The Plant Journal*, **10**, 967–979.
- Eran Pichersky, R.A.R., Efraim Lewinsohn and Rodney Croteau** (1994) Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae) 1. Localization and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity. *Plant Physiology*, **106**, 1533–1540.
- Eriksson, S., Stransfeld, L., Adamski, N.M., Breuninger, H. and Lenhard, M.** (2010) KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling coordinates floral organ growth in *Arabidopsis*. *Current biology : CB*, **20**, 527–32.
- Fang, X., Turner, N.C., Yan, G., Li, F. and Siddique, K.H.M.** (2010) Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. *J Exp Bot*, **61**, 335–345.
- Feng, X., Wilson, Y., Bowers, J., Kennaway, R., Bangham, A., Hannah, A., Coen, E. and Hudson, A.** (2009) Evolution of allometry in *antirrhinum*. *The Plant cell*, **21**, 2999–3007.
- Gaudin, V., Lunness, P.A., Fobert, P.R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H., Coen, E. and Doonan, J.H.** (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology*, **122**, 1137–1148.
- Gerats, T. and Vandenbussche, M.** (2005) A model system for comparative research: *Petunia*. *Trends Plant Sci.*, **10**, 251–256.

- Glover, B.J. and Martin, C.** (1998) The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, **80**, 778–784.
- Golz, J.F., Keck, E.J. and Hudson, A.** (2002) Spontaneous mutations in KNOX genes give rise to a novel floral structure in *Antirrhinum*. *Current Biology*, **12**, 515–522.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., et al.** (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3420–3435.
- Groot, E.P., Sinha, N. and Gleissberg, S.** (2005) Expression patterns of STM-like KNOX and Histone H4 genes in shoot development of the dissected-leaved basal eudicot plants *Chelidonium majus* and *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Molecular Biology*, **58**, 317–331.
- Gübitz, T., Caldwell, A. and Hudson, A.** (2003) Rapid Molecular Evolution of CYCLOIDEA-like Genes in *Antirrhinum* and Its Relatives. *Mol Biol Evol*, **20**, 1537–1544.
- Hake, S.** (2008) Inflorescence Architecture: The Transition from Branches to Flowers. *Current Biology*, **18**, R1106–R1108.
- Haneklaus, S.B., Anja, ., Bloem, Elke; Schnug, Ewald** (2005) *Relationship between sulfur deficiency in oilseed rape (Brassica napus L.) and its attractiveness for honeybees*, Braunschweig: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL).
- Have, A. ten and Woltering, E.J.** (1997) Ethylene biosynthetic genes are differentially expressed during carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flower senescence. *Plant Mol. Biol.*, **34**, 89–97.
- Hehl, R., Nacken, W.K.F., Krause, A., Saedler, H. and Sommer, H.** (1991) Structural analysis of Tam3, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the Ac element from maize. *Plant Mol Biol*, **16**, 369–371.
- Horiguchi, G., Kim, G.-T. and Tsukaya, H.** (2005) The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **43**, 68–78.
- Horváth, B.M., Magyar, Z., Zhang, Y., Hamburger, A.W., Bakó, L., Visser, R.G.F., Bachem, C.W.B. and Bögre, L.** (2006) EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *The EMBO journal*, **25**, 4909–20.
- Hrdlickova, R., Toloue, M. and Tian, B.** (2017) RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **8**, e1364.
- Hu, Y., Poh, H.M. and Chua, N.-H.** (2006) The *Arabidopsis* ARGOS-LIKE gene regulates cell expansion during organ growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **47**, 1–9.
- Hu, Y.X., Xie, O., Chua, N.H. and Xie, Q.** (2003) The *Arabidopsis* auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *The Plant Cell*, **15**, 1951–1961.
- Ishiguro, S.** (2001) The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in *Arabidopsis*. *THE PLANT CELL ONLINE*, **13**, 2191–2209.
- Ito, Y., Eiguchi, M. and Kurata, N.** (2001) KNOX homeobox genes are sufficient in maintaining cultured cells in an undifferentiated state in rice. *Genesis*, **30**, 231–238.
- Jakobsen, H.B. and Kritikjánsson, K.** (1994) Influence of Temperature and Floret Age on Nectar Secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany*, **74**, 327–334.
- Kaplan, D.R. and Hagemann, W.** (1991) The Relationship of Cell and Organism in Vascular Plants Are cells the building blocks of plant form? *BioScience*, **41**, 693–703.
- Kazama, T., Ichihashi, Y., Murata, S. and Tsukaya, H.** (2010) The Mechanism of Cell Cycle Arrest Front Progression Explained by a KLUH/CYP78A5-dependent Mobile

Growth Factor in Developing Leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **51**, 1046–1054.

Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B. (2006a) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, **18**, 560–573.

Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B. (2006b) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, **18**, 560–573.

Kim, J.H., Choi, D. and Kende, H. (2003) The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **36**, 94–104.

Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J. and Ståhl, B. (2006) Diversity and Distribution of Floral Scent. *The Botanical Review*, **72**, 1–120.

Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M. and Dudareva, N. (2001) Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant cell*, **13**, 2333–47.

Lai, Y.-S., Yamagishi, M. and Suzuki, T. (2011) Elevated temperature inhibits anthocyanin biosynthesis in the tepals of an Oriental hybrid lily via the suppression of LhMYB12 transcription. *Scientia Horticulturae*, **132**, 59–65.

Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G. and Xue, Y. (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.*, **50**, 29–42.

Laitinen, R.A.E., Immanen, J., Auvinen, P., et al. (2005) Analysis of the floral transcriptome uncovers new regulators of organ determination and gene families related to flower organ differentiation in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Genome Research*, **15**, 475–486.

Lau, T.-C., Lu, X., Koide, R.T. and Stephenson, A.G. (1995) Effects of soil fertility and mycorrhizal infection on pollen production and pollen grain size of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Plant, Cell & Environment*, **18**, 169–177.

Leiss, K.A. and Klinkhamer, P.G.L. (2005) Genotype by environment interactions in the nectar production of *Echium vulgare*. *Functional Ecology*, **19**, 454–459.

Li, J., Sima, W., Ouyang, B., et al. (2012) Tomato SIDREB gene restricts leaf expansion and internode elongation by downregulating key genes for gibberellin biosynthesis. *Journal of experimental botany*, **63**, 6407–20.

Li, M., Zhang, D., Gao, Q., et al. (2019) Genome structure and evolution of *Antirrhinum majus* L. *Nature Plants*, **5**, 174–183.

Liberal, I.M., Burrus, M., Suchet, C., Thébaud, C. and Vargas, P. (2014) The evolutionary history of *Antirrhinum* in the Pyrenees inferred from phylogeographic analyses. *BMC Evol. Biol.*, **14**, 146.

Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1675–1680.

Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Cosey, L. and Coen, E. (1996) Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, **383**, 794–799.

Luo, D., Coen, E.S., Doyle, S. and Carpenter, R. (1991) Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.*, **1**, 59–69.

Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2012) Quantitative levels of *Deficiens* and *Globosa* during late petal

development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal*, **72**.

Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **72**, 294–307.

Manchado-Rojo, M., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2014) Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*, **12**.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. and Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 6422–7.

Mitsunami, T., Nishihara, M., Galis, I., et al. (2014) Overexpression of the PAPI Transcription Factor Reveals a Complex Regulation of Flavonoid and Phenylpropanoid Metabolism in Nicotiana tabacum Plants Attacked by Spodoptera litura. *PLOS ONE*, **9**, e108849.

Mizukami, Y. and Fischer, R.L. (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 942–947.

Mizzotti, C., Galliani, B.M. and Masiero, S. (2014) The backstage of the ABC model: The Antirrhinum majus contribution. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, **148**, 176–186.

Nacken, W.K.F., Piotrowiak, R., Saedler, H. and Sommer, H. (1991) The transposable element Tam1 from Antirrhinum majus shows structural homology to the maize transposon En/Spm and has no sequence specificity of insertion. *Molec. Gen. Genet.*, **228**, 201–208.

Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., et al. (2005) Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, **132**, 4107–4118.

Nath, U., Crawford, B.C.W., Carpenter, R. and Coen, E. (2003) Genetic control of surface curvature. *Science (New York, N.Y.)*, **299**, 1404–7.

Navarro, C., Efremova, N., Golz, J.F., Rubiera, R., Kuckenberg, M., Castillo, R., Tietz, O., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z. (2004) Molecular and genetic interactions between STYLOSA and GRAMINIFOLIA in the control of Antirrhinum vegetative and reproductive development. *Development*, **131**, 3649–3659.

Niazi, N.K., Bibi, I., Fatimah, A., et al. (2017) Phosphate-assisted phytoremediation of arsenic by Brassica napus and brassica juncea: Morphological and physiological response. *International journal of phytoremediation*, **19**, 670–678.

Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P. and Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, **369**, 661–4.

Noman, A., Aqeel, M., Deng, J., Khalid, N., Sanaullah, T. and Shuilin, H. (2017) Biotechnological Advancements for Improving Floral Attributes in Ornamental Plants. *Frontiers in plant science*, **8**, 530–530.

O'Neill, S.D. (1997) POLLINATION REGULATION OF FLOWER DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 547–574.

Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., et al. (2006) Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 11075–11080.

- Parkinson, J. and Blaxter, M.** (2009) Expressed sequence tags: an overview. *Methods Mol. Biol.*, **533**, 1–12.
- Petanidou, T. and Smets, E.** (1996) Does temperature stress induce nectar secretion in Mediterranean plants? *New Phytologist*, **133**, 513–518.
- Philosoph-Hadas, S., Friedman, H., Meir, S., Berkovitz-SimanTov, R., Rosenberger, I., Halevy, A.H., Kaufman, P.B., Balk, P. and Woltering, E.J.** (2001) Gravitropism in cut flower stalks of snapdragon. *Adv Space Res*, **27**, 921–932.
- Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Rosenberger, I. and Halevy, A.H.** (1995) Control and regulation of the gravitropic response of cut flowering stems during storage and horizontal transport. *Acta Hortic.*, 343–350.
- Putterill, J., Laurie, R. and Macknight, R.** (2004) It's time to flower: the genetic control of flowering time. *BioEssays*, **26**, 363–373.
- Quesada, M., Bollman, K. and Stephenson, A.G.** (1995) Leaf Damage Decreases Pollen Production and Hinders Pollen Performance in Cucurbita Texana. *Ecology*, **76**, 437–443.
- Reale, L., Porceddu, A., Lanfaloni, L., Moretti, C., Zenoni, S., Pezzotti, M., Romano, B. and Ferranti, F.** (2002) Patterns of cell division and expansion in developing petals of *Petunia hybrida*. *Sexual Plant Reproduction*, **15**, 123–132.
- Reeves, P.H., Ellis, C.M., Ploense, S.E., et al.** (2012) A regulatory network for coordinated flower maturation. M. F. Yanofsky, ed. *PLoS genetics*, **8**, e1002506.
- Reezi, S., Babalar, M. and Kalantari, S.** (2009) Silicon alleviates salt stress, decreases malondialdehyde content and affects petal color of salt- stressed cut rose (*Rosa xhybrida* L.) 'Hot Lady.' , 7.
- Reimand, J., Kull, M., Peterson, H., Hansen, J. and Vilo, J.** (2007) g:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res*, **35**, W193–W200.
- Reinhardt, D., Mandel, T. and Kuhlemeier, C.** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, **12**, 507–518.
- Reverté, S., Retana, J., Gómez, J.M. and Bosch, J.** (2016) Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of botany*, **118**, 249–57.
- Rodriguez, R.E., Mecchia, M.A., Debernardi, J.M., Schommer, C., Weigel, D. and Palatnik, J.F.** (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development (Cambridge, England)*, **137**, 103–12.
- Rodriguez-Saona, C., Parra, L., Quiroz, A. and Isaacs, R.** (2011) Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees. *Annals of botany*, **107**, 1377–90.
- Rosenzweig, C., Elliott, J., Deryng, D., et al.** (2014) Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *PNAS*, **111**, 3268–3273.
- Rothmaler, W.** (1956) *Taxonomische Monographie der Gattung Antirrhinum* Feddes Rep., Berlin: Akademie Verlag.
- Ruiz-Hernández, V., Hermans, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2017) Genetic analysis of natural variation in *Antirrhinum* scent profiles identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE as the major locus controlling methyl benzoate synthesis. *Frontiers in Plant Science*, **8**.
- Ruiz-Ramón, F., Águila, D.J., Egea-Cortines, M. and Weiss, J.** (2014) Optimization of fragrance extraction: Daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Industrial Crops and Products*, **52**.

- Ruiz-Ramon, F., Águila, D.J.D.J., Egea-Cortines, M., Weiss, J., Ruíz-Ramón, F., Águila, D.J.D.J., Egea-Cortines, M. and Weiss, J.** (2014) Optimization of fragrance extraction: daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Industrial Crops and Products*, **52**, 671–78.
- Saedler, H., Becker, A., Winter, K.-U., Kirchner, C. and Theißen, G.** (2001) MADS-box genes are involved in floral development and evolution. , 8.
- Sagae, M., Oyama-Okubo, N., Ando, T., Marchesi, E. and Nakayama, M.** (2008) Effect of temperature on the floral scent emission and endogenous volatile profile of *Petunia axillaris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **72**, 110–5.
- Samman, N.A., Martin, A. and Puech, S.** (2001) Inflorescence architecture variability and its possible relationship to environment or age in a Mediterranean species, *Euphorbia nicaeensis* All. (Euphorbiaceae). *Bot J Linn Soc*, **136**, 99–105.
- Sanders, P.M.** (2000) The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 Gene Encodes an Enzyme in the Jasmonic Acid Synthesis Pathway. *THE PLANT CELL ONLINE*, **12**, 1041–1062.
- Scalliet, G., Lionnet, C., Behec, M.L., et al.** (2006) Role of Petal-Specific Orcinol O-Methyltransferases in the Evolution of Rose Scent. *Plant Physiology*, **140**, 18–29.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jurgens, G. and Laux, T.** (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, **100**, 635–644.
- Schruff, M.C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N. and Scott, R.J.** (2006) The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs. *Development (Cambridge, England)*, **133**, 251–61.
- Schuurink, R.C., Haring, M.A., Clark, D.G., et al.** (2006) Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends in Plant Science*, **11**, 20–25.
- Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. and Hudson, A.** (2003) An everlasting pioneer: the story of *Antirrhinum* research. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 657–666.
- Schwarz-Sommer, Z., Gübitz, T., Weiss, J., Gómez-di-Marco, P., Delgado-Benarroch, L., Hudson, A. and Egea-Cortines, M.** (2010) A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. *BMC Plant Biology*, **10**.
- Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. and Sommer, H.** (1990) Genetic Control of Flower Development by Homeotic Genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, **250**, 931–936.
- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., et al.** (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant cell*, **18**, 831–51.
- Sharp, R.E.** (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 33–37.
- Shpak, E.D., Berthiaume, C.T., Hill, E.J. and Torii, K.U.** (2004) Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls Arabidopsis organ growth and flower development by promoting cell proliferation. *Development (Cambridge, England)*, **131**, 1491–501.
- Sommer, H., Beltrán, J.P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W.E., Saedler, H. and Schwarz-Sommer, Z.** (1990) Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J*, **9**, 605–613.
- Spiller, M., Berger, R.G. and Debener, T.** (2010) Genetic dissection of scent metabolic profiles in diploid rose populations. *Theor. Appl. Genet.*, **120**, 1461–1471.

- Spitzer-Rimon, B., Farhi, M., Albo, B., et al.** (2012) The R2R3-MYB-Like Regulatory Factor EOBI, Acting Downstream of EOBI, Regulates Scent Production by Activating ODO1 and Structural Scent-Related Genes in *Petunia*. *The Plant Cell*, **24**. Available at: <http://www.plantcell.org/content/24/12/5089>.
- Stubbe, H.** (1966) Genetics and cytology of *Antirrhinum* L. sect. *Antirrhinum*.
- Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C. and Chave, J.** (2010) Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 1015–1027.
- Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N.J., Corsar, J., Roberts, K. and McCann, M.C.** (2002) DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Current biology : CB*, **12**, 1782–6.
- Sutton, D.A.** (1988) *A revision of the tribe Antirrhineae* B. M. (Natural History), ed., Michigan.
- Torres, E., Iriando, J.M., Escudero, A. and Pérez, C.** (2003) Analysis of within-population spatial genetic structure in *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.*, **90**, 1688–1695.
- Tripathi, S.K. and Tuteja, N.** (2007) Integrated Signaling in Flower Senescence. *Plant Signal Behav*, **2**, 437–445.
- Tröbner, W., Ramirez, L., Motte, P., Hue, I., Huijser, P., Lönig, W. e., Saedler, H., Sommer, H. and Schwarz-Sommer, Z.** (1992) GLOBOSA: a homeotic gene which interacts with DEFICIENS in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis. *The EMBO Journal*, **11**, 4693–4704.
- Uchida, N., Lee, J.S., Horst, R.J., Lai, H.-H., Kajita, R., Kakimoto, T., Tasaka, M. and Torii, K.U.** (2012) Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 6337–42.
- Varaud, E., Brioude, F., Szecsi, J., Leroux, J., Brown, S., Perrot-Rechenmann, C. and Bendahmane, M.** (2011) AUXIN RESPONSE FACTOR8 Regulates *Arabidopsis* Petal Growth by Interacting with the bHLH Transcription Factor BIGPETALp. *Plant Cell*, **23**, 973–983.
- Vargas, P., Carrió, E., Guzmán, B., Amat, E. and Güemes, J.** (2009) A geographical pattern of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae) speciation since the Pliocene based on plastid and nuclear DNA polymorphisms. *Journal of Biogeography*, **36**, 1297–1312.
- Vargas, P., Ornos, C., Ortiz-Sánchez, F.J. and Arroyo, J.** (2010) Is the occluded corolla of *Antirrhinum* bee-specialized? *Journal of Natural History*, **44**, 1427–1443.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W.** (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science*, **270**, 484–487.
- Wang, D., Cao, G., Fang, P., Xia, L. and Cheng, B.** (2017) Comparative transcription analysis of different *Antirrhinum* phyllotaxy nodes identifies major signal networks involved in vegetative-reproductive transition. *PLoS One*, **12**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5453694/> [Accessed June 11, 2019].
- Wang, Z., Gerstein, M. and Snyder, M.** (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**, 57–63.
- Webb, D.A.** (1971) Taxonomic notes on *Antirrhinum* L. *Bot. J. Linn. Soc.*, **64**, 271–275.
- Weiss, J., Mühlemann, J.K., Ruiz-Hernández, V., Dudareva, N. and Egea-Cortines, M.** (2016) Phenotypic space and variation of floral scent profiles during late flower development in *Antirrhinum*. *Frontiers in Plant Science*, **7**.
- White, D.W.R.** (2006) PEAPOD regulates lamina size and curvature in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 13238–43.

- Whitney, H.M., Bennett, K.M.V., Dorling, M., Sandbach, L., Prince, D., Chittka, L. and Glover, B.J.** (2011) Why do so many petals have conical epidermal cells? *Ann Bot*, **108**, 609–616.
- Widemann, E., Smirnova, E., Aubert, Y., Miesch, L. and Heitz, T.** (2016) Dynamics of Jasmonate Metabolism upon Flowering and across Leaf Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plants (Basel)*, **5**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4844418/> [Accessed June 19, 2019].
- Wienand, U., Sommer, H., Schwarz, Zs., et al.** (1982) A general method to identify plant structural genes among genomic DNA clones using transposable element induced mutations. *Molec Gen Genet*, **187**, 195–201.
- Wilson, Y. and Hudson, A.** (2011) The evolutionary history of *Antirrhinum* suggests that ancestral phenotype combinations survived repeated hybridizations. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **66**, 1032–43.
- Xue, Y., Carpenter, R., Dickinson, H.G. and Coen, E.S.** (1996) Origin of allelic diversity in *antirrhinum* S locus RNases. *The Plant Cell*, **8**, 805–814.
- Yeaman, R.L., Roulston, T.H. and Carr, D.E.** (2014) Pollen quality for pollinators tracks pollen quality for plants in *Mimulus guttatus*. *Ecosphere*, **5**, art91–art91.
- Yeh, D.M., Lin, L. and Wright, C.J.** (2000) Effects of mineral nutrient deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot:root ratio of *Spathiphyllum*. *Scientia Horticulturae*, **11**.
- Zenoni, S., Fasoli, M., Torielli, G.B., et al.** (2011) Overexpression of PhEXPA1 increases cell size, modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in *Petunia hybrida*. *New Phytol*, **191**, 662–677.
- Zhao, D. and Tao, J.** (2015) Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Front Plant Sci*, **6**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410614/> [Accessed July 31, 2019].
- Zheng, S.-H., Nakamoto, H., Yoshikawa, K., Furuya, T. and Fukuyama, M.** (2002) Influences of High Night Temperature on Flowering and Pod Setting in Soybean. *Plant Production Science*, **5**, 215–218.
- Zvi, M.M.B., Shklarman, E., Masci, T., Kalev, H., Debener, T., Shafir, S., Ovadis, M. and Vainstein, A.** (2012) PAP1 transcription factor enhances production of phenylpropanoid and terpenoid scent compounds in rose flowers. *New Phytologist*, **195**, 335–345.

OBJETIVOS

Capítulo 1

El objetivo de este capítulo es analizar la influencia y las vías de señalización de un señal ambiental, el hacinamiento, en el rendimiento de meristemo al nivel del tamaño y número de los órganos laterales producidos por *Antirrhinum majus*. La investigación incluye el fenotipado y el análisis transcriptómico en condiciones de hacinamiento frente a condiciones control basado en el análisis de micromatrices y PCR cuantitativa de genes implicados en el mantenimiento del meristemo, la división celular, la señalización de la auxina, y la señalización y síntesis del ácido jasmónico y abscísico.

Capítulo 2

Este capítulo tiene como objetivo el análisis del efecto de temperatura sobre el desarrollo floral en *Antirrhinum majus*, debido a las consecuencias profundas que los cambios en este parámetro medioambiental pueden provocar desde la perspectiva ecológica como económica (polinización y productividad; valor ornamental). La investigación consiste en un análisis exhaustivo del efecto de bajas y altas temperaturas sobre diversos parámetros de la calidad floral en *Antirrhinum majus*, incluido el número, el tamaño y el color de las flores, la viabilidad del polen y la producción de volátiles florales.

Capítulo 3

Este capítulo está dedicado al análisis de los efectos de la temperatura en el desarrollo de las flores en *A. majus* desde la perspectiva transcriptómica. Basado en el conocimiento previo sobre cambios anatómicos, fisiológicos y metabólicos, así como en base de cambios transcriptómicos observados bajo otras condiciones de estrés abiótico en *A. majus*, se investiga el patrón de expresión cuantitativa de genes relacionados con la producción de antocianinas, el tamaño celular, la estructura celular y la emisión de VOCs en dos etapas del desarrollo de la flor.

CAPÍTULO 1– Mantenimiento de meristemas, rutas de auxinas, ácido jasmónico y ácido abscísico como mecanismo para la plasticidad fenotípica en *Antirrhinum majus*

Meristem maintenance, auxin, jasmonic and abscisic acid pathways as a mechanism for phenotypic plasticity in *Antirrhinum majus*

Julia Weiss, Raquel Alcantud-Rodríguez, Tugba Toksöz and Marcos Egea-Cortines

Scientific Reports | 6:19807 | DOI: 10.1038/srep19807

1.1.- Resumen

Las plantas crecen bajo condiciones climáticas cambiantes que causan modificaciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo. El grado de cambios en el desarrollo de los órganos, es decir, su plasticidad fenotípica, parece estar determinado por la identidad del órgano y el tipo de señal ambiental. Utilizamos la competencia intraespecífica y descubrimos que *Antirrhinum majus* se comporta como una especie clásica desacoplada para el tamaño y número de los órganos laterales. El hacinamiento causa una disminución en el tamaño de la hoja y un aumento en el número de hojas, mientras que el tamaño de la flor es generalmente robusto y el número de flores se reduce. Los genes implicados en el mantenimiento de meristemas apicales como *ROA* y *HIRZ*, ciclo celular (*CYCD3a*; *CYCD3b*, *HISTONE H4*) o polaridad de órganos (*GRAM*) no mostraron un cambio significativo en la expresión en condiciones de hacinamiento. Un análisis transcriptómico del tejido de meristemo de inflorescencia en condiciones de hacinamiento mostró rutas enriquecidas sobreexpresadas, según “Gene ontology” (ontología de genes), incluyendo la síntesis y / o señalización de ácido jasmónico y abscísico. Los genes implicados en la síntesis de auxinas como *AmTAR2* y en la señalización, *AmANT*, no se vieron afectados por el hacinamiento. En contraste, *AmJAZ1*, *AmMYB21*, *AmOPCL1* y *AmABA2* aumentaron significativamente la expresión. Nuestro trabajo proporciona una hipótesis de trabajo mecanicista en la que el desacoplamiento del crecimiento vegetativo y reproductivo puede ser el resultado de un SAM robusto y una señalización de auxina estable que permite un tamaño floral homogéneo, mientras que los cambios en la señalización de JA y ABA pueden ser responsables de la disminución del tamaño de la hoja y del número de flores.

1.2.- Introducción

A diferencia de los animales, las plantas producen órganos a lo largo del desarrollo y las condiciones ambientales juegan un papel clave en el tamaño y el tipo de órganos producidos. El grado de plasticidad del desarrollo de los órganos laterales parece estar determinado por una combinación de la identidad del órgano, la especie en estudio y el tipo de condiciones ambientales que pueden afectar su ontogenia. Algunos órganos son muy robustos y muestran poca variación. Un mecanismo propuesto para establecer rasgos robustos es la existencia de redundancia genética y redes genéticas altamente interactivas (Das Gupta *et al.*, 2014). La otra cara de la moneda es la plasticidad. Muchos procesos de desarrollo son altamente plásticos (Miner *et al.*, 2005), como la formación de raíces, el desarrollo de las hojas o el tiempo de floración, ya que responden a señales ambientales.

Los órganos aéreos tales como hojas y flores se generan a partir del meristemo apical (SAM). Las plantas pueden mostrar adaptación a los entornos cambiantes en el SAM a través de la modificación del número y / o tamaño del órgano. Las células producidas en el SAM se desplazan a posiciones laterales y se reclutan para formar primordios de órganos laterales. En *Antirrhinum majus*, las células madre se mantienen indiferenciadas por el gen homeobox *ROSULATA (ROA)* (Kieffer *et al.*, 2006), expresado en el centro quiescente, justo debajo del meristemo apical del tallo. Los ortólogos de *ROA* como *WUSCHEL* de *Arabidopsis* o *TERMINATOR* de *Petunia* muestran una función conservada (Schoof *et al.*, 2000; Stuurman *et al.*, 2002). Las células en el SAM conservan una identidad meristemática debido a la expresión de *HIRZINA (HIRZ)* e *INVAGINATA (INA)* (Golz *et al.*, 2002), dos genes homeobox que pertenecen a la familia *KNOTTED* y *SHOOT MERISTEMLESS*. La identidad de los primordios laterales dependerá de la etapa de desarrollo del SAM. Si se inicia el programa floral, los primordios laterales adoptarán una identidad floral.

El desarrollo de los órganos laterales parece ser iniciado por un aumento en los niveles locales de auxinas (Reinhardt *et al.*, 2000). Los cambios locales en la síntesis de auxinas pueden ser importantes en la adaptación al medio ambiente, ya que el gen de síntesis de auxinas de *Arabidopsis* *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE 1 (TAA1)* desempeña un papel en la evitación de la sombra (Tao *et al.*, 2008). El factor de transcripción tipo AP2, *AINTEGUMENTA*, tiene una doble función en la activación de

los genes de polaridad y el establecimiento de la identidad del órgano floral (Nole-Wilson y Krizek, 2006). También desempeña un papel en el tamaño del órgano lateral mediante el control de la división celular y la expansión en *Arabidopsis*, *Petunia* y *Antirrhinum* (Krizek, 1999; Mizukami y Fischer, 2000; Manchado-Rojo *et al.*, 2014), y se encuentra aguas abajo de la vía de señalización de la auxina (Hu *et al.*, 2003). A medida que se inician los órganos laterales, los genes de polaridad de los órganos toman el control y una combinación de factores de transcripción y ARNsi establecen los planos de crecimiento de los órganos laterales (Husbands *et al.*, 2009). Los genes *YABBY* cumplen un papel clave en el establecimiento de la polaridad próxima-distal de la formación de órganos laterales y, en *Antirrhinum*, el gen *GRAMINIFOLIA* desempeña una función en la formación de órganos laterales (Golz *et al.*, 2004).

Los órganos florales se forman como resultado de la expresión coordinada de varios genes que dan lugar a sépalos, pétalos, estambres y carpelos cuya identidad se establece mediante combinaciones de genes de la caja MADS (Irish, 2017). La activación adecuada de los genes de la caja MADS también es responsable del tamaño final y la forma de los órganos florales, y desempeña un papel clave en el mantenimiento de la división y expansión celular básica en la flor (Dornelas *et al.*, 2011; Manchado-Rojo *et al.*, 2012).

Si bien se entiende el funcionamiento básico del mantenimiento del meristemo, la influencia de las señales ambientales en el rendimiento de meristemo, como una combinación de formación de órganos laterales y órganos que alcanzan cierto tamaño, no se conoce. Tanto el estrés biótico como el abiótico tienden a causar una disminución en el número y / o tamaño de los órganos laterales producidos por las plantas. Se cree que la integración del estrés se produce a través de cambios en los niveles de los reguladores del crecimiento de las plantas como los brasinoesteroides, el ácido jasmónico (JA), el ácido abscísico (ABA) o las auxinas, todas las cuales pueden mostrar interacciones entre sí (Divi *et al.*, 2010; Krishna, 2003). Por lo tanto, los cambios en la señalización pueden explicar la actividad del SAM modificada.

Encontramos por casualidad que el tamaño de la flor de *Antirrhinum majus* era robusto y altamente resistente a los cambios en diferentes condiciones de crecimiento, mientras que el desarrollo vegetativo, específicamente el tamaño de la hoja, se vio

fuertemente afectado por las condiciones ambientales. Establecimos un sistema basado en el hacinamiento de plantas, usado en ecología y en agricultura para probar sus efectos en el número y tamaño de las flores. El análisis de la expresión génica mostró pocos o ningún cambio en los genes implicados en el mantenimiento del meristemo, la división celular y la señalización de la auxina, lo que sugiere que la robustez del tamaño del órgano floral depende de la homeostasis del meristemo. Un análisis transcriptómico general mostró el enriquecimiento y la sobreexpresión de los genes implicados en la señalización y síntesis del ácido jasmónico y abscísico. Estos cambios pueden ser responsables de la disminución del tamaño de las hojas y los números florales que se produjeron como adaptación a la competencia intraespecífica.

1.3.- Material y Métodos

Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos.

Semillas de *Antirrhinum majus*, línea 165E, se germinaron en vermiculita fina y se trasplantaron, después de dos semanas hasta las condiciones de crecimiento finales, en macetas. Las plantas se regaron según lo requerido con un sistema de riego por goteo automático en un invernadero. Trasplantamos 40 macetas (650 ml de volumen) con una planta y 20 con cinco o diez plantas cuando surgió el primer par de hojas verdaderas. Los diferentes parámetros vegetativos se midieron en 30 individuos cuando las plantas florecieron y al menos una flor en el tallo primario se había abierto. El veintitrés por ciento de las plantas en el tratamiento de 10 plantas / macetas desarrollaron un número completo de hojas, pero no florecieron y se incluyeron en las mediciones del tamaño de la planta.

Mediciones de plantas

La altura total se midió desde la base hasta la parte superior de las plantas. La cinética de crecimiento se registró midiendo la altura de la planta cada 7-14 días. Una vez que se formaron los meristemas de inflorescencia, se midieron parámetros vegetativos adicionales. Se contaron las hojas, incluidas las hojas en la parte vegetativa doble decusada y las hojas individuales organizadas en espiral en la inflorescencia. Las brácteas que sustentan las flores no se contaban como hojas.

Las hojas y las brácteas de las plantas se cortaron lo más cerca posible del tallo y todas juntas se ordenaron en una hoja de papel tamaño DIN-A4 utilizando una regla como estándar interno. Las hojas se escanearon y el área de la hoja se analizó mediante el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Una vez que los órganos florales estaban desarrollados completamente (Vincent y Coen, 2004), el tamaño de los diferentes órganos y partes de la flor se midió con un calibre milimétrico como se había descrito anteriormente (Delgado-Benarroch et al., 2009b). Los parámetros medidos fueron: 1, longitud del tubo; 2, longitud del pétalo ventral; 3, altura del pétalo; 4, longitud del sépalo; 5, ancho del tubo; 6, longitud del pétalo dorsal; 7, expansión del pétalo ventral; 8, expansión del pétalo dorsal; 9, longitud del estambre y 10, longitud del gineceo.

Análisis estadístico

Realizamos el análisis estadístico con el programa R (www.r-project.org), comparando 10 plantas / maceta contra 1 planta / maceta. Se utilizó ANOVA de una vía para todos los parámetros que mostraron una distribución normal, y el 'Análisis de Kruskal y Wallis' en caso de que uno de los parámetros en comparación se desviara de una distribución normal. Los parámetros se consideraron significativamente diferentes entre los tratamientos cuando el valor de P fue menor que 0.05.

Análisis de Microarray

Se tomaron muestras de los meristemos apicales de inflorescencia de las plantas de *Antirrhinum* cuando se abrió la primera flor, se extrajo el ARN total y se sintetizó el ADNc de la primera hebra como se había descrito anteriormente (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). Recolectamos suficientes meristemos apicales para obtener 60-100 mgr de tejido. El número de meristemos requeridos fue de aproximadamente 50. Como la cantidad de ARNm obtenida y el ADNc fue muy bajo (0.1-1 ngr), utilizamos la Amplificación por Desplazamiento Múltiple para obtener suficiente ADNc para el análisis de micromatrices como se describió anteriormente (Renard *et al.*, 2008). El análisis de micromatrices se realizó por MoGene con dos muestras de control y tres muestras de hacinamiento

utilizando una micromatriz basada en 12,497 genes de *Antirrhinum* disponibles públicamente, y que comprende 11959 genes únicos de *A.majus* (número de acceso Omnibus GSE36356) (Bey *et al.*, 2004; Muhlemann *et al.*, 2012). Los datos de micromatrices se depositaron en la base de datos ómnibus de expresión génica de NCBI (número de acceso GSE72818).

Análisis bioinformático

Los genes identificados en *Antirrhinum* se compararon mediante TBLASTN frente a *Arabidopsis* utilizando secuencias traducidas. Para determinar el grado de homología y la ortología de las secuencias utilizadas para Q-PCR, descargamos las secuencias obtenidas por TBLASTN de NCBI. Las secuencias de proteínas se alinearon utilizando CLUSTALX, y los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el algoritmo de “Neighbour Joining” (Larkin *et al.*, 2007). Los árboles se representaron con NJPlot (Perrière y Gouy, 1996). Los genes con diferencias significativas en la expresión génica se analizaron con BLAST2GO (Götz *et al.*, 2008) y los genes anotados correspondientes se utilizaron para crear un conjunto de ortólogos de *Arabidopsis* conservados. Los ortólogos de *Arabidopsis* con cambios significativos en la expresión génica se utilizaron para identificar vías definidas en “Gene Ontology” (ontología de genes) utilizando g:Profiler (Reimand *et al.*, 2011).

PCR cuantitativa

Los genes se amplificaron en la máquina “Stratagene Mx3000 qPCR (www.agilent.com)”, con cebadores específicos de las secuencias (Tabla S4) sintetizados por Invitrogen (www.invitrogen.com) utilizando Takara SYBR-Green (www.thermofishcer.com). Utilizamos el gen ubiquitina como control para la normalización (Manchado-Rojo *et al.* 2012). La eficiencia de la PCR se calculó como se describió anteriormente (Mallona *et al.*, 2011). El análisis estadístico de la expresión génica se realizó mediante una comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002). Realizamos dos experimentos independientes con tres réplicas biológicas y dos técnicas.

1.4.- Resultados

Efecto del hacinamiento en el crecimiento y desarrollo.

Hemos encontrado previamente que la eliminación masiva de las hojas tiene poco o ningún efecto sobre el tamaño floral en *Antirrhinum majus* (Bayo-Canha *et al.*, 2007). En un gran conjunto de poblaciones F2 utilizadas para crear un mapa de *Antirrhinum* (Schwarz-Sommer *et al.*, 2010), encontramos que las plantas que quedaron en macetas pequeñas, después de haberlas trasplantado a macetas más grandes donde se llevaron a cabo las análisis de segregaciones, terminaron con un tamaño vegetativo muy pequeño, pero el tamaño floral parecía ser normal. Los experimentos se llevaron a cabo varias veces en otoño, invierno y primavera para estimar los efectos del hacinamiento en el desarrollo y para verificar las observaciones preliminares. Utilizamos macetas con 1, 5 o 10 plantas, pero realizamos todos los análisis en el control (1 planta por maceta) y el tratamiento más extremo (10 plantas por maceta).

El crecimiento de las plantas sujetas a hacinamiento se analizó durante el desarrollo (Tabla 1). Medimos la longitud de los tres primeros entrenudos y encontramos que eran significativamente más cortos (Tabla 1), lo que indica que el efecto del hacinamiento en el crecimiento se produjo desde las primeras etapas de desarrollo. Un análisis cinético detallado de la longitud del tallo mostró que en las primeras etapas de crecimiento (8 días), las plantas en condición de hacinamiento eran significativamente más cortas que los controles ($P = 0.0321$). Sin embargo, esta tendencia se abrogó durante el crecimiento posterior a partir del día 15 en adelante. Las plantas en condición de hacinamiento alcanzaron la altura de las plantas control y las diferencias no fueron significativas (Fig.1a).

Los cambios de doble decusado a una filotaxis en espiral se han descrito en *Antirrhinum* como un punto de transición floral (Bradley *et al.*, 1996a). No observamos cambios en el número de hojas de doble decusado, lo que indica que la transición a la flor no se vio afectada por las condiciones de hacinamiento (Tabla 1). Sin embargo, encontramos un aumento significativo en el número de hojas en espiral antes de que aparecieran los primordios de las flores ($p < 0.05$), lo que apunta a una adquisición tardía del programa floral en el SAM. Como resultado, el número total de hojas producidas bajo hacinamiento

fue significativamente mayor ($p < 0.01$). El área foliar se redujo significativamente, lo que indica que a pesar del aumento en el número de hojas, hubo una fuerte reducción en el tamaño.

Tabla 1. Efecto del hacinamiento sobre el crecimiento vegetativo en *Antirrhinum majus*. Los valores representan la media \pm desviación estándar. Diferencias expresadas como tratamiento versus control 100%. Realizamos pruebas T student. Los valores de p corresponden a * $p < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$. Las mediciones corresponden a 30 individuos por tratamiento. 8.13 ± 4.71

	Entrenudo 1	Entrenudo 2	Entrenudo 3	Altura total	Número de flores	Hojas doble decusadas	Hojas en espiral	Hojas total	Área de hojas (cm ²)
1	1.54 \pm 0.2	2.35 \pm 0.38	2.99 \pm 0.38	479 \pm 5	16.97 \pm 3.3	7.20 \pm 1.27	5.63 \pm 3.66	12.83 \pm 2.56	145.70 \pm 25
10	1.35 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	2.72 \pm 0.57	295 \pm 5	8.13 \pm 4.71	6.96 \pm 1.49	8.30 \pm 3.44	15.26 \pm 2.42	105.18 \pm 28
1 vs 10	-12.18**	-14.62***	-8.89***	-38.33***	-52.08***	-3.38	47.41*	18.92**	-27.81***

Medimos diez parámetros que describen el tamaño floral (Fig.1b). Dos parámetros florales, la longitud del sépalo y la expansión del pétalo dorsal fueron significativamente mayores en las plantas en hacinamiento (Tabla 2). Tanto estambre como la longitud de gineceo fueron significativamente más cortos en las plantas en hacinamiento en comparación con las flores de control, aunque las diferencias reales fueron de 5.2% ($P = 0.017$) en estambres y 4.5% en gineceo ($P = 0.023$). El número de flores por planta se redujo fuertemente a 52% en condiciones de hacinamiento ($P = 0.001$) (Tabla 1). Para evaluar una relación causa-efecto entre las variaciones del área foliar y la producción de flores, se realizó un análisis de correlación entre ambos caracteres. Las plantas cultivadas en condiciones normales no mostraron ningún tipo de correlación entre el número de flores y el área foliar (coeficiente de Spearman 0.0629, $p = 0.739$), pero en condiciones de hacinamiento encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa ($p = 0.013$). El bajo valor del coeficiente de Spearman (0.5853) sugiere que existen otros factores que afectan la producción de números florales en hacinamiento más allá de la reducción del área foliar.

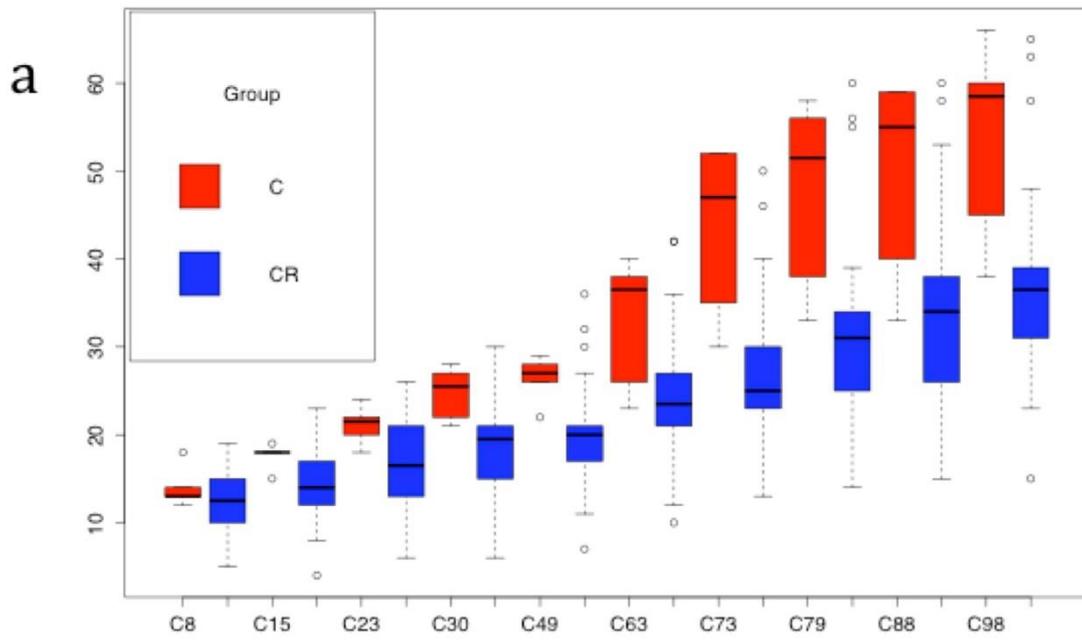


Figura 1 (a), La cinética de crecimiento de plantas control (C) y plantas en hacinamiento (CR=crowded). Los números se refieren a días después de la siembra. El eje Y se refiere a la altura en cm. (b), Inflorescencias típicas de plantas en hacinamiento de 1, 5 y 10 plantas por maceta.

Tabla 2. Comparación de parámetros florales entre plantas control y plantas crecidas en hacinamiento. Los valores representan milímetros.

Órgano	Control	Hacinamiento	Valor-p
Longitud del tubo	14.8	15.2	0.706
Longitud del pétalo ventral	25.9	27.3	0.774
Altura del pétalo	22.6	20.5	0.115
Longitud del sépalo;	7.0	7.5	0.044
Ancho del tubo	12.1	11.7	0.175
Longitud del pétalo dorsal	37.3	36.5	0.117
Expansión del pétalo ventral	23.3	23.4	0.963
Expansión del pétalo dorsal	26.9	29.6	0.012
Longitud del estambre	23.5	22.3	0.017
Longitud del gineceo	20.2	19.3	0.023

Efecto del estrés ambiental sobre el mantenimiento básico de meristemos.

Analizamos el efecto del hacinamiento en la expresión génica en los meristemos de inflorescencias que se recolectaron cuando comenzaron a aparecer los primordios florales. Medimos los niveles de expresión génica que definen funciones meristemáticas básicas: mantenimiento meristemático por *ROA* y crecimiento meristemático por *HIRZ*. Encontramos que tanto *HIRZ* como *ROA* mostraron una tendencia hacia una regulación negativa en el hacinamiento, pero esta tendencia no fue significativa (*HIRZ* P = 0.513; *ROA* P = 0.465) (Fig. 2.2). Medimos tres marcadores de división celular, expresados en el SAM y primordios laterales, *CYCLIN D3b* (*CycD3b*), *CYCLIN D3a* (*CycD3a*) (Gaudin *et al.*, 2000) y *HISTONE H4* (*H4*), marcando el índice mitótico (Groot *et al.*, 2005). Tanto *CyCD3a* como *CyCD3b* mostraron una regulación negativa no significativa, lo que indica que los niveles locales de división celular podrían mantenerse en el centro del SAM y los primordios laterales. La expresión de *H4* fue similar en el control y en las plantas en

hacinamiento (nivel de expresión relativo 1.549 P = 0.518), lo que indica que el índice mitótico general no se vio afectado (Fig. 2).

La formación de primordios laterales está marcada en etapas muy tempranas por el gen *YABBY GRAMINIFOLIA*, involucrado en la polaridad del órgano lateral (Golz *et al.*, 2004). Los niveles de expresión de *GRAM* se mantuvieron sin cambios (nivel de expresión relativo 1.004 P = 0.459), lo que indica que el efecto relativo del hacinamiento en la iniciación de los primordios laterales no pudo identificarse por los cambios en los niveles de adquisición de la polaridad del órgano.

En conjunto, podemos concluir que el hacinamiento no tuvo un efecto significativo en los genes de mantenimiento del meristemo, la división celular o el establecimiento de la polaridad de los órganos.

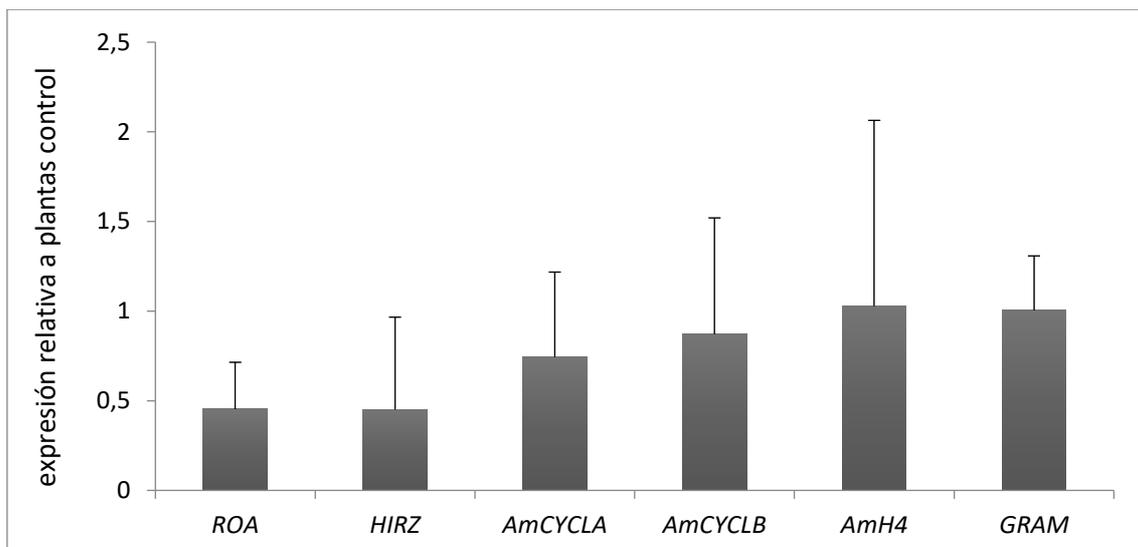


Figura 2. Análisis cuantitativo de expresión de genes involucrados en el mantenimiento de meristemas, división celular y polaridad de órganos en meristemas de inflorescencias bajo condiciones de hacinamiento. El nivel de 1 corresponde a los niveles de expresión en las plantas de control. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Análisis transcriptómico del SAM en condiciones de hacinamiento

Realizamos un análisis transcriptómico a gran escala para descubrir posibles mecanismos de integración del estrés en el SAM. Un total de 1135 genes fueron regulados positivamente y 360 fueron regulados negativamente de forma significativa (Tabla Supl. S1). Un análisis de enriquecimiento de ontología de genes identificó procesos biológicos en los genes regulados positivamente y negativamente (Tabla Supl. S2). A pesar de mostrar un número menor de genes regulados negativamente, el número de términos GO regulados negativamente con diferencia significativa fue sustancialmente mayor con 11 procesos biológicos, 5 componentes celulares y un proceso molecular afectados. Sólo hubo 4 procesos biológicos, 2 componentes celulares y una función molecular con una significativa regulación elevada. Utilizamos los ortólogos de *Arabidopsis* correspondientes para identificar rutas biológicas enriquecidas (Reimand *et al.*, 2011). El resultado del análisis mostró dos conjuntos de genes regulados significativamente, pero no se encontraron rutas discretas reguladas negativamente. Una vía regulada positivamente corresponde a los genes involucrados en la señalización de JA, incluidos los factores de transcripción MYB *JAZ1* y *MYB21* como genes centrales. La segunda vía regulada positivamente se relacionó con la síntesis de ABA y se centró en *ABA2* (Fig. 1.3). Estos resultados indicaron que la señalización en el SAM podría ocurrir a través de JA y ABA. Sorprendentemente, la señalización o síntesis de auxinas aparentemente no se vio afectada. Como se usó la amplificación por desplazamiento múltiple para la amplificación de ADNc y se ha observado sesgos como resultado de esta técnica en moldes ricos en GC (Pinard *et al.*, 2006), probamos varios genes entre los que no aparecieron como modificados significativamente y los que parecían como genes regulados positivamente en el microarray.

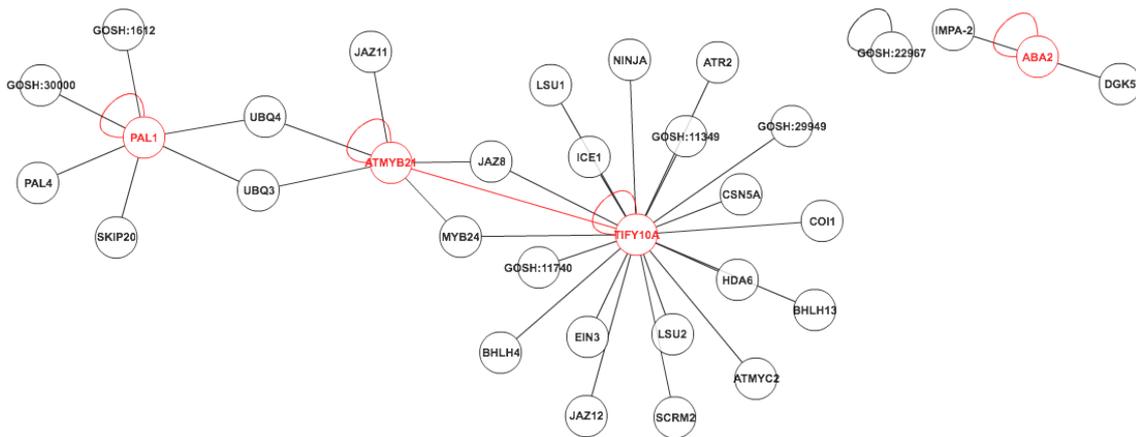


Figura 3. Vías biológicas basadas en GO con un aumento significativo en la expresión génica en plantas en hacinamiento. Genes marcados en rojo son genes que aparecen en la lista como sobre expresados y que interactúan con otros en la lista. Genes marcados en negros indican aquellos genes en la entrada que tienen una interacción pero que no están regulados diferencialmente.

La señalización de auxina no se modifica por el estrés.

Hay varias vías de señalización hormonal que desempeñan un papel en la función del meristemo. Entre ellos, la auxina juega un papel clave en la iniciación de órganos laterales. A pesar de la importancia de las auxinas en la formación de órganos laterales y el desarrollo general de la planta, no hubo cambios evidentes en la expresión de los genes involucrados en la señalización, transporte o síntesis de auxinas. Identificamos 16 genes con anotaciones relacionadas con auxinas (Tabla 3). Sólo dos genes mostraron cambios significativos en la expresión génica. La expresión de *INDOLEACETIC ACID-INDUCED PROTEIN 16* estaba significativamente reprimida (-2,04 veces) y el gen *SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 51* estaba significativamente sobreexpresado (2,03 veces). Los genes con funciones bien establecidas en el transporte de auxinas como *PIN-FORMED 4* o en la transducción de señales como *AUXIN RESISTANT 2* no mostraron diferencias significativas en la expresión génica. Además, dos genes de *Arabidopsis*, *AUXIN INDUCIBLE 2-11*, y *DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1*, aparentemente están duplicados en *Antirrhinum*. Si bien un parólogo estaba sobreexpresado no-significativamente (Snap112107_cn5436 y Snap112107_cn2840), la expresión del segundo estaba reprimida no-significativamente (Snap112107_cn5435 y Snap112107_cn2580) (Tabla 1.3) sugiriendo que, en conjunto, la vía de señalización de la auxina no se vio afectada por el hacinamiento. Identificamos un clon de *Antirrhinum* (AJ794078) con una alta homología a los genes *TRYTOPHAN AMINOTRANSFERASE*

(*TAA*) y *TRYTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED*, involucrados en la síntesis de auxinas y la evitación de la sombra (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008). La expresión de AJ794078 no se vio afectada de manera significativa en la micromatriz (-1.19 veces reprimido). Realizamos un análisis filogenético de AJ794078 para identificar su grado de homología con la familia *TAA1-TAR* de Arabidopsis. El clon *Antirrhinum* se agrupó claramente junto con *TAR2* de Arabidopsis y en un clado diferente de *TAA1* (Fig. S1). Confirmamos el nivel de expresión de *AmTAR2* bajo hacinamiento, que fue prácticamente idéntico a las plantas de control (expresión 0.901; P = 0.498), lo que indica que la biosíntesis de auxina no se vio afectada por el hacinamiento (Fig. 4). Como la señalización de la auxina puede estar localizada en los primordios, se analizó la expresión de *AmAINTEGUMENTA*, un factor de transcripción AP2 involucrado en la señalización de la auxina y la formación de órganos laterales (Delgado-Benarroch et al., 2009a; Manchado-Rojo et al., 2014; Hu et al., 2003). Como ya encontrado en caso de *AmTAR2*, *AmANT* no fue significativamente reprimido (expresión 0.901; P = 0.546) lo que indica que la síntesis de auxinas y la señalización no se vieron afectadas por el tipo de estrés impuesto.

Tabla 3. Los genes relacionados con la auxina en *Antirrhinum* y los cambios en el patrón de expresión bajo el hacinamiento. La regulación indica una regulación positiva o negativa y * indica un cambio significativo en la expresión génica (P < 0.05).

Antirrhinum EST	Arabidopsis best hit and BLAST	eGeneProduct	Regulation
Snap112107_cn1241	At3g04730 9e-70	INDOLEACETIC ACID INDUCES PROTEIN 16	-2.04*
Snap112107_cn2384	At5g20630 1e-70	GERMIN 3	-1.56
Snap112107_cn5435	At5g43700 4e-48	AUXIN INDUCIBLE 2-11	-1.46
Snap112107_cn2580	At1g28330 8e-30	DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1	-1.26
Snap112107_cn1049	At5g65470 1e-111		-1.11
Snap112107_cn5183	At1g54070 2e-04	DORMANCY/AUXIN ASSOCIATED FAMILY PROTEIN	1 07
Snap112107_cn2029	At1g77690 1e-133	LIKE AUX1 3	1 26
Snap112107_cn5444	At2g01420 1e-103	PIN-FORMED4	1 26
Snap112107_cn3718	At1g04240 6e-58	INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3	1 34
Snap112107_cn0753	At1g76520 1e-52	PIN-LIKES 3	1 41
Snap112107_cn1200	At3g23050 1e-85	AUXIN RESISTANT 2	1 46
Snap112107_cn5436	At5g43700 9e-54	AUXIN INDUCIBLE 2-11	1 47
Snap112107_cn5633	At3g09270 4e-36	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 8	1 54
Snap112107_cn2840	At1g28330 2e-28	DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1	1 57
Snap112107_cn4733	At1g72420 1e-70	NADH:UBIQUINONE OXIDOREDUCTASE INTERMEDIATE-ASSOCIATED PROTEIN 30	1 77
Snap112107_cn1577	At1g75580 3e-37	SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 51	2 03*

El hacinamiento activa la señalización de JA y ABA

Se usaron los genes de *Antirrhinum* correspondientes a los genes MYB de Arabidopsis *JAZ1* (AJ787051), *MYB21* (AJ797639) y la alcohol deshidrogenasa de cadena corta *ABA2* / *GIN1* (AJ802690) para verificar el grado de homología de secuencia con los genes de Arabidopsis por análisis filogenético. Se encontró que el EST correspondiente a *AmJAZ1* estaba en un solo clado junto con *AtJAZ1* y *AtJAZ2* (Fig. 5). El supuesto *AmMYB21* se encontró en un clado junto con *AtMYB21* y *AtMYB24* de Arabidopsis y estaba claramente separado de otros genes MYB como *VENOSA* o *ROSEA* involucrados en el patrón de antocianinas e intensidad de color en pétalos (Schwinn *et al.*, 2006). Un análisis de PCR cuantitativo mostró una importante regulación positiva de ambos genes que se correspondía estrechamente con los encontrados en el análisis del micromatriz (Fig. 4). De hecho, *AmMYB21* mostró una sobreexpresión significativa en la micromatriz de 3,43 veces y de 1,84 por qPCR con un valor de p de 0,000. *AmJAZ1* tuvo una regulación positiva de 2,81 en la micromatriz y una regulación positiva de 3,63 en el análisis de qPCR ($p = 0,001$).

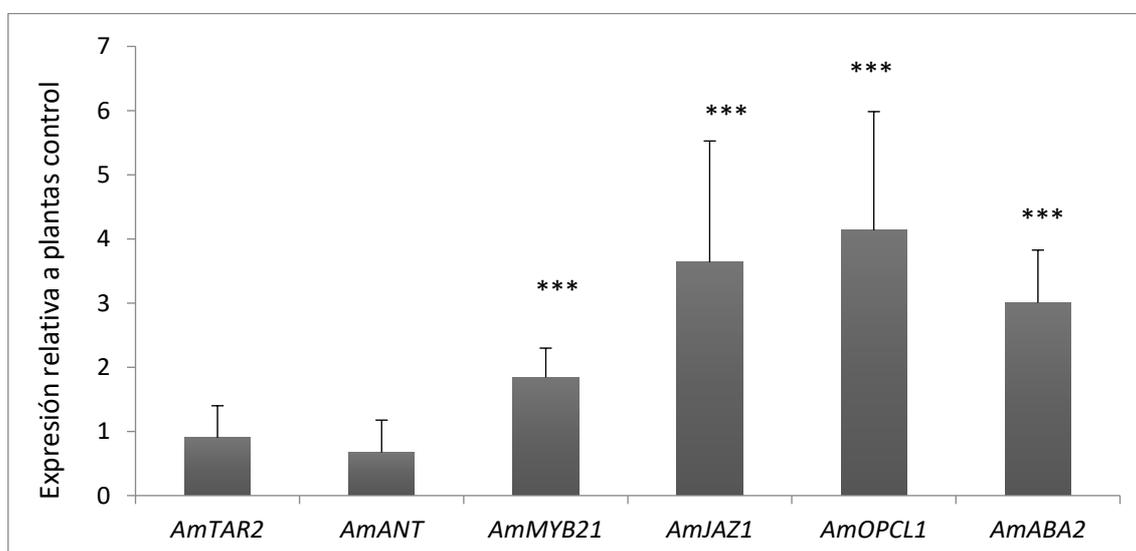


Figura 4. Análisis cuantitativo de expresión de genes implicados en la señalización y síntesis de auxina, JA y de ABA. El nivel de 1 corresponde a los niveles de expresión en las plantas de control.

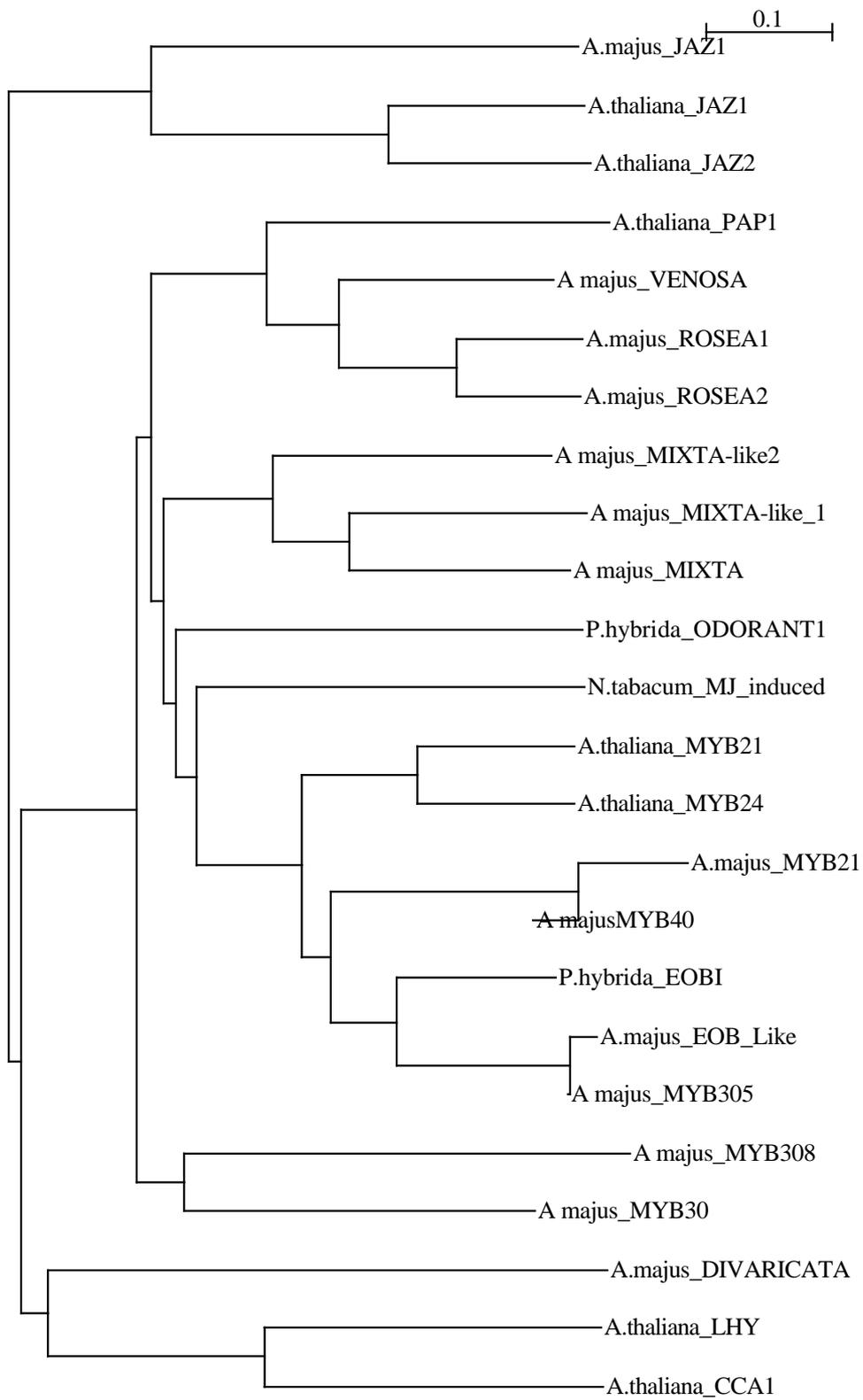


Figura 5. Análisis filogenético de AmJAZ1 y AmMYB21.

Existen varias ligasas C0 de 4-coumarato en *Arabidopsis* y la *OPC-8:0 COA LIGASE1* (*OPCLI*) participa en la biosíntesis del ácido jasmónico. Identificamos un gen de *Antirrhinum* que mostró una alta homología con el gen *OPCLI* de *Arabidopsis*. Confirmamos este hallazgo mediante un análisis filogenético que mostró una alta homología con *OPCLI* y una separación clara de otros clados que contienen otras ligasas de acil CoA que no están involucradas en la síntesis de JA (Fig. S 2). Un análisis de expresión mostró una regulación positiva y significativa en plantas en condición de hacinamiento en comparación con las plantas de control (4,13 veces $P = 0,001$).

El gen *ABA2 / GINI* codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena corta que cataliza la conversión de xantoxina en aldehído abscísico (Cheng *et al.*, 2002; González-Guzmán *et al.*, 2002). Encontramos dos parálogos en *Antirrhinum* (Fig. 4). Uno de ellos (*A.majus* ABA2; AJ802690) mostraba una activación significativa en el análisis de micromatriz (3,13 veces). Se encontró que la expresión del gen correspondiente fue 3,00 veces superior ($p = 0,001$) en los ensayos de qPCR.

Nuestros resultados muestran primero que la amplificación de desplazamiento múltiple puede ser adecuada para la amplificación de genotecas de ADNc. En segundo lugar, tanto la síntesis y señalización de JA como la síntesis de ABA están reguladas positivamente en plantas en hacinamiento, lo que indica que la disminución identificada en el área de la hoja y el número de flores puede ser el resultado de ajustes controlados por estas dos vías. Es posible que se requiera una robusta señalización de auxina y de mantenimiento meristemático para adquirir un tamaño floral normal.

1.5.- Discusión

Hay varios paradigmas en la biología de plantas en relación con el crecimiento y el desarrollo. Uno es el papel del SAM como generador de células que forman primordios de órganos laterales. El segundo es el hecho de que muchas especies muestran correlaciones entre los fenotipos de los órganos vegetativos y reproductivos (Berg, 1959; Armbruster *et al.*, 1999). En tercer lugar, los llamados genes de identidad de órganos florales pueden imponer un programa morfogenético que se cree que es una desviación de una ruta vegetativa por defecto (Dornelas *et al.*, 2011). Las flores y los órganos laterales pueden considerarse como diferentes módulos fenotípicos desde una perspectiva

de desarrollo y evolutiva, siempre que tengan mecanismos de control no acoplados. En el presente trabajo, hemos identificado el potencial de *Antirrhinum majus* como un modelo para estudiar el desacoplamiento del desarrollo vegetativo y reproductivo. La hipótesis actual es que el tamaño floral puede jugar un papel clave en la polinización, y los cambios pueden modificar la condición física. Aunque el número de flores no está relacionado con el área de la hoja en condiciones normales de crecimiento, nuestros resultados muestran claramente que el hacinamiento impone restricciones de crecimiento donde el número de flores depende de alguna manera del área de la hoja (Bayo-Canha *et al.*, 2007). Esto también indica que las pruebas de acoplamiento o desacoplamiento requieren varias condiciones de crecimiento, por lo que pueden aparecer covariaciones como resultado de la limitación de recursos.

Aunque nuestra hipótesis inicial era que los cambios en el número de órgano se reflejarían en los cambios en las funciones básicas del meristemo y en la división celular, nuestros datos demostraron que estábamos equivocados. Nuestra interpretación actual es que el SAM completo tiene una reducción coordinada de las funciones de tal manera que mantiene una relación coherente entre la formación de células madre, el reclutamiento lateral, la división celular y el inicio de primordios. Además, la división celular se controla cuidadosamente en todas las áreas diferentes y no muestra cambios en general. Si el mantenimiento del meristemo y la división celular se mantienen, puede explicar la formación de flores perfectas independientemente de las condiciones de crecimiento.

La señalización y la síntesis de varias hormonas vegetales están involucradas en la función del meristemo, incluidas las auxinas, los brasinoesteroides o el JA. La luz gobierna la división de las células madre mediante cambios locales en los niveles de auxina involucrados en el posicionamiento de las hojas y la filotaxis (Yoshida *et al.*, 2011). Por lo tanto, habríamos esperado cambios en la síntesis o señalización de auxinas. Sin embargo, ni el nivel de transcripción de *AmTAR*, un gen relacionado con la aminotransferasa involucrado en la síntesis de auxina, ni *AmANT*, un gen que responde a la señalización de la auxina y la iniciación del órgano primordial, se alteraron bajo las dos condiciones de tratamiento.

En conjunto, nuestros resultados indican que una fuerte homeostasis del mantenimiento de SAM y la señalización de auxinas puede ser un requisito para el mantenimiento del tamaño floral. El hecho de que el número de hojas no disminuya, mientras que el número

de flores sí lo hace, indica que existen dos mecanismos distintos para el control de los primordios laterales que pueden depender del programa de identidad floral. La fase vegetativa puede depender de un cierto número de órganos laterales que deben alcanzarse para comenzar la floración. Las mutaciones en el tiempo de floración y las condiciones ambientales afectan el número de hojas producidas en *Arabidopsis*, *Antirrhinum* y otras plantas. El programa de identidad floral puede tener un mecanismo intrínseco que controla el número de células por primordio, lo que garantiza el logro del tamaño floral correcto.

La señalización de JA desempeña un doble papel ya que inhibe el crecimiento al suprimir la mitosis en los meristemas apicales (Zhang y Turner, 2008), pero también es necesaria para el desarrollo del estambre (Sanders, 2000; Ishiguro, 2001). Encontramos una regulación positiva y significativa de *AmJAZ1*, *AmMYB21* y *AmMYB24* involucradas en la señalización del ácido jasmónico en varios niveles y de *AmOPCLI* involucrada en los primeros pasos de la síntesis de JA. Las proteínas JAZ son represores de la señalización de JA (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Pero las proteínas JAZ interactúan con *AtMYB21* y *AtMYB24* controlando el desarrollo de la antera (Song *et al.*, 2011). La relación filogenética de *A.majusMYB21* con *P.hybridaEOBI*, *A.majusMYB305* o *P.hybrida_ODORANT1* es lo suficientemente cercana como para sugerir funciones adicionales de *A.majusMYB21*. De hecho, *AtMYB21* se requiere para la síntesis de terpenoides en *Arabidopsis* (Reeves *et al.*, 2012).

En general, el hacinamiento puede considerarse un estrés combinado y se podría esperar que la vía de síntesis de ABA esté regulado positivamente en las plantas de hacinamiento. ABA es un integrador importante del estrés abiótico en plantas (Seki *et al.*, 2007). El gen *ABA2* está involucrado en la síntesis de ABA (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2002) y desempeña un papel adicional en la percepción de azúcar (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Gibson, 2005). La activación de la vía de síntesis de ABA debe ser responsable de mejorar la resistencia al estrés abiótico. Esto se traduce en plantas de *Antirrhinum* con hojas más pequeñas, pero no con menos hojas. También puede definir el ritmo de formación de los órganos laterales una vez que comienza la floración, lo que provoca una disminución general en el número de flores producidas que, por lo demás, son perfectas. A la espera de más pruebas experimentales basadas en la ganancia y la pérdida de la función de los genes involucrados en las vías analizadas, podemos especular

que una combinación de comportamiento robusto de funciones meristemáticas y una expresión plástica de auxinas, JA, ABA puede estar involucrada en la robustez y la plasticidad fenotípica de los órganos aéreos de plantas.

1.6- Referencias

- Bayo-Canha, A., Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2007) Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but not floral size in *Antirrhinum majus*. *Scientia Horticulturae*, 113.
- Bey, M., Stuber, K., Fellenberg, K., Schwarz-Sommer, Z., Sommer, H., Saedler, H. and Zachgo, S.** (2004) Characterization of *Antirrhinum* petal development and identification of target genes of the class B MADS box gene DEFICIENS. *Plant Cell*, 16, 3197–3215.
- Bradley, D., Vincent, C., Carpenter, R. and Coen, E.** (1996) Pathways for inflorescence and floral induction in *Antirrhinum*. *Development*, 122, 1535–1544.
- Cheng, W.-H., Endo, A., Zhou, L., et al.** (2002) A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in Arabidopsis Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. *The Plant Cell*, 14, 2723–2743.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., et al.** (2007) The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448, 666–671.
- Das Gupta, M., Aggarwal, P. and Nath, U.** (2014) CINCINNATA in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. *New Phytol.*, 204, 901–912.
- Delgado-Benarroch, L., Causier, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009a) FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*. *Planta*, 229, 1219–1229.
- Delgado-Benarroch, L., Causier, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009b) FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*. *Planta*, 229, 1219–1229.
- Divi, U.K., Rahman, T. and Krishna, P.** (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC plant biology*, 10, 151–151.
- Dornelas, M.C., Patreze, C.M., Angenent, G.C. and Immink, R.G.H.** (2011) MADS: the missing link between identity and growth? *Trends in Plant Science*, 16, 89–97.
- Gaudin, V., Lunness, P.A., Fobert, P.R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H., Coen, E. and Doonan, J.H.** (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the cycloidea gene. *Plant Physiology*, 122, 1137–1148.
- Golz, J.F., Keck, E.J. and Hudson, A.** (2002) Spontaneous mutations in KNOX genes give rise to a novel floral structure in *Antirrhinum*. *Current Biology*, 12, 515–522.
- Golz, J.F., Roccaro, M., Kuzoff, R. and Hudson, A.** (2004) GRAMINIFOLIA promotes growth and polarity of *Antirrhinum* leaves. *Development*, 131, 3661–3670.
- González-Guzmán, M., Apostolova, N., Bellés, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R. and Rodríguez, P.L.** (2002) The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell*, 14, 1833–1846.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., et al.** (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.*, 36, 3420–3435.
- Groot, E.P., Sinha, N. and Gleissberg, S.** (2005) Expression patterns of STM-like KNOX and Histone H4 genes in shoot development of the dissected-leaved basal eudicot plants *Chelidonium majus* and *Eschscholzia californica* (Papaveraceae). *Plant Molecular Biology*, 58, 317–331.
- Hu, Y.X., Xie, O., Chua, N.H. and Xie, Q.** (2003) The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *The Plant Cell*, 15, 1951–1961.

- Husbands, A.Y., Chitwood, D.H., Plavskin, Y. and Timmermans, M.C.P.** (2009) Signals and prepatterns: new insights into organ polarity in plants. *Genes & Development*, 23, 1986–1997.
- Ishiguro, S.** (2001) The DEFECTIVE IN ANOTHER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 13, 2191–2209.
- Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B.** (2006) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in Antirrhinum reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, 18, 560–573.
- Krishna, P.** (2003) Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22, 289–297.
- Krizek, B.A.** (1999) Ectopic expression AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Developmental Genetics*, 25, 224–236.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., et al. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Mallona, I., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2011) pcrEfficiency: a Web tool for PCR amplification efficiency prediction. *BMC Bioinformatics*, 12, 404–404.
- Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal*, 72.
- Manchado-Rojo, M., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2014) Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*, 12.
- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K. and Relyea, R.A.** (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 685–692.
- Mizukami, Y. and Fischer, R.L.** (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 942–7.
- Muhlemann, J.K., Maeda, H., Chang, C.-Y., et al.** (2012) Developmental Changes in the Metabolic Network of Snapdragon Flowers G. Bonaventure, ed. *PLoS ONE*, 7, e40381–e40381.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L.** (2002) Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.*, 30, e36-.
- Reeves, P.H., Ellis, C.M., Ploense, S.E., et al.** (2012) A regulatory network for coordinated flower maturation. M. F. Yanofsky, ed. *PLoS genetics*, 8, e1002506–e1002506.
- Reimand, J., Arak, T. and Vilo, J.** (2011) g:Profiler--a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Res.*, 39, W307-315.
- Reinhardt, D., Mandel, T. and Kuhlemeier, C.** (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 12, 507–518.
- Renard, A., Gómez di Marco, P., Egea-Cortines, M. and Weiss, J.** (2008) Application of whole genome amplification and quantitative PCR for detection and quantification of spoilage yeasts in orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 126.

- Sanders, P.M.** (2000) The Arabidopsis DELAYED DEHISCENCE1 Gene Encodes an Enzyme in the Jasmonic Acid Synthesis Pathway. *THE PLANT CELL ONLINE*, 12, 1041–1062.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jurgens, G. and Laux, T.** (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 100, 635–644.
- Schwarz-Sommer, Z., Gübitz, T., Weiss, J., Gómez-di-Marco, P., Delgado-Benarroch, L., Hudson, A. and Egea-Cortines, M.** (2010) A molecular recombination map of *Antirrhinum majus*. *BMC Plant Biology*, 10.
- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., et al.** (2006) A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant cell*, 18, 831–51.
- Seki, M., Umezawa, T., Urano, K. and Shinozaki, K.** (2007) Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 296–302.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., et al.** (2011) The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis. *Plant Cell*, 23, 1000–1013.
- Stuurman, J., Jaggi, F., Kuhlemeier, C. and Jäggi, F.** (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & Development*, 16, 2213–2218.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., et al.** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF COI1 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448, 661–665.
- Yoshida, S., Mandel, T. and Kuhlemeier, C. (2011) Stem cell activation by light guides plant organogenesis. *Genes Dev.*, 25, 1439–1450.

1.7- Información suplementaria

Tabla S1. Genes expresados diferencialmente y nivel de expresión diferencial en meristemos bajo condición de hacinamiento frente a plantas control (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726321/#S1>).

Tabla S2. GO (gene ontology) términos entre los genes diferencialmente expresados con significancia

Term name	term ID	t type	p-value
Down Regulated GO Terms			
intracellular organelle part	GO:0044446	CC	2,24E-08
cytoplasmic part	GO:0044444	CC	0,000000737
organelle envelope	GO:0031967	CC	0,0000181
apoplast	GO:0048046	CC	0,0000541
membrane	GO:0016020	CC	0,000224
single-organism carbohydrate catabolic process	GO:0044724	BP	0,00163
nucleoside diphosphate metabolic process	GO:0009132	BP	0,0045
response to hormone	GO:0009725	BP	0,00555
single-organism process	GO:0044699	BP	0,00609
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	GO:0016620	MF	0,0105
carboxylic acid metabolic process	GO:0019752	BP	0,0106
dormancy process	GO:0022611	BP	0,0131
nucleobase-containing small molecule metabolic process	GO:0055086	BP	0,0215
regulation of gibberellic acid mediated signaling pathway	GO:0009937	BP	0,0297
glycolytic process	GO:0006096	BP	0,0322
carbohydrate derivative metabolic process	GO:1901135	BP	0,0394
cellular aromatic compound metabolic process	GO:0006725	BP	0,0429
UP Regulated GO Terms			
single-organism process	GO:0044699	BP	1,24E-08
cytoplasm	GO:0005737	CC	0,00000211
response to stimulus	GO:0050896	BP	0,00000348
catalytic activity	GO:0003824	MF	0,00000761
metabolic process	GO:0008152	BP	0,000239
response to wounding	GO:0009611	BP	0,000523
cell wall	GO:0005618	CC	0,0492

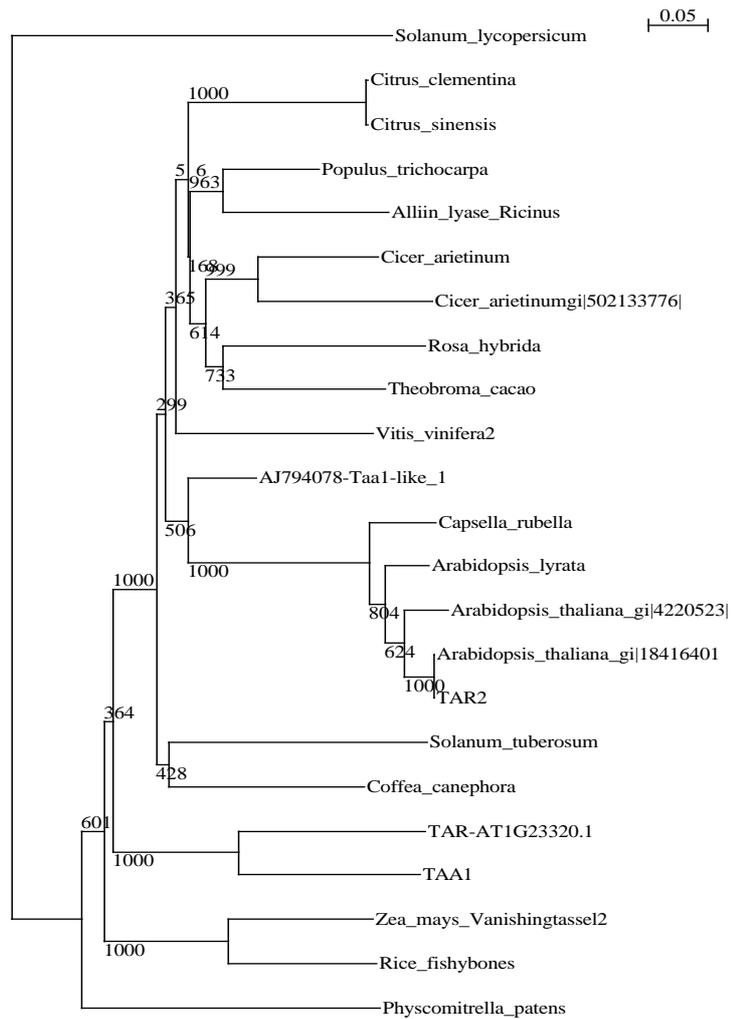


Fig. S1. Análisis filogenético de AmTAR2. Las secuencias usadas para crear del árbol corresponden a: *Arabidopsis thaliana* TAR2 AT4G24670; *Rice_fishybones* UniRef100_Q5VQG8; *Zea_mays_Vanishingtassel2* TPA_exp gi|327478401; *A.majus* AJ794078-TAR2-like; *Coffea canephora* gi|661883674; *Vitis vinifera_TAR2* gi|225456934; *Citrus sinensis* gi|641850650; *Ricinus communis* gi|255540565; *Citrus clementina* gi|567894804; *A.thaliana_Alliin_lyase_gi|4220523|*; *Capsella rubella* gi|565439663; *Arabidopsis thaliana_TAR2_gi|18416401|*; *Theobroma cacao_TAR2* gi|590663932; *A.lyrata_TAR2_gi|297799538|*; *Solanum tuberosum_TAR2* gi|565361383; *Rosa hybrida* gi|684057902; *Cicer arietinum* gi|502133776; *Populus trichocarpa* gi|566197463; *Physcomitrella patens* gi|168042587; *Solanum lycopersicum* gi|460376389; *A.thaliana_TAA1* AT1G70560; *A.thaliana_TAR* AT1G23320.1; *Cicer arietinum_TAR2* gi|502176528.

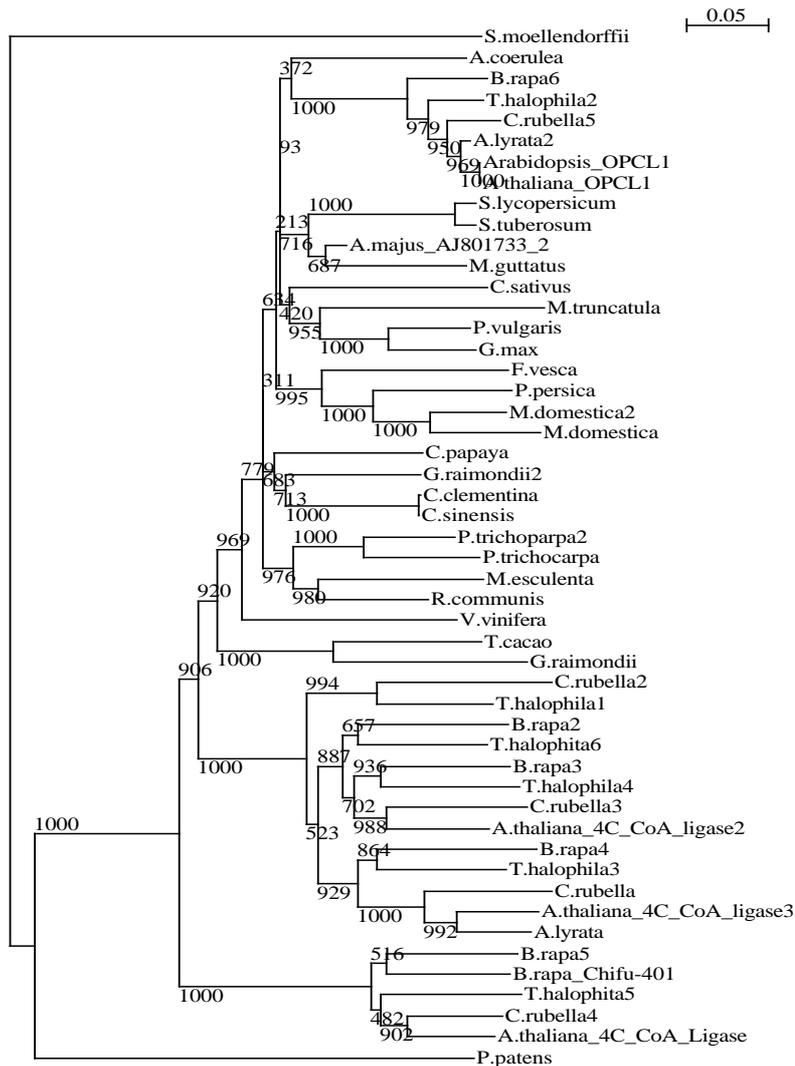


Fig. S2. Análisis filogenético de *A.majus* OPCL1. Las secuencias usadas para crear del árbol corresponden a: *S.moellendorffii* 15419256; *A.lyrata* 16046259; *A.lyrata2* 16063847; *C.papaya* 16415162; *R.communis* 16822160; *C.sativus* 16973638; *P.persica* 17660246; *M.guttatus* 17675469; *V.vinifera* 17821255; *M.esculenta* 17966968; *P.patens* 18048481; *C.sinensis* 18091655; *A.thaliana_OPCL1* AT1G20510.1; *A.thaliana_4C_CoA_Ligase* AT1G20480.1; *A.thaliana_4C_CoA_ligase2* AT1G20500.1; *A.thaliana_4C_CoA_ligase3* AT5G38120.1; *T.halophila1* 20185405; *T.halophila2* 20185868; *T.halophila3* 20186633; *T.halophila4* 20186966; *T.halophita5* 20187298; *T.halophita6* 20187839; *C.clementina* 20789127; *C.rubella* 20886687; *C.rubella2* 20890164; *C.rubella3* 20892260; *C.rubella4* 20892277; *C.rubella5* 20892502; *A.coerulea* 22048581; *M.domestica* 22635871; *M.domestica2* 22660672; *B.rapa_Chifu-401* 22697242; *B.rapa2* 22700495; *B.rapa3* 22700992; *B.rapa4* 22722203; *B.rapa5* 22723148; *B.rapa6* 22724018; *M.truncatula* 23037985; *S.tuberosum* PGSC0003DMP400051055; *G.max* 26284573; *G.raimondii* 26793192; *G.raimondii2* 26806072; *P.trichocarpa* 27023535; *P.trichoparpa2* 27030501; *P.vulgaris* 27161910;

S.lycopersicum 27308053; T.cacao 27457047;A.majus_AJ801733_2 ;
 Arabidopsis_OPCL1 AT1G20510

Tabla S3: Información sobre cebadores usados para la PCR cuantitativa

Nombre del gen	Secuencia de cebadores
<i>Ubi-pl</i>	For:GCCGATGGAAGTATATGTTTGTGGACATC Rev:CAAGTCTTACAAGACCTAGAAGCTC
<i>CycD3a</i>	For: CACTGCGGTTCTTGCAGTTA Rev: TGAAATTGGGGTACTGGAT
<i>CycD3b</i>	For: GATCTTGGGTCCGGGTAAA Rev: TGAAATTGGGGTACTGGAT
<i>H4</i>	For: TTGGAGAATGTGATCCGTGA Rev: TAACCCTAACCCCAAATCC
<i>Roa</i>	For: CATTATAAGCCCCCTCCTGT Rev:AATTTTCTGCCTCCTCCTCT
<i>Hirz</i>	For: AATTGTGAAGGTGGGTATA Rev:GAGAGCTTTCATCACAGTTAGTACT
<i>Gram</i>	For: CGTCCATTGCAACTTTTGTG Rev:TGGAATCGTTTGGATTAGGC
<i>AmTAR2</i>	For: ATGTTGTATCTGCCGCTCCG Rev: CCTGTCTTGAAGTTGCGAGC
<i>AmANT</i>	For: TTGCTGCAATCAAGTTCAGG Rev: CAATGCCAATCAAATCATGC
<i>AmMYB21</i>	For: AGGACTCGAATCCAAAAGCA Rev:AACTGGAGAGAAGGCTGGTG
<i>AmJAZ1</i>	For: CCGATGCGAGTGTTGTTAAA Rev: GAACCTGAGGAGCCAATCCT
<i>AmOPCL1</i>	For: TTAGCAACGAAGAGGCGAC Rev:TCCAATTCGCGAGGAGGAAC
<i>AmABA2</i>	For: CCAAGGCACAGTAGACCACA Rev: CCTAGTCAGCCCCAAAACAG

CAPÍTULO 2 – Los rasgos florales de importancia ornamental y reproductiva son sensibles a la temperatura en *Antirrhinum majus*

(Floral traits of ornamental and reproductive significance are temperature sensitive in *Antirrhinum majus*)

2.1.-Resumen

Los parámetros de calidad de la flor, como el tamaño, la arquitectura y el color, así como la fragancia y la viabilidad del polen, juegan un papel importante en la interacción planta-polinizador, la productividad y el valor ornamental. La temperatura es una señal ambiental que interfiere con la calidad de la flor y aprender sobre el efecto de variaciones en la temperatura es especialmente importante teniendo en cuenta el cambio en el clima global. Hemos estudiado el efecto de los regímenes de alta y baja temperatura en los parámetros de calidad floral en *Antirrhinum majus*. Se trata de un conjunto de rasgos evolucionados en respuesta a la selección natural impuesta por los polinizadores. Las temperaturas cambiantes durante el desarrollo de la inflorescencia afectaron a la mayoría de los rasgos en dirección opuesta dependiendo de si se aplicó el régimen de frío o calor. Las temperaturas frías dieron como resultado una mayor pigmentación, flores más pesadas con una mayor expansión de los pétalos, una reducción en el número de flores, una mayor viabilidad del polen, una reducción en las cantidades de volátiles emitidos y un cambio en el perfil de volátiles. En contraste, a temperaturas altas, las flores mostraron una pigmentación reducida y fueron más ligeras con una reducción de tamaño en la mayoría de los parámetros de las flores, un pedicelo más largo y una menor viabilidad del polen. Al igual que en el caso de temperaturas bajas, se observó una reducción en la cantidad y el perfil de volátiles emitidos. Mostramos que los cambios en la temperatura durante el desarrollo de la inflorescencia tienen consecuencias de gran alcance en múltiples rasgos relacionados con el valor ornamental y el síndrome de polinización en *Antirrhinum majus*.

2.2.- Introducción

Un conjunto complejo de parámetros que determinan la calidad de la flor interviene en la interacción entre las plantas y otros organismos, entre los cuales la emisión de compuestos volátiles químicos y el color de las flores juega un papel clave, junto con la forma y el tamaño de las flores o el número de flores. Algunos de estos parámetros también son de interés para la industria ornamental o de perfumes, como el número de flores, la arquitectura floral, el tamaño floral, el color floral o la fragancia floral.

El color de las flores es uno de los principales rasgos florales utilizados por los polinizadores para ubicar las flores. Aunque existe una asociación consistente entre los grupos de polinizadores y ciertos colores, las asociaciones de plantas y polinizadores basadas en el color no son muy estrechas y dependen del contexto de otros rasgos (Reverté *et al.*, 2016) incluida la fragancia floral. Los pigmentos en las células del pétalo, la estructura de un pétalo, tanto interno como en la superficie, son determinantes de la apariencia del color. En *Antirrhinum*, la formación de células epidérmicas cónicas de pétalo está controlada por el gen *MIXTA*. La estructura celular cónica aumenta la cantidad de absorción de luz de los pigmentos florales, intensificando así el color del pétalo y la atención del polinizador (Glover y Martin, 1998). El color de la flor también es una característica importante de las plantas ornamentales y la temperatura es el factor físico principal afectando este rasgo. Predominantemente, el contenido de antocianinas disminuye con temperaturas más altas que conducen a un color más claro, mientras que temperaturas más bajas conducen a un color más oscuro (Carvalho *et al.*, 2005; Zhao and Tao, 2015). La reducción de antocianinas a temperaturas altas en flores de la especie *Lilium* está relacionado con una expresión disminuida de los genes *chalcona synthase* (*CHS*), *flavanona 3-hidroxilase* (*F3H*), *dihydroflavonol 4-reductasa* (*DFR*) y el factor de transcripción *MYB12* (Lai *et al.*, 2011). Además, un color más oscuro a temperaturas más bajas también puede asociarse con un engrosamiento de la epidermis del pétalo y un cambio en la distribución de antocianinas (Zhao y Tao, 2015).

Los VOCs (volatile organic compounds) emitidos por la flor tienen una función tanto como un atractivo para los polinizadores como para repeler a los parásitos (Mühlemann *et al.*, 2006). En la mayoría de las plantas, son emitidas por pétalos y estambres (Dudareva *et al.*, 1996; Verdonk *et al.*, 2003; Baudino *et al.*, 2007). Las especies de *Antirrhinum* muestran mezclas complejas de compuestos volátiles pertenecientes a fenilpropanoides, bencenoides, mono y sesquiterpenos, compuestos que contienen nitrógeno y alcoholes alifáticos. En el caso de *A. majus*, los VOCs incluyen metilbenzoato, acetofenona y ocimeno (Kolossova *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2016). Mientras que en *Petunia* existe una sincronía entre la concentración de compuestos volátiles endógenos y la intensidad de emisión (Oyama-Okubo *et al.*, 2005), se observó una relación inversa en el jazmín, con una baja concentración de compuestos volátiles endógeno que coincide con mayores tasas

de emisión, lo que indica que los compuestos endógenos se sintetizan continuamente (Barman y Mitra, 2018). La producción de volátiles florales también depende de la edad de la flor (Eran Pichersky, 1994; Dudareva *et al.*, 1998), el estado de polinización (Rodríguez-Saona *et al.*, 2011) la hora del día y controlada por el ritmo circadiano (Kolossova *et al.*, 2001; Schuurink *et al.*, 2006) así como la temperatura (Sagae *et al.*, 2008; Cna'ani *et al.*, 2015). En el caso de las flores de Petunia, el efecto de la temperatura depende de cada compuesto volátil específico. Si bien la mayoría de los compuestos aromáticos de fenilpropanoides disminuyen a temperaturas elevadas en Petunia, la emisión de isoeugenol y vainillina no cambia (Cna'ani *et al.*, 2015). Pero no solo la emisión de volátiles, sino también la cantidad de compuestos endógenos responde a la temperatura y un aumento de la emisión de 20 a 30°C se ve acompañado por una disminución de la cantidad endógena en flores de Petunia (Sagae *et al.*, 2008).

En plantas polinizadas por insectos, el tamaño de la flor es un rasgo que varía y puede causar aislamiento reproductivo (Krizek y Anderson, 2013). La combinación entre el tamaño de la flor, perfume, color y recompensas forma el síndrome del polinizador específico de cada especie (Hermann y Kuhlemeier, 2011). Varios genes están involucrados en el control del tamaño de la flor, incluidos los genes de identidad de órganos (Delgado-Benarroch, 2010; Manchado-Rojo *et al.*, 2012) y *EXPANSIN (EXP)*, un gen que controla el metabolismo de la pared celular (Zenoni *et al.*, 2004). Otro gen importante que controla el tamaño es *AINTEGUMENTA (ANT)*, un factor de transcripción *APETALA2* en Arabidopsis, que afecta el tamaño floral mediante el control de la división y expansión celular (Krizek, 1999; Mizukami and Fischer, 2000; Delgado-Benarroch *et al.*, 2009; Manchado-Rojo *et al.*, 2014). Este gen puede ser modificado mediante ingeniería genética para obtener cambios en el tamaño floral, aunque hay que considerar que cambios en la expresión de *ANT* pueden afectar las diferentes partes de la flor, tubo y corola, de forma diferencial, como se observa en Petunia (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). El efecto de la temperatura sobre el tamaño floral se conoce para varias flores ornamentales que incluyen rosas o crisantemos. En este último caso, un aumento de la temperatura da como resultado un aumento en el número de flores mas pequeñas si se aplica el cambio en temperatura después de la aparición de la flor terminal, pero con un efecto inverso si se aplican antes de la aparición de la flor terminal (Carvalho *et al.*, 2005). En el caso de rosas, los cambios de temperatura después de la aparición visible de primordios florales afecta al tamaño de la flor con un aumento significativo del peso seco

de la flor a temperaturas más bajas (Shin *et al.*, 2001). Se demostró en *Arabidopsis* que un aumento de temperatura moderado a 27°C resulta en la expresión de una proteína de choque térmico, HSP19-16 en flores, lo que se requiere para la apertura completa de la flor bajo esta condición de estrés (Chen *et al.*, 2019).

La plasticidad de plantas con respecto al número de flores en respuesta a diferentes condiciones ambientales en general es menor comparado con la plasticidad en el tamaño. Sin embargo, en *Antirrhinum majus*, el estrés de hacinamiento provoca una reducción en el número de flores y no en el tamaño de la flor, probablemente debido a cambios en la señalización de ácido jasmónico y ABA (Weiss *et al.*, 2016a). Igualmente, el estrés provocado por defoliación artificial provoca un cambio en el número de flores pero no en el tamaño de flores y se propone que el área de la hoja afecta a la formación de primordios florales a través de los niveles de nutrientes necesarios para producir nuevas células (Bayo-Canha *et al.*, 2007). El efecto de temperatura sobre el número de flores depende de la especie en cuestión y la hora del día. Mientras en *Pelargonium* el número de flores disminuye conforme incrementa la temperatura (Anderson, 2007), un aumento de temperatura nocturna provoca un aumento en el número de flores en soja (Zheng *et al.*, 2002).

Los factores ambientales, como la temperatura, también pueden tener un fuerte impacto en el desarrollo del polen. Las temperaturas altas reducen las células del tapetum (Endo *et al.*, 2009), afectando la viabilidad del polen y la germinación del polen, lo que junto con el desarrollo del pistilo, pueden afectar la cantidad de las semillas. Otro aspecto es la calidad del polen en términos de beneficio para el polinizado, ya que una menor viabilidad del polen se puede relacionar con un menor contenido de proteínas y cantidad de polen, como se muestra para *Mimulus guttatus* (Yeaman *et al.*, 2014). Los parámetros que permiten analizar la calidad del polen incluyen parámetros morfológicos en términos de integridad de la membrana de la célula vegetativa, la capacidad de germinación y la longitud del tubo del polen. En *Antirrhinum tortuosum*, la capacidad de germinación del polen es mayor durante la primavera, aunque la floración se produce durante todo el año, lo que indica que las temperaturas extremas de calor o frío afectan negativamente la calidad del polen (Alaimo *et al.*, 1997).

Las variaciones en la calidad de la flor en respuesta al ambiente, especialmente la temperatura, tienen consecuencias extensas tanto desde la perspectiva ecológica como económica. Con respecto a la industria ornamental, los resultados sobre el efecto de la temperatura en la calidad de la flor indican claramente la necesidad de una estrategia de calentamiento dinámico en la producción ornamental. Pero aprender sobre los efectos de la temperatura en la calidad de la flor ayuda a comprender y gestionar el posible impacto que el cambio climático puede tener en la polinización y la productividad.

Teniendo en cuenta tanto el posible efecto sobre el valor ornamental como la interacción entre los polinizadores de las flores, presentamos un análisis exhaustivo del efecto de bajas y altas temperaturas en una amplia gama de parámetros de calidad floral en *Antirrhinum majus*, incluidos el número, el tamaño, el color, la viabilidad del polen y producción de volátiles.

2.3.- Material y Métodos

Material vegetal, condiciones de crecimiento y toma de muestras

Se utilizaron semillas de *Antirrhinum majus* de la línea 165E (Sommer y Saedler, 1986). Las semillas fueron germinadas en vermiculita fina. El trasplante a macetas de plástico de vivero (650 ml de volumen) se realizó después de dos semanas. Durante todo el período de tratamiento, las plantas se regaron según lo requerido. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento Sanyo MRL350 con temperaturas de día / noche de 22/15 °C a un régimen de 16 h de luz fluorescente a una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activa de $250 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y 8 h de oscuridad. Éste tratamiento se considera el crecimiento estándar. Seis plantas se mantuvieron en condiciones estándar durante el período de muestreo, mientras que otros dos grupos de seis plantas se transfirieron a cámaras de crecimiento con un régimen de luz idéntico, pero a temperaturas de 15/5 °C y 30/23 °C, respectivamente, cuando las primeras inflorescencias comenzaron a aparecer. Las etapas de desarrollo de la flor se categorizaron como se muestra en la Figura 1: La etapa de floración 0 coincide con el día 0 de apertura floral (DAF); estadio + II coincide con el día 3 DAF y estadio + IV coincide con el día 5 DAF. El muestreo de flores se realizó en los días 0, 3 y 5 DAF. Los parámetros de las flores se seleccionaron como se describió anteriormente (Bayo-Canha *et al.*, 2007) y se dan para las flores el día 3. El número total de flores se registró después de 20 días de aclimatación de la inflorescencia a los diferentes regímenes de temperatura.

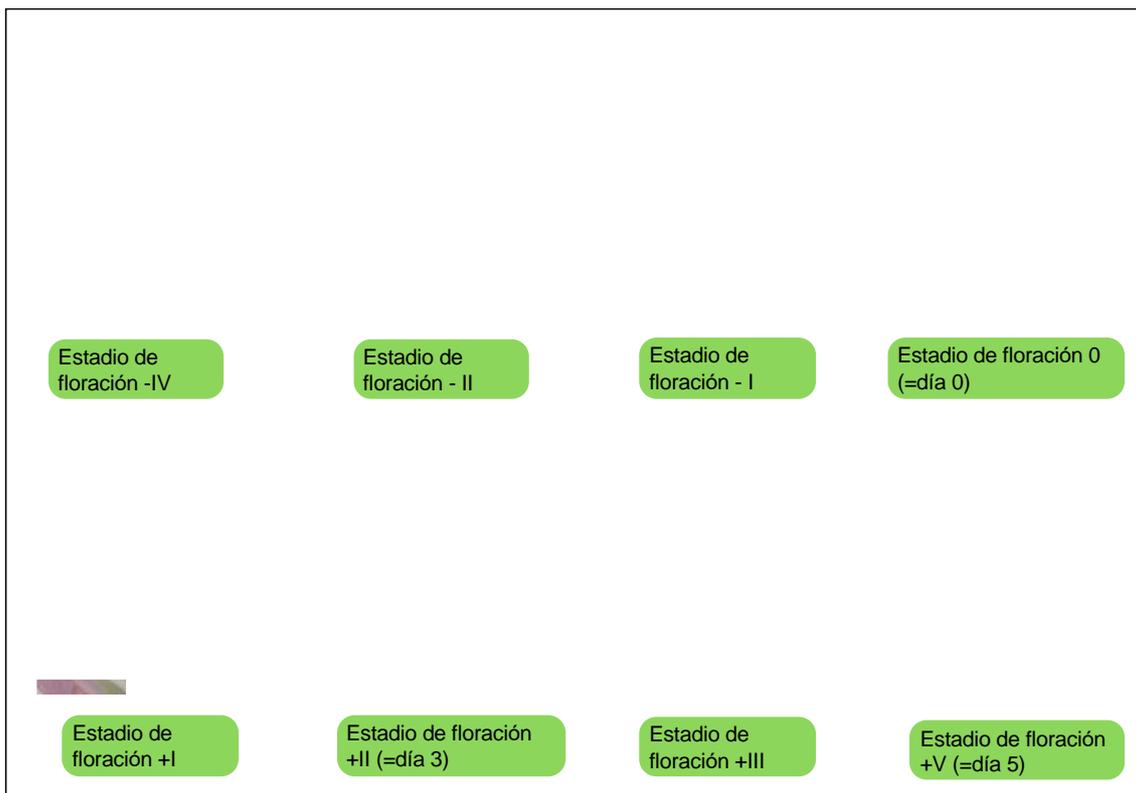


Figura 1. Estadios de floración de *Antirrhinum majus* línea 165E. Rango de estadios de floración desde -IV (antes de la apertura de la flor) hasta es estadio V (día 5 después de la apertura de la flor).

Mediciones de Antocianinas y Clorofilas

Para la medición del contenido total de antocianinas en flores, se realizó una extracción de 0,1 g de tejido de pétalo el día 3 después de la apertura de la flor utilizando un método de metanol-HCL y una medición espectrofotométrica de absorción a 530 y 657 nm (Zhang *et al.*, 2019) utilizando un espectrofotómetro UV-1600 (SHIMADZU, Kyoto, Japón). La extracción se realizó con nueve flores de tres plantas diferentes por régimen de temperatura.

Medimos el contenido de clorofila en hojas apicales, medianas y basales de plantas mantenidas bajo los diferentes regímenes de temperatura. La clorofila se midió con un medidor de clorofila CM-500 que determina el contenido relativo de clorofila al medir el coeficiente de penetración de la luz en un rango de dos longitudes de onda correspondiente a la luz roja y la luz IR.

Análisis por microscopia electrónica de barrido

Una región adaxial (superior) del pétalo que abarca las áreas 6,7 y 8 descritas anteriormente (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009) se cortó con una hoja de bisturí. Se prepararon secciones de pétalos de aproximadamente 0,75 cm² para microscopía electrónica. El tamaño celular de las flores de diferentes regímenes de temperatura se midió en función del área celular de 40 células utilizando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Análisis de Volátiles

El análisis de la emisión de VOCs de las flores mantenidas bajo los diferentes regímenes de temperatura se realizó en los estadios 0, 3 y 5 DAF. Para cada etapa de desarrollo y régimen de temperatura, muestreamos tres flores. La medición de la emisión de VOCs se realizó como se describió anteriormente (Manchado-Rojo *et al.*, 2012; Ruiz-Ramon *et al.*, 2014) y consistió en colocarlos en un vaso de vidrio con una solución al 4% de glucosa dentro de un desecador. Los volátiles emitidos se recolectaron con twisters del espacio de cabeza durante 24 horas, seguido por análisis con GC / MS. El perfil de volátiles se obtuvo analizando las cantidades de compuestos en base a su área integrada en el cromatograma utilizando la librería de R GCprofileMakeR (Perez-Sanz *et al.* 2019 BiorXiv) figuras de perfil de olor se representaron utilizando la biblioteca R ggplot2 (Hadley, 2016).

Análisis de la viabilidad de polen

La viabilidad del polen se evaluó para el polen de siete a diez flores el día 3 DAF, cultivados bajo condiciones estándar, así como en regímenes de alta y baja temperatura. En el polen se analizó la presencia de citoplasma mediante tinción con azul de anilina al 0,1% en K₃PO₄ 0,1N a pH 8,5 (Kho y Baër, 1968).

Desarrollo de cápsulas y germinabilidad de semillas

Las flores que se desarrollaron bajo los diferentes regímenes de temperatura se autopolinizaron y se registró el peso total de las semillas y el número de semillas para 10 cápsulas de 3 plantas. De cada cápsula, se realizó un ensayo de germinabilidad colocando 20 semillas en un papel de filtro humedecido con agua destilada dentro de una placa de Petri. Las placas se mantuvieron en oscuridad en una cámara de crecimiento a 22°C.

Procedimiento de análisis de datos

Los perfiles volátiles se analizaron utilizando el paquete R `gcProfileMakeR` (desarrollo del laboratorio), basándose en el establecimiento de un umbral específico de parámetros de calidad para la inclusión de datos en el perfil y presentando los datos como área de pico integrado. Los datos sobre el tamaño de la flor, el peso de la flor, la emisión de volátiles y la capacidad de germinación del polen se analizaron para verificar normalidad con el test Shapiro-Wilk. Los datos normales se analizaron utilizando la prueba de T de student y lo que no pasaron el test con el test de rangos de Wilcoxon.

2.4.- Resultados

El cultivo a alta y baja temperatura afecta la pigmentación de las flores, pero no la estructura de las células de los pétalos

La temperatura tuvo un efecto significativo en la pigmentación de los pétalos observados a simple vista (Fig. 2). En comparación con la condición de temperatura estándar, las temperaturas más frías dieron como resultado una pigmentación roja más oscura, mientras que las temperaturas más altas produjeron flores con un color más pálido hasta flores completamente blancas. Este cambio de color aparente coincidió con un contenido de antocianina total significativamente mayor en el tejido del pétalo a temperaturas más bajas y significativamente inferior en el tejido del pétalo a temperaturas más altas en comparación con las condiciones estándar. (Fig. 3). No observamos ninguna diferencia aparente en la estructura de las células cónicas o planas en los pétalos de los diferentes tratamientos (Fig. 2).

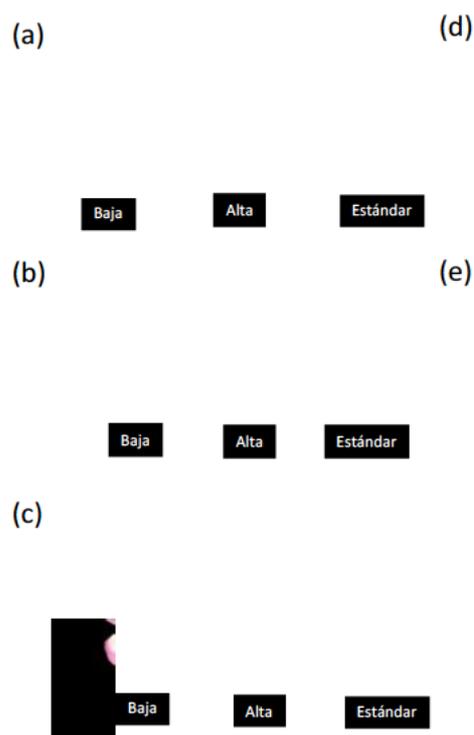


Figura 2. Vista (a) frontal, (b) posterior y (c) lateral de las flores de *Antirrhinum majus* mantenidas durante el desarrollo de inflorescencia a temperaturas bajas, altas y estándar, así como la aparición de (d) células de pétalos cónicas y (e) planas.

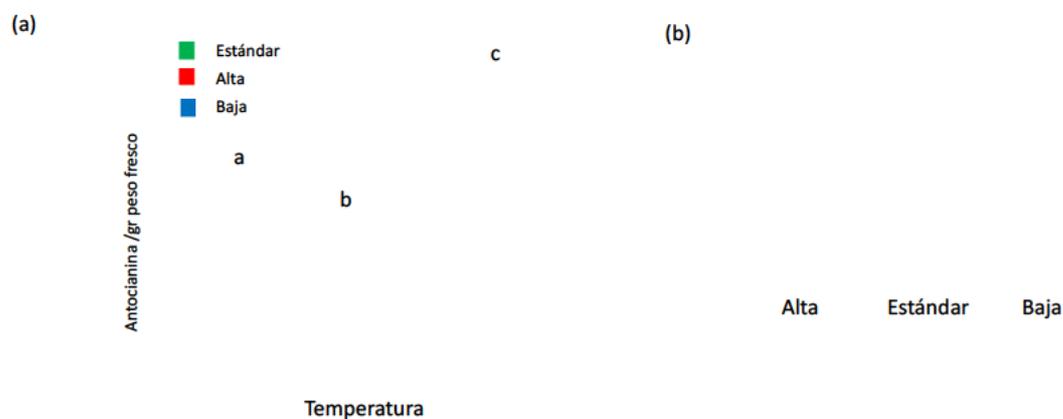


Figura 3. (a) Contenido total de antocianinas en pétalos de flores de *Antirrhinum majus* cultivadas en temperatura baja, alta y estándar, calculada mediante la fórmula: Q Antocianina total = $(A530 - 0.25 \times A657) \times FM^{-1}$ (Zheng et al. 2019). (b) Soluciones de extracción de antocianinas. Las diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba "t" de Student.

También analizamos el efecto del régimen de temperatura en la pigmentación de las hojas (Fig. 4). Al igual que las antocianinas de pétalos, las hojas mantenidas a temperaturas más bajas mostraron un contenido de clorofila significativamente mayor en las hojas apicales, medianas y basales. Bajo altas temperaturas, no se observó diferencias significativas relativamente al control.

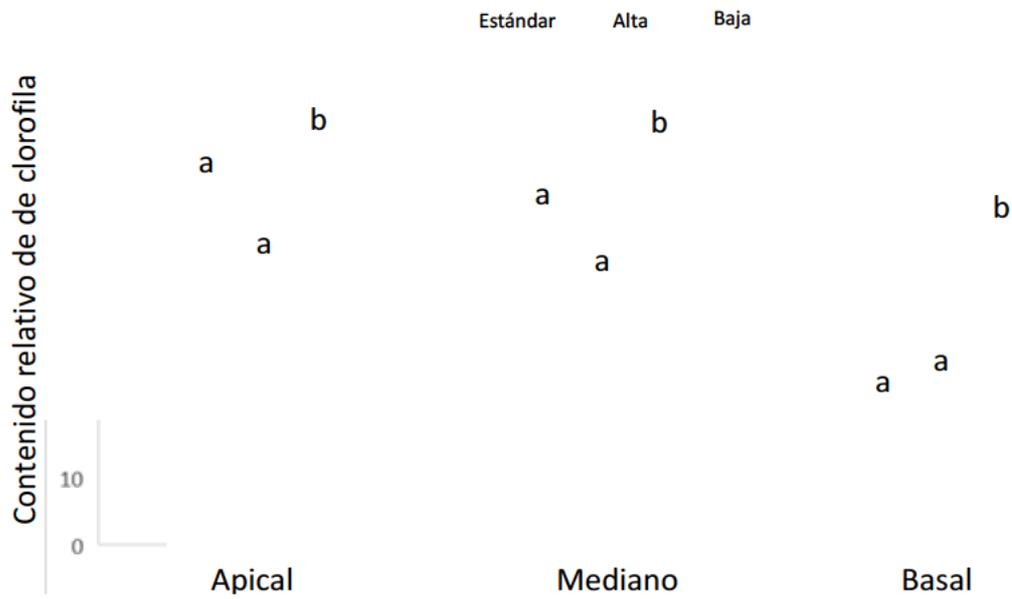


Figura 4. Diagrama de caja y bigote del contenido de clorofila en hojas apicales, medianas y basal en condiciones estándar y en condiciones de temperatura alta y baja. Las diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba F de Fisher.

Los cambios en el tamaño de la flor en respuesta a la temperatura son específicos del órgano.

El tamaño de la flor se vio significativamente afectado por la temperatura, tanto con respecto al peso fresco de la flor (Fig. 5) como con respecto a los parámetros florales específicos (Fig. 6). Mientras que las flores de plantas cultivadas en condiciones de temperatura estándar tenían un peso promedio de 255 mg, el desarrollo de flores a temperaturas más frías resultó en un 13% de flores más pesadas, mientras que las temperaturas más bajas produjeron un 32% de flores más ligeras.

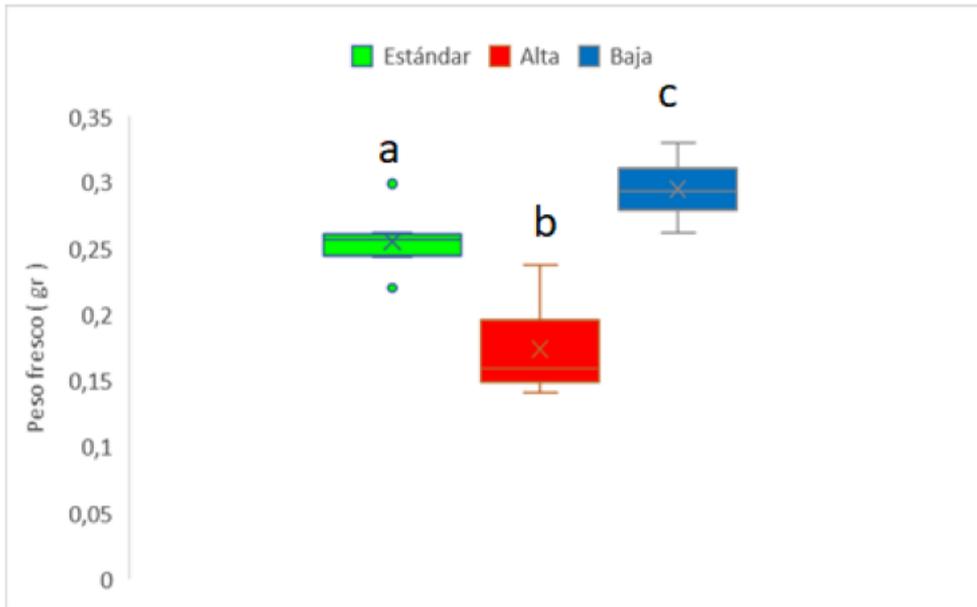


Figura 5. Peso fresco (g) de las flores de *Antirrhinum majus* mantenidas durante el desarrollo de inflorescencia en condiciones estándar en comparación con los regímenes de temperatura más alta y más baja. Las diferentes letras indican diferencias significativas según la prueba F de Fisher.

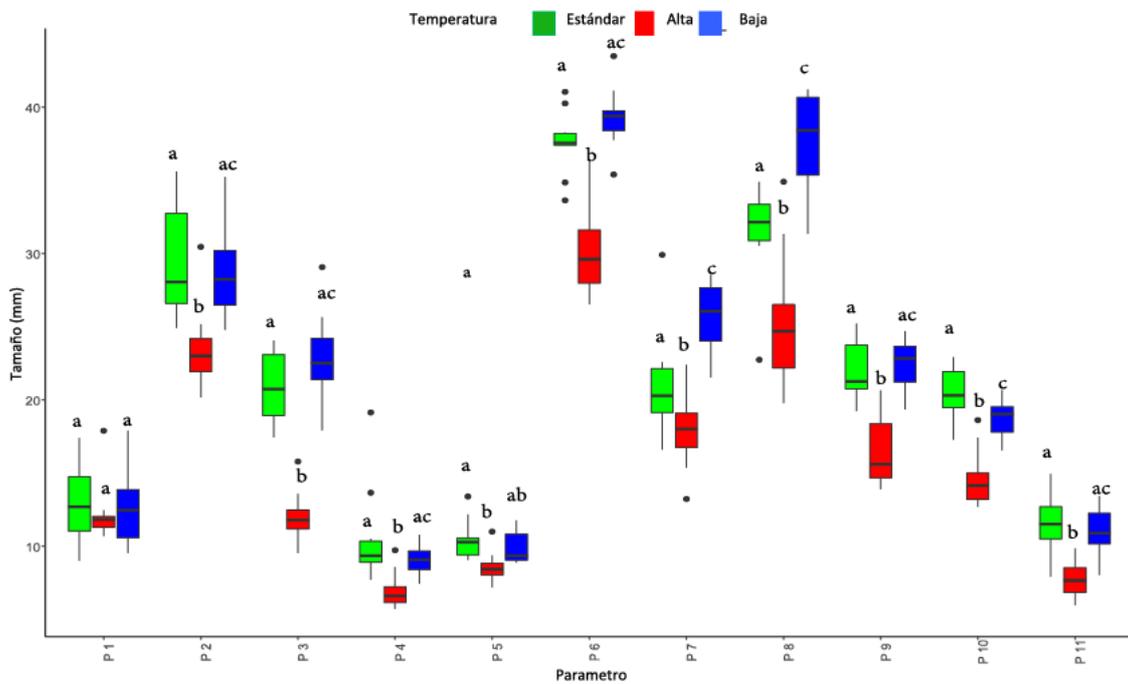


Figura 6. Parámetros de la flor (P) bajo temperaturas estándar, altas y bajas. Longitud del tubo P1-pétalo; P2 - longitud del pétalo inferior; P3 - altura del pétalo; P4- longitud del sépalo; P5-ancho de tubo; P6-longitud del pétalo superior; P7-expansión del pétalo inferior; P8-expansión del pétalo superior; P9-longitud del estambre; P10-longitud del gineceo; P11-expansión pallate. Las letras diferentes para cada parámetro indican diferencias significativas según la prueba F de Fisher o la prueba de Wilcoxon (longitud del sépalo y expansión del pétalo superior).

Todos los parámetros de la flor se redujeron a temperaturas más altas en comparación con las condiciones estándar. Sin embargo, la diferencia de tamaño no fue significativa en el caso de la longitud del tubo floral. Las temperaturas más bajas resultaron en medidas significativamente mayores en el caso de la expansión del pétalo superior e inferior. La longitud del gineceo se redujo significativamente, y todos los demás parámetros no fueron significativamente diferentes en comparación con las condiciones estándar. Para identificar cambios globales en los parámetros florales en plantas bajo las diferentes condiciones, realizamos un análisis de componentes principales (PCA) (Fig. 7). El primer componente principal representa el 66,99% y el segundo componente principal representa el 12,44% de la variación en los datos. Los datos muestran que la estructura floral se mantiene más similar a bajas temperaturas en comparación con las condiciones estándar, mientras que el calor afecta drásticamente el crecimiento de los pétalos en la mayoría de los parámetros.



Figura 7. Análisis de componentes principales del peso floral y parámetros florales. Cada punto representa una de las flores analizadas.

El análisis del tamaño del área celular en la región del pétalo adaxial que abarca áreas de las células cónicas y planas no mostró diferencias significativas entre los diferentes regímenes de temperatura para cada tipo de célula (Tabla 1; Fig. 2).

Tabla 1. Análisis del área celular de pétalos de flores de *A.majus* bajo condiciones estándar, frío y calor.

Régimen de temperatura	Células cónicas	Células planas
Estándar	849.09 ± 131.89	1401.00 ± 144.38
Frío	878.04 ± 10.73	1397.53 ± 98.79
Calor	770.85 ± 106.52	1591.45 ± 177.25

Número total de células medidas para cada pétalo / tratamiento = 40. Los valores representan la media del área (μm^2) y el error típico.

Otro efecto sobre la apariencia de la flor se observó en relación con la longitud del pedicelo, que conecta las flores con el tallo y forma parte del tallo. La longitud del pedicelo fue más del doble en flores cultivadas en condiciones de calor en comparación con las condiciones estándar, mientras que las flores de condiciones estándar y de baja temperatura tuvieron una longitud de pedicelo similar (Fig. 8).

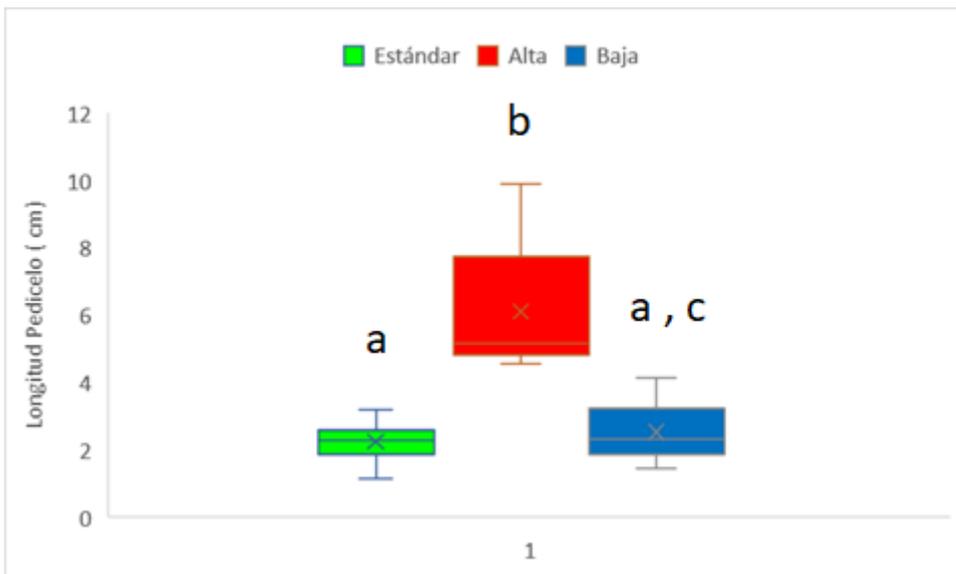


Figura 83. Diagrama de caja y bigote de la longitud del pedicelo en flores cultivadas en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura. Las diferentes letras para cada parámetro indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba F de Fisher

Cambios en la temperatura durante el desarrollo de la inflorescencia afecta al número de flores

Las inflorescencias de plantas cultivadas en temperaturas bajas mostraron una reducción significativa en el número de flores de 20 %, mientras las plantas cultivadas a temperaturas más altas produjeron un número de flores similar a las plantas en condiciones estándar.

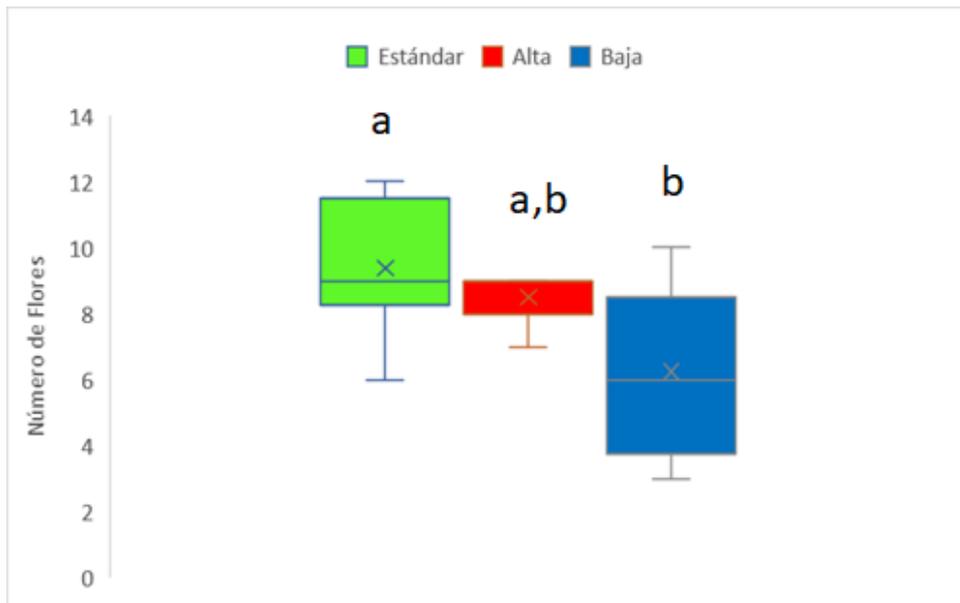


Figura 9. Diagrama de caja y bigote del número de flores en inflorescencias de *Antirrhinum majus* línea 165E en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura. Las diferentes letras para cada parámetro indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba F de Fisher

Las temperaturas altas y bajas influyen significativamente en el rendimiento del polen y en la producción de semillas

Los diferentes regímenes de temperatura también afectaron la calidad del polen (Fig.10). Mientras que una temperatura más alta redujo significativamente la viabilidad del polen del 74,5% en condiciones estándar al 45%, las temperaturas más bajas aumentaron la viabilidad al 93,0%.

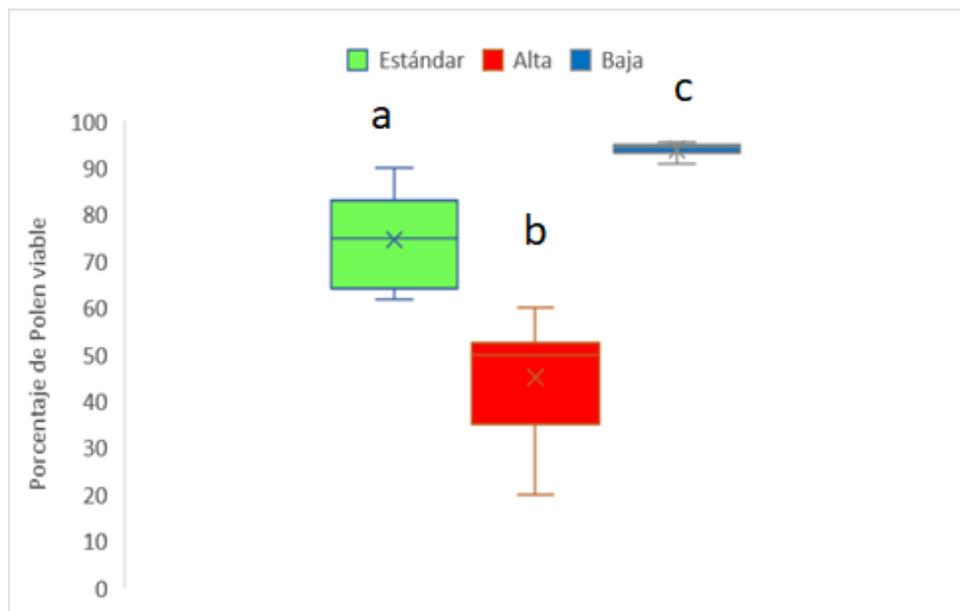


Figura 10. Porcentaje de viabilidad del polen en flores cultivadas en condiciones estándar, así como en condiciones de alta y baja temperatura. Las diferentes letras para cada parámetro indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba F de Fisher.

Autopolinizamos las flores autógamas de *A. majus* bajo diferentes regímenes de temperatura para evaluar los posibles efectos sobre la fertilidad, el desarrollo de la cápsula y de las semillas. Las temperaturas altas y bajas no afectaron significativamente la tasa de germinación de las semillas. Sin embargo, si bien el porcentaje promedio de germinación de semillas fue comparable entre las temperaturas estándar y bajas, este factor aumentó 1,5 veces a temperaturas más altas. Por el contrario, el número de semillas se redujo significativamente en un 46% a baja temperatura y no se redujo significativamente en solo un 16% a alta temperatura. No se observaron diferencias significativas con respecto al peso de la semilla.

Tabla 2. Parámetros de calidad de semillas – porcentaje de germinación y número y peso de semillas

Régimen de temperatura	% Germinación	Nº de semillas/10 cápsulas	Peso de semillas (gr)
Estándar	29	1404,00 ± 59,34	0,025 ± 0,029
Frío	25	755 ± 26,18	0,012 ± 0,003
Calor	46	1175,53 ± 39,81	0,007 ± 0,002

La respuesta de la emisión de volátiles a la temperatura afecta la cantidad y la calidad.

La Figura 11 muestra la cantidad total de VOCs emitidos en los días 0, 3 y 5 DDA en condiciones estándar, de frío y de calor y la figura 11 muestra la contribución relativa de los principales VOCs en los diferentes tiempos y condiciones de muestreo, aplicando un nivel de umbral del 2% de la emisión total de VOCs. Se observaron diferencias con respecto a 1) emisión total 2) el perfil de volátiles 3) cambios en la emisión total durante el envejecimiento y 4) cambios en el perfil durante el envejecimiento. Las flores cultivadas bajo condiciones de calor emitieron cantidades similares a las cultivadas bajo condiciones estándar a 0 DDA (Fig. 11, Supl. Tabla 2). Sin embargo, la emisión fue menor a 3 y 5 DAF con 53% y 68% en comparación con las flores de control. En condiciones de frío, la reducción de la emisión fue más pronunciada. Las flores produjeron 77%, 25% y 29% en los días 0, 3 y 5 DAF, respectivamente, de los VOCs emitidos en condiciones estándar. La cantidad total de VOCs emitidos aumentó durante el desarrollo con los valores más altos a 5 DAF en condiciones estándar. Bajo altas temperaturas, las flores emitieron cantidades similares a 0 y 3 DAF con un aumento solo hacia 5 DAF. Sólo se observaron pequeñas fluctuaciones bajo bajas temperaturas.

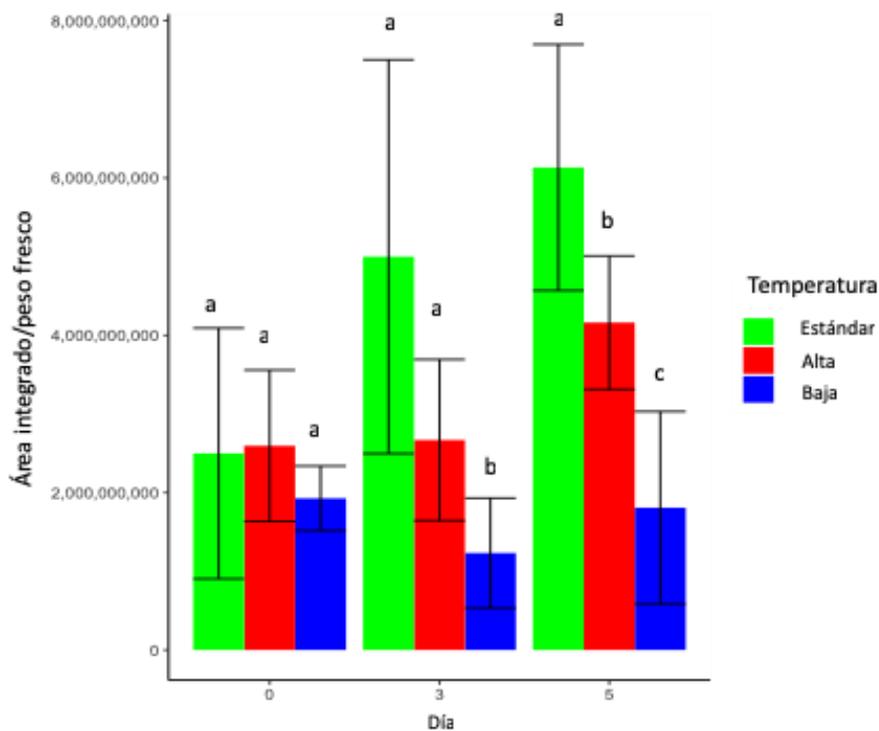


Figura 11. Emisión total de VOCs a los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, frío y calor. Las diferentes letras para cada parámetro indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba F de Fisher.

La contribución relativa de los diferentes VOCs se muestra en la Fig. 12 y tabla suplementaria 2. Los principales compuestos a 0 DAF en condiciones estándar fueron metilbenzoato (28%), ocimeno (23%), acetofenona (19%), feniletanol (14%), mirceno (7%) y farneseno (3,3%). La contribución relativa de los diferentes VOCs pareció relativamente robusta durante el envejecimiento de las flores. Las flores mantenidas a bajas temperaturas no produjeron ocimeno ni metilbenzoato en 0 DDA. En cambio, más de la mitad de los VOCs consistieron en feniletanol (74%), seguido de acetofenona (18%), mirceno (4%) y gardenol (2,5%), un compuesto menor en las condiciones estándar. Durante el envejecimiento a baja temperatura, el perfil de VOCs se ajustó más al perfil estándar, y el metilbenzoato representó la mitad de los VOCs emitidos. Al igual que en el régimen de baja temperatura, las flores que comenzaron a abrirse a altas temperaturas emitieron muy poco metilbenzoato (4%) y ningún ocimeno y el VOC principal fue feniletanol (43%). El farneseno mostró un porcentaje mayor que en las condiciones estándar (11%) y, a diferencia de los otros tratamientos, el decanal (3%) formó parte de los VOCs principales. Este perfil se mantuvo hasta el 3 DAF mientras que

el ocimeno y el metilbenzoato se detectaron solo hacia el final de la antesis, cuando se detecto también estireno como un compuesto principal. La figura 13 destaca las diferencias entre compuestos detectados frente a no detectados durante el desarrollo floral a diferentes temperaturas. En resumen, podemos destacar que acetofenona y feniletanol son emitidos de forma estable independiente de la edad floral y la temperatura, aunque la contribución relativa al perfil cambia. Particularmente notable es también la baja emisión de metilbenzoato a temperaturas altas y el retraso en la emisión de ocimeno durante la maduración de la flor especialmente a temperaturas altas, así como el predominio de la emisión de feniletanol en la apertura de la flor a altas y bajas temperaturas.

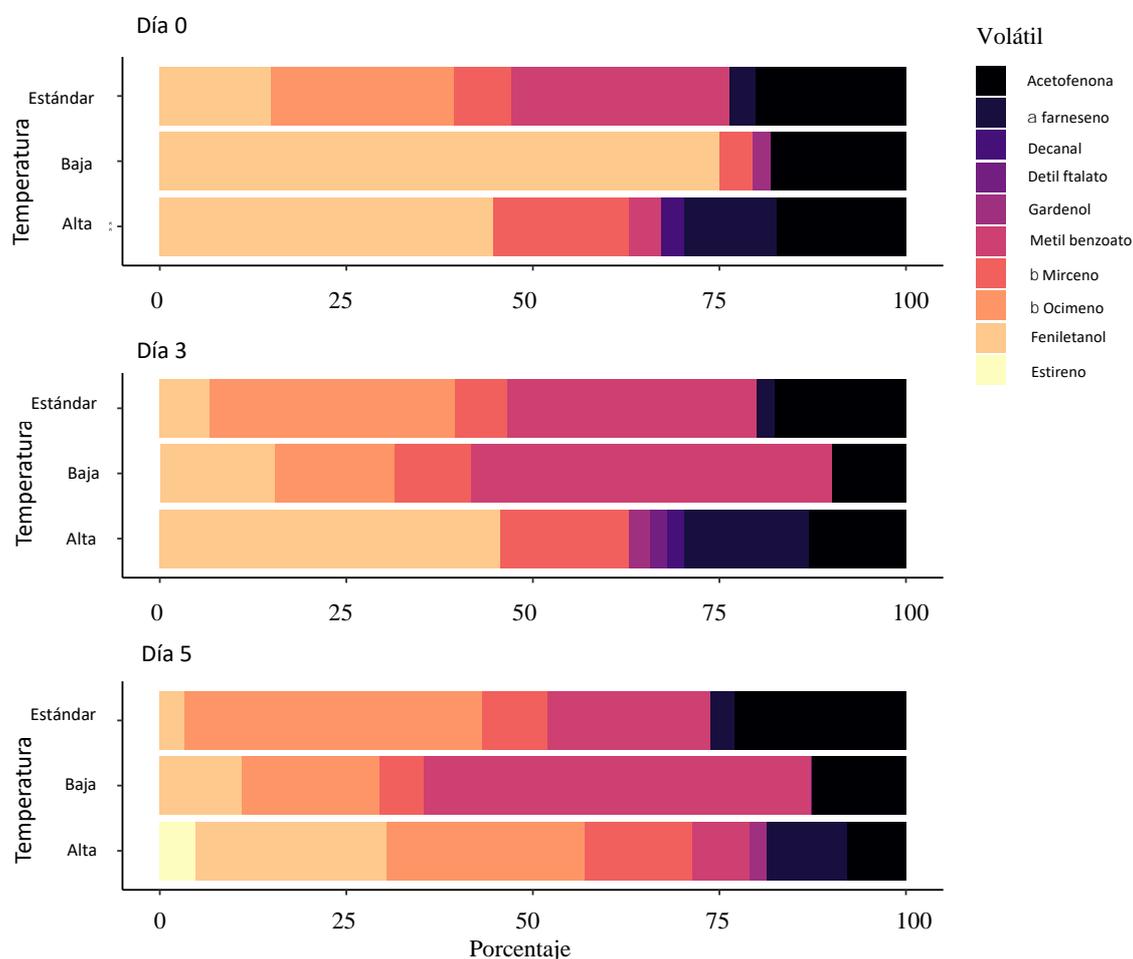


Figura 12. Principales VOCs emitidos en los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, de frío y calor.

Clase	Volátil	Día 0			Día 3			Día 5		
		Estándar	Baja	Alta	Estándar	Baja	Alta	Estándar	Baja	Alta
Alcohol	Gardenol									
	Decanal									
Aldehído	Acetofenona									
	Metil benzoato									
Bencenoide	Estireno									
	β-mirceno									
Monoterpeno	β-ocimeno									
	β-farneseno									
Sesquiterpeno	β-farneseno									
Fenilpropanoide	Feniletanol									

Detectado	No-detectado
-----------	--------------

Figura 13. Comparación de principales VOCs emitidos frente a no emitidos en los días 0, 3 y 5 después de la antesis en condiciones estándar, de frío y calor.

2.5.- Discusión

Efecto de temperatura sobre la pigmentación y la estructura celular de los pétalos

Las flores de *Antirrhinum majus* son zigomorfas y el tubo de la corola está cerrado por dos labios. La apertura de la corola requiere presión mecánica y las flores son polinizadas principalmente por las abejas recolectoras de néctar (Glover y Martin, 1998). Las abejas tienen un sistema de visión tricromático, que oscila entre 300 y 700 nm. Los tres tipos de fotorreceptores alcanzan su máximo en los rangos UV, (344nm) azul (438nm) y verde (560nm) (Reverté *et al.*, 2016). Los cambios en el color de la flor, ya sea por cambios en el contenido de pigmento o por cambios en la estructura de las células de los pétalos, también pueden afectar la atracción del polinizador. Incluso en flores blancas, las flores con células cónicas muestran una mayor polinización en comparación con las flores de células planas (Glover y Martin, 1998). En condiciones de calor, las flores de *Antirrhinum* presentaron una pigmentación roja en forma de antocianina muy débil. Se mostró en otras especies que esta reducción está relacionada con una menor expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas (Lai *et al.*, 2011). En contraste, las temperaturas más frías provocaron un incremento en el contenido total de antocianinas. Similar a la antocianina de pétalos, el contenido relativo de clorofila de la hoja se elevó a una temperatura más baja. Esta observación es opuesta a la clorosis provocada por las bajas temperaturas debido a un deterioro en el desarrollo del cloroplasto en el maíz o el arroz (Nie *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1996). No observamos ningún efecto sobre la forma de las células cónicas del lóbulo del pétalo adaxial. La estructura celular cónica contribuye a la absorción de luz de los pigmentos florales y a la intensificación del color del pétalo y la atracción del polinizador (Glover y Martin, 1998). Además, se

demonstró que las células cónicas ayudan a las abejas a alimentarse al aumentar el agarre de las flores. Nuestras observaciones sugieren que la temperatura puede afectar la atracción del polinizador y la eficiencia de forrajeo a través de cambios en la pigmentación de los pétalos, mientras que la estructura de las células de los pétalos no se ve afectada.

Efecto de temperatura sobre el tamaño y el número de flores

El rendimiento de la planta depende en gran medida de las condiciones ambientales y tanto el estrés biótico como el abiótico pueden alterar el número y / o el tamaño de los órganos laterales. Es importante entender cómo las plantas reaccionan y se adaptan a los ambientes adversos y la selección de plantas de resistencia al estrés es crucial en términos de productividad agrícola (Zhu, 2016). El análisis de la plasticidad fenotípica en el desarrollo de la flor en *Anthirrinum* en respuesta a los cambios en dos factores ambientales, defoliación y hacinamiento, mostró que el tamaño floral es un rasgo robusto (Bayo-Canha *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2016a). En caso de hacinamiento, esta robustez puede explicarse por una señalización de auxina estable y un SAM estable, ya que la expresión de los genes involucrados en el mantenimiento del meristemo apical del tallo, el ciclo celular y la polaridad del órgano no varían significativamente en comparación con las condiciones de control (Weiss *et al.*, 2016a). Por otro lado, se documenta que la exposición a altas temperaturas durante la diferenciación floral puede alterar la forma de la flor, como en caso de la formación de un doble pistilo en la cereza dulce (Beppu *et al.*, 2001).

En contraste con los factores ambientales de hacinamiento y defoliación, el presente análisis muestra que la temperatura tiene un efecto significativo sobre el tamaño de la flor, tanto en lo que respecta al peso de las flores como a las partes y órganos florales específicos. Sorprendentemente, en el caso de temperaturas más altas, aun cuando todos los parámetros de las flores fueron más pequeños en comparación con las condiciones estándar, esta diferencia no fue significativa para la longitud del tubo floral. Se demostró que el gen *AINTEGUMENTA* (*ANT*) es un determinante del tamaño del pétalo a través del control del tamaño celular y la expansión celular en *Anthirrinum* y *Petunia*, con una mayor expresión en la corola en comparación con el tubo (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). Esto muestra claramente que el tubo y la corola tienen una red genética diferencial, lo que puede explicar la respuesta diferencial a temperaturas variables. Sin embargo, los cambios en el tamaño de los diferentes parámetros florales en respuesta a temperaturas

variables no cambiaron la arquitectura floral general. También se observó un cambio en la longitud del pedicelo según el régimen de temperatura para las flores ornamentales de *Sandersonia aurantiaca*. Similar a nuestros resultados, esta especie mostró pedicelos más largos a temperaturas más altas y, en contraste con nuestros resultados, flores más sésiles a temperaturas más bajas (Catley *et al.*, 2002).

El análisis del área celular de las células de pétalos planas y cónicas no mostró diferencias significativas entre los diferentes regímenes de temperatura, lo que indica que las diferencias significativas de tamaño en la expansión del pétalo superior no se deben a un tamaño celular aumentado o reducido, sino a cambios en el número de células. Nuestra observación está de acuerdo con las observaciones sobre el estrés hídrico durante el desarrollo tardío de la hoja en yuca, lo que condujo a un tamaño reducido de la hoja debido a una falla en la recuperación del número de células adecuado, pero no al tamaño de la célula (Alves y Setter, 2004).

Los cambios en el tamaño y peso de las flores fueron inversos al número de flores en caso de bajas temperaturas, que resultaron en menos flores con un tamaño superior. A altas temperaturas, la reducción en el tamaño floral no fue acompañado de un aumento en el número de flores. Cambios en el número de flores bajo condiciones de estrés parece ser una respuesta típica en *Anthirrinum majus*, observado también en caso de hacinamiento y defoliación (Bayo-Canha *et al.*, 2007; Weiss *et al.*, 2016a).

Efecto de temperatura sobre la calidad del polen y la producción de semillas.

Observaciones sobre la germinabilidad de polen en *Antirrhinum turtuosum* indican que este parámetro se ve afectado negativamente por las temperaturas más altas y más bajas (Alaimo *et al.*, 1997). Aquí confirmamos que las temperaturas más altas redujeron significativamente la viabilidad del polen, pero en contraste con *Antirrhinum turtuosum*, las temperaturas más bajas afectaron positivamente la viabilidad del polen en comparación con el régimen de temperatura estándar. Curiosamente, el aumento de la viabilidad del polen a bajas temperaturas coincidió con un número de semillas significativamente menor por cápsula, mientras que la reducción de la viabilidad del polen a altas temperaturas no se reflejó en un cambio significativo en el número de semillas en comparación con las condiciones de control. Esto indica que otros parámetros además de la viabilidad del polen, como la germinación del polen y el crecimiento del tubo de polen, pueden afectar la fertilización y el desarrollo de semillas en *Antirrhinum*. La pérdida de vigor del polen en términos de longitud del tubo de polen es una respuesta

general del polen estresado (Shivanna *et al.*, 1991). El porcentaje más alto, aunque no significativo, de germinación de semillas observado en el caso de las cápsulas cosechadas de plantas mantenidas a temperaturas más altas en comparación con las condiciones estándar puede estar relacionado con el entorno específico de la planta donante. Se sabe del trigo que, además del genotipo, también el entorno en el que crecen las plantas donantes, influye en las hormonas endógenas en el grano y finalmente en la competencia embriogénica (Hess y Carman, 1998)

Efecto de temperatura sobre la emisión de volátiles

Varios estudios sobre diferentes especies informan sobre los efectos de la temperatura en la emisión de volátiles florales. Las diferencias se refieren a variaciones en la cantidad, el perfil o la ritmicidad circadiana de la producción de VOCs. Las especies de *Jasminum* florecientes en verano e invierno muestran diferencias en la emisión máxima que ocurre por la tarde en las especies florecientes de verano y al mediodía en las especies florecientes de invierno, independientemente de la apertura de la flor, debido al requerimiento de temperaturas superiores a 20°C para la emisión máxima de volátiles, una temperatura que corresponde a la tarde en condiciones de invierno tropical (Barman y Mitra, 2018)

En dos variedades de híbridos de Petunia, las temperaturas crecientes de 28/22 a 34 / 28°C provocaron una disminución en la emisión de aromas florales de la ruta del fenilpropanoide en aproximadamente un 40%. Esta disminución fue acompañada por una disminución en los niveles internos de fuentes de fenilpropanoides volátiles, una reducción en el nivel de pigmento, una regulación a la baja de enzimas específicas del "producto final" que catalizan los pasos finales de la biosíntesis de compuestos aromáticos de ambas vías "fenilpropanoides" y "shikimato" y una regulación positiva de un regulador negativo de la producción de aromas, EMISSION OF BENZENOIDS V (EOBV) (Cna'ani *et al.*, 2015). Las flores de *Hesperis matronalis* producen menos volátiles a baja temperatura, a pesar de que la respuesta de compuestos volátiles particulares varía y la producción de acetato de bencilo incluso supera la de las temperaturas de control (Nielsen *et al.*, 1995). De forma similar a estas observaciones, observamos una reducción en la cantidad total de compuestos volátiles producidos en ambos regímenes de temperatura, pero con un efecto más fuerte en temperaturas más bajas.

Aunque la emisión de la mayoría de los compuestos se redujo, algunos VOCs mostraron una mayor producción en momentos específicos después de la antesis. A 3 DAF, la flor emitió 4,1 y 3,2 veces más feniletanol a bajas y altas temperaturas, respectivamente.

Un análisis previo mostró que la emisión total de VOCs en las especies de *Antirrhinum* aumenta durante la antesis seguido de una disminución después de 5-6 días (comunicación personal). De manera similar, observamos un aumento para la mayoría de los VOCs hasta 5 DAF en temperaturas estándar y temperaturas altas. Sin embargo, en caso de temperaturas bajas, las flores mostraron fluctuaciones insignificantes en la emisión entre 0 a 5 DAF, lo que podría estar relacionado con un retraso en la maduración de las flores. Anteriormente, se demostró que el perfil de VOCs en *A. majus* es bastante robusto, aun así, algunas líneas o especies también pueden mostrar perfiles cambiantes y se concluyó que existe un mecanismo común para la emisión de VOCs durante el envejecimiento de la flor que está sujeto a cambios dependiendo del VOC individual (Weiss *et al.*, 2016b). Asimismo, observamos un perfil robusto de VOCs durante el envejecimiento en condiciones estándar, pero no a temperaturas altas y bajas. Especialmente, la emisión relativa de los VOCs dominantes de *A. majus*, el metilbenzoato y el ocimeno, pero también el feniletanol, parecían estar influenciados por los cambios en la temperatura. El metilbenzoato y el feniletanol se producen a través de la vía shikimato / fenilpropanoides (Hirata *et al.*, 2016), mientras que el monoterpeno ocimeno se sintetiza a través de la vía del metil-eritritol-fosfato (MEP) (Farré-Armengol *et al.*, 2017), lo que significa que la respuesta diferencial de los compuestos de VOCs a las temperaturas altera el perfil de VOCs durante la antesis.

En resumen, nuestras observaciones sobre la emisión de volátiles en flores de *A. majus* que se desarrollan bajo diferentes regímenes de temperatura indican que la temperatura es una importante señal ambiental que controla la fragancia de las flores de *Antirrhinum*, tanto en términos de emisión total como de perfil. Como el perfil de VOCs es un rasgo clave de interacción con insectos (Suchet *et al.*, 2010; Schiestl, 2010), proponemos que la temperatura puede afectar la atracción del polinizador al cambiar múltiples factores incluida la fragancia floral.

2.6- Referencias

- Alaimo, M.G., Melati, M.R. and Scialabba, A.** (1997) Pollen grain stereostructure, viability and germination; correlation with temperature of *Antirrhinum tortuosum* Bosc. *Acta Botanica Gallica*, **144**, 171-181.
- Alves, A.A.C. and Setter, T.L.** (2004) Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Annals of botany*, **94**, 605–13.
- Anderson, N.O.** (2007) *Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century*, Springer Science & Business Media.
- Baudino, S., Caissard, J.-C., Bergougnoux, V., Jullien, F., Magnard, J.-L., Scalliet, G., Cock, J.M. and Huguene, P.** (2007) Production and emission of volatile compounds by petal cells. *Plant signaling & behavior*, **2**, 525–6.
- Bayo-Canha, A., Delgado-Benarroch, L., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2007) Artificial decrease of leaf area affects inflorescence quality but not floral size in *Antirrhinum majus*. *Scientia Horticulturae*, **113**.
- Beppu, K., Ikeda, T. and Kataoka, I.** (2001) Effect of high temperature exposure time during flower bud formation on the occurrence of double pistils in ‘Satohnishiki’ sweet cherry. *Scientia Horticulturae*, **87**, 77–84.
- Carvalho, S.M.P., Abi-Tarabay, H. and Heuvelink, E.** (2005) Temperature affects Chrysanthemum flower characteristics differently during three phases of the cultivation period. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **80**, 209–216.
- Catley, J.L., Brooking, I.R., Davies, L.J. and Halligan, E.A.** (2002) Temperature and irradiance effects on *Sandersonia aurantiaca* flower shape and pedicel length. *Scientia Horticulturae*, **93**, 157–166.
- Chen, X., Shi, L., Chen, Y., Zhu, L., Zhang, D., Xiao, S., Aharoni, A., Shi, J. and Xu, J.** (2019) Arabidopsis HSP70-16 is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures. *Plant, Cell & Environment*, **42**, 1190–1204.
- Cna’ani, A., Mühlemann, J.K., Ravid, J., Masci, T., Klempien, A., Nguyen, T.T.H., Dudareva, N., Pichersky, E. and Vainstein, A.** (2015) *Petunia* × *hybrida* floral scent production is negatively affected by high-temperature growth conditions. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 1333–1346.
- Delgado-Benarroch, L.** (2010) Sizing up the flower. In M. Yaish and M. Yaish, eds. *The Flowering Process and its Control in Plants: Gene Expression and Hormone Interaction*. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost., pp. 199-216.
- Delgado-Benarroch, L., Causier, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009) FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*. *Planta*, **229**, 1219–1229.
- Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M. and Pichersky, E.** (1996) Evolution of floral scent in *Clarkia*: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. *The Plant cell*, **8**, 1137–48.
- Dudareva, N., Raguso, R.A., Wang, J., Ross, J.R. and Pichersky, E.** (1998) Floral scent production in *Clarkia breweri*. III. Enzymatic synthesis and emission of benzenoid esters. *Plant physiology*, **116**, 599–604.
- Endo, M., Tsuchiya, T., Hamada, K., Kawamura, S., Yano, K., Ohshima, M., Higashitani, A., Watanabe, M. and Kawagishi-Kobayashi, M.** (2009) High temperatures cause male sterility in rice plants with transcriptional alterations during pollen development. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1911–1922.
- Eran Pichersky, R.A.R., Efraim Lewinsohn and Rodney Croteau** (1994) Floral Scent Production in *Clarkia* (Onagraceae) 1. Localization and Developmental Modulation of

Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity. *Plant Physiology*, **106**, 1533–1540.

Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusià, J. and Peñuelas, J. (2017) β -Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plants and Other Organisms. *Molecules*, **22**, 1148.

Glover, B.J. and Martin, C. (1998) The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, **80**, 778–784.

Golz, J.F., Keck, E.J. and Hudson, A. (2002) Spontaneous mutations in KNOX genes give rise to a novel floral structure in *Antirrhinum*. *Current Biology*, **12**, 515–522.

Hess, J.R. and Carman, J.G. (1998) Embryogenic Competence of Immature Wheat Embryos: Genotype, Donor Plant Environment, and Endogenous Hormone Levels. *Crop Science*, **38**, 249.

Hirata, H., Ohnishi, T. and Watanabe, N. (2016) Biosynthesis of floral scent 2-phenylethanol in rose flowers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **80**, 1865–1873.

Kho, Y.O. and Baër, J. (1968) Observing pollen tubes by means of fluorescence. *Euphytica*, **17**, 298–302.

Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T. and Davies, B. (2006) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell*, **18**, 560–573.

Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M. and Dudareva, N. (2001) Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant cell*, **13**, 2333–47.

Krizek, B.A. (1999) Ectopic expression AINTEGUMENTA in Arabidopsis plants results in increased growth of floral organs. *Developmental Genetics*, **25**, 224–236.

Lai, Y.-S., Yamagishi, M. and Suzuki, T. (2011) Elevated temperature inhibits anthocyanin biosynthesis in the tepals of an Oriental hybrid lily via the suppression of LhMYB12 transcription. *Scientia Horticulturae*, **132**, 59–65.

Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *Plant Journal*, **72**.

Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **72**, 294–307.

Manchado-Rojo, M., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2014) Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*, **12**.

Mizukami, Y. and Fischer, R.L. (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 942–7.

Nie, G.-Y., Robertson, E.J., Fryer, M.J., Leech, R.M. and Baker, N.R. (1995) Response of the photosynthetic apparatus in maize leaves grown at low temperature on transfer to normal growth temperature. *Plant, Cell & Environment*, **18**, 1–12.

Nielsen, J.K., Jakobsen, H.B., Friis, P., Hansen, K., Møller, J. and Olsen, C.E. (1995) Asynchronous rhythms in the emission of volatiles from *Hesperis matronalis* flowers. *Phytochemistry*, **38**, 847–851.

- Reverté, S., Retana, J., Gómez, J.M. and Bosch, J.** (2016) Pollinators show flower colour preferences but flowers with similar colours do not attract similar pollinators. *Annals of botany*, **118**, 249–57.
- Rodriguez-Saona, C., Parra, L., Quiroz, A. and Isaacs, R.** (2011) Variation in highbush blueberry floral volatile profiles as a function of pollination status, cultivar, time of day and flower part: implications for flower visitation by bees. *Annals of botany*, **107**, 1377–90.
- Ruiz-Ramon, F., Águila, D.J.D.J., Egea-Cortines, M., Weiss, J., Ruíz-Ramón, F., Águila, D.J.D.J., Egea-Cortines, M. and Weiss, J.** (2014) Optimization of fragrance extraction: daytime and flower age affect scent emission in simple and double narcissi. *Industrial Crops and Products*, **52**, 671–78.
- Sagae, M., Oyama-Okubo, N., Ando, T., Marchesi, E. and Nakayama, M.** (2008) Effect of temperature on the floral scent emission and endogenous volatile profile of *Petunia axillaris*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **72**, 110–5.
- Schiestl, F.P.** (2010) The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, **13**, 643–656.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F.X., Jurgens, G. and Laux, T.** (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, **100**, 635–644.
- Schuurink, R.C., Haring, M.A., Clark, D.G., et al.** (2006) Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends in Plant Science*, **11**, 20–25.
- Shin, H.K., Lieth, J.H. and Kim, S.H.** (2001) EFFECTS OF TEMPERATURE ON LEAF AREA AND FLOWER SIZE IN ROSE. *Acta Horticulturae*, 185–191.
- Shivanna, K.R., Linskens, H.F. and Cresti, M.** (1991) Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*, **81**, 38–42.
- Sommer, H. and Saedler, H.** (1986) Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *MGG Molecular & General Genetics*, **202**, 429–434.
- Stuurman, J., Jaggi, F., Kuhlemeier, C. and Jäggi, F.** (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a GRAS-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes & Development*, **16**, 2213–2218.
- Suchet, C., Dormont, L., Schatz, B., Giurfa, M., Simon, V., Raynaud, C. and Chave, J.** (2010) Floral scent variation in two *Antirrhinum majus* subspecies influences the choice of naïve bumblebees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **65**, 1015–1027.
- Verdonk, J.C., Ric de Vos, C.H., Verhoeven, H.A., Haring, M.A., Tunen, A.J. van and Schuurink, R.C.** (2003) Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry*, **62**, 997–1008.
- Weiss, J., Alcantud-Rodriguez, R., Toksöz, T. and Egea-Cortines, M.** (2016a) Meristem maintenance, auxin, jasmonic and abscisic acid pathways as a mechanism for phenotypic plasticity in *Antirrhinum majus*. *Scientific reports*, **6**, 19807–19807.
- Weiss, J., Mühlemann, J.K., Ruiz-Hernández, V., Dudareva, N. and Egea-Cortines, M.** (2016b) Phenotypic space and variation of floral scent profiles during late flower development in *Antirrhinum*. *Frontiers in Plant Science*, **7**.
- Yeaman, R.L., Roulston, T.H. and Carr, D.E.** (2014) Pollen quality for pollinators tracks pollen quality for plants in *Mimulus guttatus*. *Ecosphere*, **5**, 91.
- Yoshida, R., Kanno, A., Sato, T. and Kameya, T.** (1996) Cool-temperature-induced chlorosis in rice plants. *Plant Physiol*, **110**, 997–1005.
- Zenoni, S., Reale, L., Torielli, G.B., et al.** (2004) Downregulation of the *Petunia hybrida* alpha-expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *The Plant cell*, **16**, 295–308.

- Zhang, X., Xu, Z., Yu, X., Zhao, L., Zhao, M., Han, X. and Qi, S.** (2019) Identification of Two Novel R2R3-MYB Transcription factors, PsMYB114L and PsMYB12L, Related to Anthocyanin Biosynthesis in *Paeonia suffruticosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**, 1055.
- Zhao, D. and Tao, J.** (2015) Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00261/abstract>.
- Zheng, S.-H., Nakamoto, H., Yoshikawa, K., Furuya, T. and Fukuyama, M.** (2002) Influences of High Night Temperature on Flowering and Pod Setting in Soybean. *Plant Production Science*, **5**, 215–218.

2.7- Información suplementaria

Tabla S1. Niveles de significancia en las diferencias entre plantas cultivadas bajo temperatura estándar versus temperatura alta y baja con respecto a (A) clorofila en hojas (B) longitud de pedúnculo (D) viabilidad del polen (F) peso de flor (G) mediciones de parámetros florales (H) número de flores (I) germinación de semillas (J) número de semillas/cápsula

(A)			
Nivel de clorofila	Estándar vs alto	Estándar vs bajo	Alto vs bajo
Hoja apical	0,87	0,015*	0,012*
Hoja mediana	0,90	0,012*	0,0018**
Hoja basal	0,22	0,005**	0,046*
(B)			
Longitud de pedúnculo	1,0e-05***	0,33	0,00003***
(C)			
Nivel de antocianinas (absorbancia)	0,06*	2,7e-07***	2,4e-08***
(D)			
Emisión de VOCs total			
Día 0	0,86	0,36	0,08
Día 3	0,06	0,0051**	0,007**
Día 5	0,004**	0,003**	0,004**
(E)			
Viabilidad del polen	0,002**	0,006**	0,0004***
(F)			
Peso de flor	1,6e-07***	0,002**	8,1e-11***
(G)			
Parámetros florales			
P1 Longitud del tubo floral	1,00	1,00	1,00
P2 Longitud del pétalo inferior	0,001**	0,58	0,003**
P3 Anchura del pétalo	5,1e-08***	0,12	1,8e-09***
P4 Longitud del sépalo	0,005**	0,39	0,009**
P5 Anchura del tubo floral	0,006**	0,34	0,39
P6 Longitud del péalo superior	7,9e-07***	0,13	2,6e-08***
P7 Expansión del pétalo inferior	0,03*	0,003**	9,6e-06***
P8 Expansión del pétalo superior	0,01*	0,003**	0,001**
P9 Longitud del estambre	3,6e-06***	0,7700	2,5e-06***
P10 Longitud del gineceo	1,9e-07***	0,04*	4,0e-05***
P11 Expansión del “pallate”	3,3e-05***	0,58	0,0002***
(H)			
Número de flores/inflorescencia	0,30	0,02*	0,05
(I)			
Germinación de semillas	0,05	0,73	0,006**
(J)			

CAPÍTULO 3 – Mecanismos genéticos controlando efectos de estrés de temperatura sobre características florales en *Antirrhinum majus*

(Genetic mechanisms controlling temperature stress effects on flower development in *Antirrhinum majus*)

3.1.-Resumen

En *Antirrhinum majus*, las características de los pétalos de las flores están influenciadas por la temperatura de exposición de la planta durante el desarrollo de la inflorescencia. Las temperaturas más bajas producen flores más pesadas debido al mayor número de células con una coloración más intensa, pero con una emisión reducida de compuestos orgánicos volátiles (VOCs – volatile organic compounds) y un perfil de VOCs modificado. Igualmente, las temperaturas más altas reducen la emisión de VOCs y cambian el perfil de VOCs, pero las flores son más pálidas, pesan menos y se reduce el número de células. Analizamos la expresión de genes involucrados en los caracteres antes mencionados bajo temperatura estándar (22/15 °C) en comparación con temperaturas altas (30/23 °C) y bajas (15/5 °C). La expresión de genes que controlan la expansión celular, α *EXPANSINA* (*AmEXP*) y *BIGPETAL* (*AmBPE*), no se alteraron significativamente, lo que confirma las observaciones microscópicas electrónicas previas. Si bien la expresión de *CYCLIN D3a* (*AmCYCD3a*), un marcador del ciclo celular para la maduración de los pétalos no difería significativamente entre los regímenes de temperatura, la *histona 4* (*AmH4*), un marcador de síntesis de ADN, se regulaba negativamente a temperaturas más altas y más bajas. Este cambio en *AmH4* puede explicar la expansión de pétalos reducida a temperaturas más altas, mientras que los pétalos más grandes a temperaturas más bajas podrían deberse a un mayor período de división celular. De acuerdo con la pigmentación más intensa a temperaturas más bajas, la expresión de *CHALCONE SYNTHASE* (*AmCHS*) aumentó significativamente en comparación con las condiciones estándar a 0 días apertura floral (DAF), mientras que la pigmentación más pálida a altas temperaturas no se relacionó con cambios significativos en la expresión de *AmCHS*. Aunque las observaciones microscópicas previas no indican cambios en el tamaño de las células de pétalos cónicos, observamos una disminución significativa de la expresión de *AmMIXTA*, un gen que controla la formación de células cónicas. El gen *BAMT* (Benzoic acid Carboxymethyl Transferase), un gen que codifica la enzima involucrada en la síntesis de metilbenzoato, uno de los principales compuestos de VOCs en *A. majus*, se expresa en células cónicas. A pesar de la menor expresión de *AmMIXTA* y la reducción de la emisión de metilbenzoato a temperaturas altas y bajas, la

expresión de *BAMT* no se alteró significativamente, lo que indica que pueden ocurrir cambios en el nivel postraduccional de *BAMT*.

3.2.-Introducción

La temperatura juega un papel importante en todo el desarrollo de la planta. Las señales de temperatura pueden actuar como un estímulo que controla las transiciones del desarrollo, así como mejorar la tolerancia a temperaturas extremas (Franklin, 2009). Como las plantas son sésiles y no pueden escapar de las temperaturas adversas, desarrollaron estrategias de aclimatación a la temperatura, que se asocian principalmente con la evitación del calor y los mecanismos de tolerancia a la temperatura e incluyen cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares. Estas respuestas difieren entre las especies, pero en la mayoría de los casos, la temperatura óptima para el crecimiento vegetativo es mayor que para el crecimiento reproductivo (Hatfield y Prueger, 2015).

Las temperaturas más cálidas y extremas afectan significativamente la productividad de la planta. El estrés por calor afecta aproximadamente al 2% del genoma de la planta (Qu *et al.*, 2013) y el mecanismo afectado principalmente por estrés de calor es el aparato de fotosíntesis que causa daño al fotosistema II, acumulación de especies reactivas de oxígeno y compuestos antioxidantes (Mathur *et al.*, 2014) así como la destrucción de enzimas involucradas en la acumulación de clorofila en los plástidos (Mohanty *et al.*, 2006). Las estrategias comunes para evitar el calor incluyen cambios en los caracteres de las hojas, como hojas más pequeñas con mayor densidad estomática y de tricomas, cierre estomático y vasos de xilema más grandes (Mathur *et al.*, 2014). *Arabidopsis* responde a altas temperaturas con alargamiento de hipocotilo, hiponastia foliar, alargamiento rápido de la planta y floración temprana. Estas respuestas son todos caracteres similares al fenotipo de evitación de sombra y relacionados con genes involucrados en la señalización de auxina (Gray *et al.*, 1998; Koini *et al.*, 2009). La señalización de auxina bajo estrés por calor se confirmó en otras especies como el arroz, donde el gen *AET1*, una tRNA^{His} guanylyltransferasa, participa en la tolerancia a altas temperaturas al regular la eficiencia traduccional de los factores de respuesta a auxina *OsARF19* y *OsARF23*, que activan varios genes regulados por auxina (Chen *et al.*, 2019a). Curiosamente, un gen involucrado en la señalización de alta temperatura en *Arabidopsis*, el regulador transcripcional *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4)*, controla la respuesta en términos

de arquitectura de la planta, pero no el tiempo de floración (Koini *et al.*, 2009), apuntando a vías separadas de respuesta a altas temperaturas durante el desarrollo vegetativo y generativo. Igualmente, la expresión de proteínas de choque térmico específicas en *Arabidopsis* afecta específicamente procesos relacionados con caracteres vegetativos o generativos. Por ejemplo, la capacidad de tolerar temperaturas extremadamente altas está relacionada con la expresión de la proteína de choque térmico 101 (Hsp101) y los mutantes se caracterizan por un hipocotilo alargado y una termotolerancia reducida (Hong y Vierling, 2000). Se requiere la expresión de otra proteína de choque térmico de *Arabidopsis*, HSP19-16, para que bajo estrés por calor leve, los sépalos se separen y las flores se abran por completo, así como para garantizar la formación normal de órganos florales, la fertilización y el establecimiento de semillas (Chen *et al.*, 2019b). La expresión de HSP está mediada por factores de estrés por calor (Hsfs) como transductores de señal a través de la unión de Hsf al elemento promotor del gen de choque térmico (HSE). Hsfs específicos también detectan especies reactivas de oxígeno (ROS - Reactive Oxygen Species) endógenas generadas bajo estrés por calor y transfieren la señal de ROS a factores de transcripción aguas abajo, que a su vez se unen a elementos cis sensibles al estrés oxidativo en los promotores de genes que codifican antioxidantes (Qu *et al.*, 2013). Otro gen activado durante el estrés por calor y el estrés osmótico es *DREB2* (DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN) de la familia del factor de transcripción *AP2 / ERF*, que regula la expresión génica sensible al estrés (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005).

Los efectos fisiológicos y moleculares del estrés por calor específicamente en el desarrollo reproductivo incluyen la expresión de una supuesta proteína de choque térmico en anteras de arroz, el tejido floral más sensible al calor (Jagadish *et al.*, 2010). El reducido número de granos de polen y la reducida viabilidad del polen bajo estrés por calor en tomate se asocian con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos con una disminución en la concentración de almidón en las anteras y en azúcares solubles en las paredes de las anteras y los granos de polen. (Pressman *et al.*, 2002). Las flores de lirio bajo estrés por calor muestran una reducción significativa en la pigmentación y en la expresión de *chalcona sintasa (CHS)*, *flavanona 3-hidroxilasa (F3H)*, *dihidroflavonol 4-reductasa (DFR)* y *MYB12*, todos genes involucrados en la regulación o biosíntesis de antocianinas (Lai *et al.*, 2011). Un cambio morfológico observado en las flores consiste en una reducción de las dimensiones de los pétalos (Carvalho *et al.*, 2005). Con respecto

al perfume floral, la mayoría de los compuestos de fenilpropanoides disminuyen a temperaturas elevadas en *Petunia* y esta disminución se correlaciona con una regulación descendente de la expresión de genes estructurales relacionados con el olor de las vías fenilpropanoide y shikimato, así como con una regulación ascendente de la *Emission of Benzenoids V (EOBV)*, un regulador negativo de la producción de volátiles (Cna'ani *et al.*, 2015). En flores de boca de dragón (*Antirrhinum majus*), las temperaturas elevadas de día / noche de 30/23 °C en comparación con las temperaturas estándar de 22/15 ° conducen a una reducción en el contenido de antocianinas de pétalos, flores en general más pequeñas en todos los parámetros florales, excepto la longitud del tubo floral, una reducción en el número de células de pétalo, una viabilidad reducida del polen, una reducción en la cantidad total de volátiles, así como un cambio en el perfil de VOCs, especialmente en relación con la contribución de los principales volátiles metilbenzoato, ocimeno y feniletanol, y cambios marcados en el perfil de VOCs durante el envejecimiento floral (capítulo 2).

La sensibilidad de las plantas a bajas temperaturas depende de la especie. Los mecanismos de tolerancia al frío involucran varias respuestas bioquímicas, fisiológicas y moleculares que han evolucionado para permitir que las plantas ajusten su metabolismo y toleren esta situación ambiental adversa. La no adaptación al estrés de baja temperatura conduce a un crecimiento reproductivo reducido (Kurosaki y Yumoto, 2003), marchitamiento, clorosis, necrosis o muerte (Ruelland y Zachowski, 2010), mientras que los procesos de enfriamiento o adaptación al frío ayudan a superar este estrés. Las respuestas a baja temperatura implican la expresión de genes que codifican proteínas estructurales, proteínas reguladoras y osmoprotectores, incluyendo dehidrinas y proteínas de embriogénesis tardía (*LEA – late-embryogenesis*) (Janmohammadi *et al.*, 2015). El activador de transcripción *CBF1/DREB1b (C-REPEAT/DROUGHT-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR)* se expresa a bajas temperaturas, lo que provoca a un crecimiento restringido en parte al conducir a la acumulación de proteínas DELLA (Achard *et al.*, 2008).

Los efectos de la baja temperatura específicamente en los órganos reproductores pueden incluir un engrosamiento de la epidermis del pétalo y, en consecuencia, un cambio en la distribución de antocianinas, lo que lleva a un color más intenso (Zhao y Tao, 2015). En rosas, las temperaturas más bajas conducen a un aumento significativo en el peso seco de

las flores (Shin *et al.*, 2001) y en flores de la ornamental *Sandersonia aurantiaca*, se observa una reducción en la longitud del pedicelo a temperaturas más bajas (Catley *et al.*, 2002). En tomate, una temperatura más baja puede conducir a transformaciones homeóticas en los órganos reproductivos y una regulación positiva de ciertos genes tipo MADS (Lozano *et al.*, 1998). Temperaturas más bajas pueden también afectar la fertilidad al reducir la germinabilidad del polen, como se observa en *Antirrhinum tortuosum*. Las flores de *A. majus* cultivadas en bajas temperaturas diurnas/nocturnas de 15/5 °C se caracterizan por un aumento de los niveles de antocianinas en los pétalos, flores más pesadas con expansión de pétalos aumentada pero con una reducción en la longitud del gineceo, un mayor número de células en pétalos, una mayor viabilidad del polen, un fuerte reducción en la producción total de VOCs de la flor durante la floración, la falta de incremento de VOCs durante la maduración de la flor y cambios en el perfil de VOCs especialmente en relación con la emisión de metilbenzoato, ocimeno y feniletanol (capítulo 2).

En este trabajo realizamos un análisis de los efectos de la temperatura en el desarrollo de las flores en *A. majus* desde la perspectiva molecular y a la luz de análisis anatómicos, fisiológicos y químicos previos, así como en base de otros cambios de transcripción relacionados con el estrés reportados para *A. majus*. Analizamos el patrón de expresión cuantitativa de genes que abarcan genes marcadores para la producción de antocianinas, el tamaño celular, la estructura celular y la emisión de VOCs en dos etapas del desarrollo de la flor.

3.3.-Materiales y Métodos

Material vegetal, condiciones de cultivo y muestreo de tejido de pétalos

Tejido de pétalos fue recogido de la línea endogámica *Antirrhinum majus* 165E (Sommer y Saedler, 1986), sembrado en vermiculita fina y cultivado en macetas de plástico para viveros (650 ml de volumen). Durante la fase de crecimiento vegetativo, un total de 9 plantas se mantuvieron en una cámara de cultivo Sanyo MRL350 a una temperatura de 22/15 °C a un régimen de 16 h de luz fluorescente a una densidad de flujo de fotones fotosintéticamente activa de 250 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ y 8 h de oscuridad con un régimen de riego según necesidad. Después de la transición a la fase de floración, tres plantas se transfirieron a cámaras de crecimiento con un régimen de luz idéntico, pero temperaturas

de 15/5 °C y 30/23 °C, respectivamente. Se tomaron muestras de tejido de pétalos de 3 flores de plantas individuales mantenidas bajo los diferentes regímenes de temperatura en los días 0 y 3 DAF.

RT-qPCR

El ARN total se aisló del tejido de pétalo usando el kit de extracción de ARN de planta NucleoSpin (MACHEREY-NAGEL, www.mn-net.com) que incluye DNase. La calidad y concentración de ARN se determinó por espectrofotometría con un NanoDrop (Thermo-Fisher). La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando 500 ng de ARN total con el kit Maxima (Thermo-Fisher) de acuerdo con el manual del usuario. Los genes se amplificaron en una máquina de PCR a tiempo real Qiagen Rotor Gene Q (www.qiagen.com), usando SYBR Green (TaKaRa, SYBR Green Master Mix, Kusatsu, Shiga, Japan) de acuerdo con el manual del usuario y cebadores específicos de secuencia (Table S1). Los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen (www.invitrogen.com). Se usó el siguiente protocolo: 95 °C durante 4 min y luego 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 58 °C durante 15 s y 72 °C durante 30 s. El gen ubiquitina (AmUBQ) se utilizó como control para la normalización (Manchado-Rojo *et al.* 2012). Para cada gen y etapa de desarrollo, realizamos qPCR en tres réplicas biológicas y dos técnicas.

Diseño de cebadores de genes marcadores

Seleccionamos genes marcadores previamente identificados en *A. majus*. Aplicamos cebadores previamente publicados para RT-PCR de los genes correspondientes. La Tabla 1 resume la información sobre el nombre, la referencia, la función del gen y la secuencia de cebadores de genes que pertenecen a las categorías tamaño de pétalo, marcador del ciclo celular, estructura celular cónica, síntesis de antocianinas é emisión de volátiles.

Table 1. Información sobre cebadores utilizados para qPCR

Categoría	Nombre del gen	Referencia	Función	Cebadores
Gen de referencia	<i>AmUBIQ</i>	(Manchado-Rojo <i>et al.</i> 2012)	Gen utilizado habitualmente como control para RT-PCR	For: GCCGATGGAAGTATATGTTTGGACATC rev: CTAACTTTGCGGTTATAATCTCGTTTA

Tamaño de petalo	Aintegumenta (ANT)	(Manchado-Rojo <i>et al.</i> , 2014)	Juega un papel en el tamaño del órgano lateral a través del control de la división y expansión celular.	For: TTGCTGCAATCAAGTTCAGG Rev: CAATGCCAATCAAATCATGC
	BIGPETAL (BPE)	(Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009a)	Inhibe la expansión celular de pétalos	For :GATGATGAGTGACGGTGGTG Rev: GCGCTTAACCGAATTGTGAT
	α .EXPANSIN (AmEXP)	(Marowa <i>et al.</i> , 2016)(Sara Zenoni <i>et al.</i> , 2011)	Proteínas de la pared celular, necesarias para el agrandamiento celular y la mediación del aflojamiento de la pared celular.	For: TTGAGCTCCACACTCTTCTC Rev:CGACCGTAAACCTAATTCTC
Marcador de ciclo celular	<i>CYCLIND3a</i> (AmCYCD3a)	(Delgado-Benarroch <i>et al.</i> , 2009a)	Marcadores del índice mitótico	For: CACTGCGGTTCTTGCAGTTA Rev: TGAAATTGGGGTGACTGGAT
	<i>HSITONE H4</i> (AmH4)	(Weiss <i>et al.</i> , 2016)		For: TTGGAGAATGTGATCCCGTGA Rev: TAACCCTAACCCCAAATCC
Estructura de células cónicas en pétalos	<i>MIXTA</i>	(Manchado-Rojo <i>et al.</i> , 2012)	Promueve el desarrollo de células cónicas en el lóbulo superior del pétalo.	For: CACCAACTACTCCGCACGTCC Rev: CCATTGACGACGACGAGGCC
Emisión de volátiles	<i>Benzoic acid carboxymethyl transferase</i> AmBAMT	(Ruiz-Hernández <i>et al.</i> , 2017)	Enzima responsable de la síntesis de metil benzoato	For:AACCGATGAATTTACGCACA Rev:TTCTACTAGGGTATAACTTCTAACG
Síntesis de antocianina	<i>Chalcone synthase</i> AmCHS (NIVEA)	(Sommer y Saedler, 1986) (Wienand <i>et al.</i> , 1982)	CHS condensa tres moléculas de malonil-CoA y una de p-coumaroyl-CoA para formar calcononaringe nina	For:ACCAACAGGGTTGCTTTGCTGG Rev:ATAACCGCTGCTGCACCATCAC

Análisis estadístico

El cálculo de los perfiles de expresión génica para todos los genes se realizó utilizando los valores (Ct) del umbral del ciclo normalizado. La expresión normalizada se calculó mediante el método 2^{-DDCt} (Schmittgen y Livak, 2008). Las diferencias estadísticas entre los perfiles de expresión génica se analizaron mediante la comparación (Pfaffl *et al.*, 2002).

3.4.-Resultados y Discusión

Alteraciones en los genes relacionados con el tamaño del pétalo.

Como se informó anteriormente, las temperaturas elevadas de día/noche de 30/23 °C en comparación con las temperaturas estándar de 22/15 ° causan una disminución en el

tamaño de la flor en *A. majus* en la mayoría de los parámetros florales. Por el contrario, el cultivo a bajas temperaturas diurnas/nocturnas de 15/5 °C conduce a flores más pesadas con un tamaño de pétalo aumentado. En ambas condiciones, el tamaño de las células del pétalo adaxial no muestra cambios significativos, por lo que las diferencias en el tamaño de pétalo aparentemente son la consecuencia del aumento del número de células de pétalo (capítulo 2). En general, los cambios en el tamaño de los órganos pueden deberse a cambios en la proliferación o la expansión celular.

CYCLIN D3a (CYCD3a) y *HISTONE H4 (H4)* son marcadores para el índice mitótico. En las flores de boca de dragón, la expresión de *CYCD3a* está restringida a la región periférica de primordios florales que corresponde a las regiones de primordios de sépalos y pétalos. También es el gen predominante en las regiones del pétalo en maduración (Gaudin *et al.*, 2000). La expresión de *H4* se considera un marcador indicativo de la fase S, lo que indica la replicación del ADN (Gaudin *et al.*, 2000). Las diferencias en la expresión de *CYCD3a* no fueron significativas entre los diferentes regímenes de temperatura. La expresión de *H4* se redujo significativamente a temperaturas altas y bajas en comparación con las condiciones estándar a 0 DAF y a 3 DAF. La reducción fue más pronunciada a 0 DAF con una expresión 3 y 3,8 veces menor a altas y bajas temperaturas, respectivamente, mientras que en el día 3 DAF, la reducción fue 1,3 veces tanto a temperaturas más altas como más bajas.

Una replicación reducida de ADN concuerda con un tamaño reducido de pétalos (ver capítulo 2) a altas temperaturas debido a un número reducido de células. Una replicación reducida del ADN a bajas temperaturas, coincidiendo con pétalos más grandes (ver capítulo 2), indicaría una compensación por una mayor expansión celular. Un mecanismo de compensación fue observado en flores de *A. majus* del mutante *coan (compacta ähnlich)*, donde una división celular reducida en los pétalos se compensa por una mayor expansión celular (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009b). Sin embargo, las medidas microscópicas previas del área celular (véase el capítulo 2) de las regiones del lóbulo del pétalo externo no indicaron un mayor tamaño de la célula a temperaturas más bajas, lo que sugiere que los pétalos más grandes probablemente resultan de un mayor período de división celular. Tanto la expresión de *AmCYCD3a* como la de *AmH4* fueron significativamente más altas a 0 DAF en comparación con 3 DAF a temperatura estándar, pero no a temperatura más alta o más baja, lo que indica que aquí se altera el patrón de

un crecimiento celular de pétalos más pronunciado por división celular durante las primeras etapas.

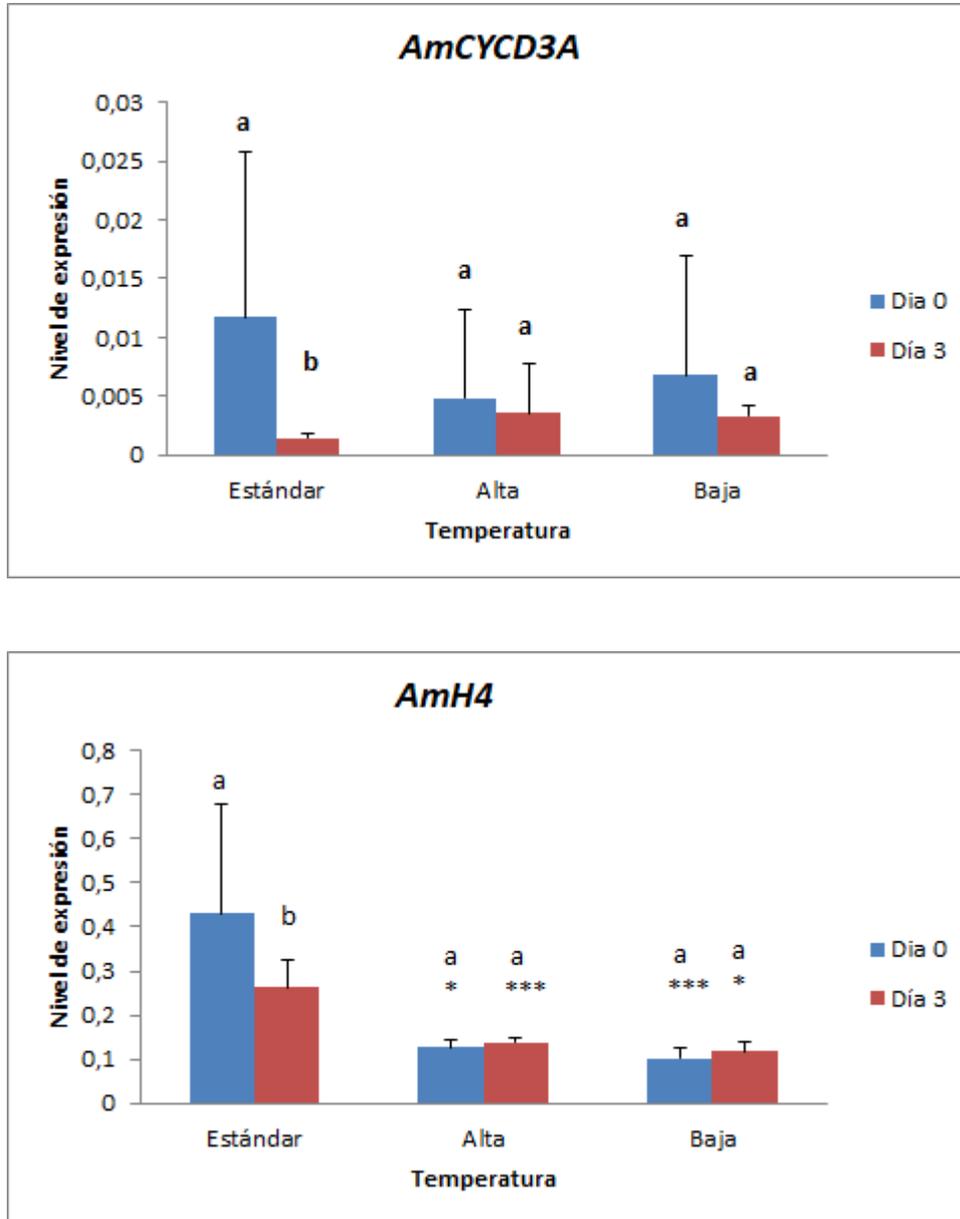
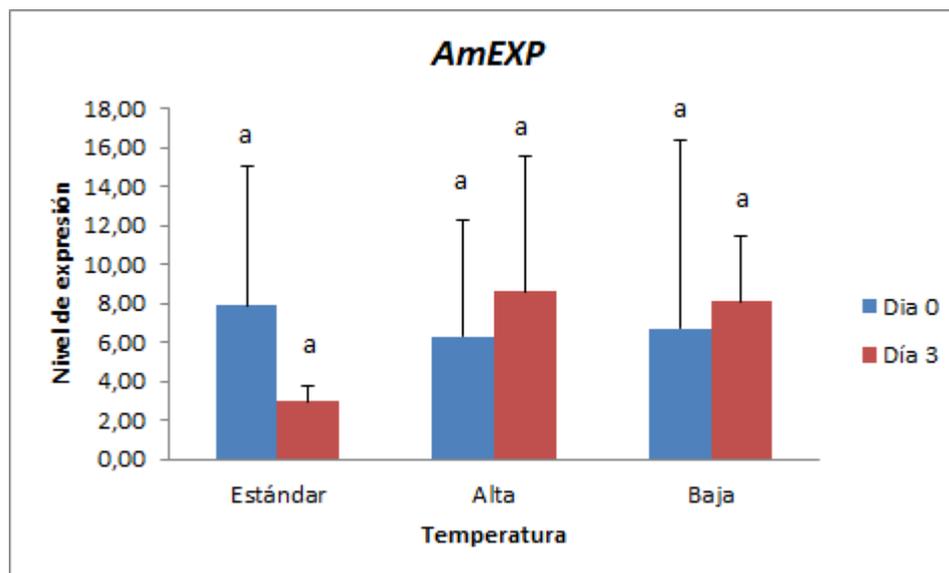


Fig. 1. Expresión de *AmCYCD3A* y *AmH4* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{\text{experimental}} - Ct_{\text{normalización}})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Con el fin de investigar si el cambio en el tamaño de pétalos a temperaturas más bajas o más altas posiblemente esta relacionado con cambios en el tamaño celular, analizamos dos genes involucrados en la expansión celular, α *EXPANSIN* (*AmEXP*) y *BIGPETAL* (*AmBPE*). Las expansinas son proteínas de la pared celular, necesarias para el crecimiento celular y la mediación de la pérdida de rigidez (Zenoni *et al.*, 2011; Marowa *et al.*, 2016). En Petunia, la regulación negativa de *PhEXPA1* reduce el tamaño de la corola, acompañado por una reducción en el grosor de la pared celular, una reducción del contenido en celulosa cristalina en la pared celular y una reducción en el tamaño de la célula epidérmica (Zenoni *et al.*, 2004). Otro gen relacionado con el tamaño del pétalo a través de la expansión celular es el factor de transcripción *BIGPETAL* (*BPE*) y este gen actúa como un represor de la expansión celular en *Arabidopsis* (Szécsi *et al.*, 2006) y pétalos de *Antirrhinum* (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009b). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de temperatura, lo que indica que los cambios en el tamaño de los pétalos se deben principalmente a cambios en el número de células, como ya se predijo por medidas microscópicas electrónicas anteriores (capítulo 2).



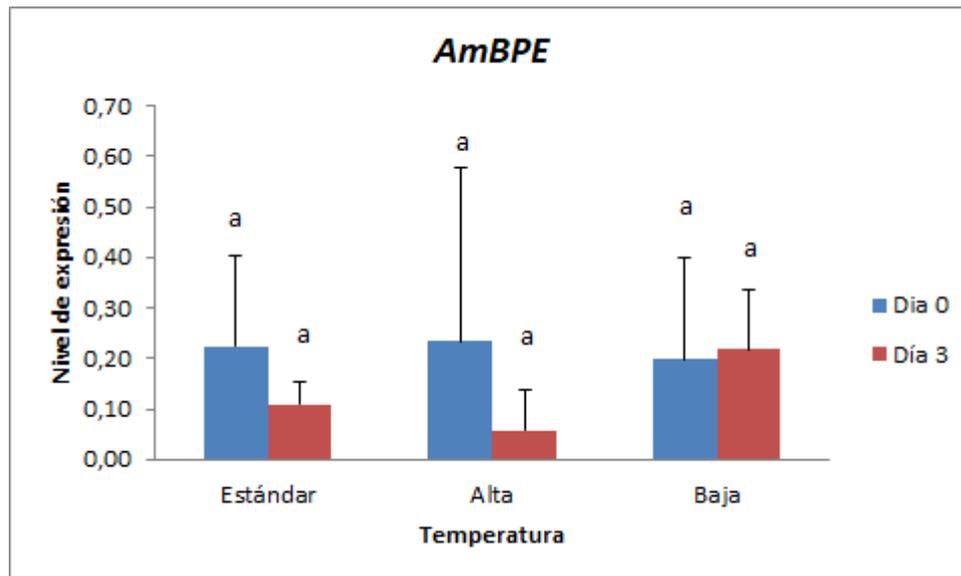


Fig. 2. Expresión de *AmEXP* and *AmBPE* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{experimental} - Ct_{normalización})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Los cambios en el número de células de pétalo en el mutante de *A. majus fo (formosa)* están relacionados con un cambio en la expresión de *AINTEGUMENTA*, un factor de transcripción *APETALA 2* (Delgado-Benarroch *et al.*, 2009a). La expresión de *ANT* está relacionada con la señalización de auxina, porque está regulada por el gen *ARGOS* inducible por auxina (Hu *et al.*, 2003). En *Arabidopsis*, la expresión constitutiva de *ANT* conduce a flores más grandes debido a un período de proliferación prolongado (Nole-Wilson y Krizek, 2006; Y Mizukami y Fischer, 2000). En *A. majus*, la sobreexpresión de *AtANT* provoca un aumento del tamaño de la flor, que coincide con una mayor expansión celular (Manchado-Rojo *et al.*, 2014). En contrario, en *Arabidopsis*, el nivel de expresión de *ANT* en el desarrollo de flores puede estar relacionado con el número total de células en órganos maduros (Mizukami y Fischer, 2000). La Fig. 3 muestra la expresión normalizada de *AmANT* en flores a 0 y 3 DAF, cultivadas en regímenes de temperatura alta y baja en comparación con las condiciones estándar. Los resultados no mostraron diferencias significativas en la expresión de *AmANT*, lo que indica que la temperatura no afecta la expresión de *ANT*, como podría esperarse de la falta de diferencias en el tamaño celular. *ANT* pertenece a la cascada de genes activados aguas abajo de la señal de auxina,

lo que indica que la ruta de auxina mediada por ANT podría no estar involucrada en la respuesta al estrés por temperatura durante el desarrollo de la flor. Esto contrasta con la señalización de auxina a temperaturas elevadas con respecto a los tejidos vegetativos en *Arabidopsis*, lo que conduce a la elongación de hipocotilo, hiponastia de las hojas, elongación rápida de las plantas y floración temprana (Gray *et al.*, 1998; Koini *et al.*, 2009).

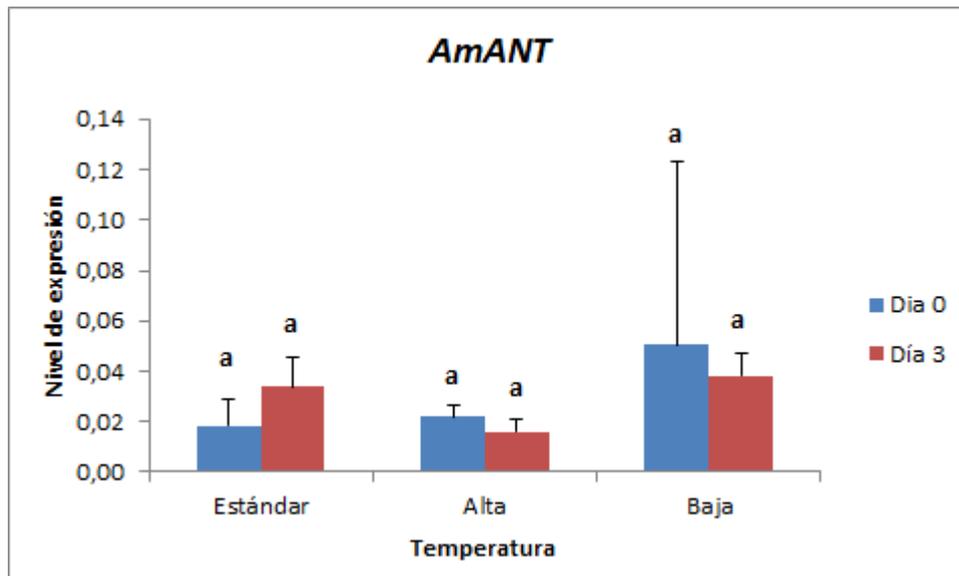


Fig. 3. Expresión de *AmANT* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{experimental} - Ct_{normalización})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Alteraciones en un gen relacionado con la pigmentación de pétalos

La pigmentación de pétalos por estrés térmico se caracteriza por una reducción en la pigmentación (Lai *et al.*, 2011) (capítulo 2). En las flores de lirio, esta reducción se relaciona con una menor expresión de genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas, incluida la *CHALCONA SINTASA (CHS)*, la *FLAVANONA 3-HIDROXILASA (F3H)*, la *DIHIDROFLAVONOL 4-REDUCTASA (DFR)* *MYB12* (Lai *et al.*, 2011). Al contrario, las temperaturas más bajas conducen a un color más intenso (Zhao y Tao, 2015)(capítulo2). En *Petunia*, las temperaturas bajas moderadas conducen

a un mayor contenido de antocianinas en la corola, así como a una mayor expresión de la CHALCONA SINTASA (*CHS*). Sin embargo, sus picos de expresión no coinciden con el pico de contenido de antocianinas, lo que indica efectos pos-traduccionales del tratamiento con frío (Shvarts *et al.*, 1997). Encontramos que bajo temperaturas estándar y altas, la expresión de *AmCHS* en pétalos de *A. majus* no difirió significativamente entre 0 y 3 DAF, lo que indica que las antocianinas se sintetizan comenzando en las primeras etapas de la apertura de la flor y continuando durante la antesis. Sorprendentemente, a bajas temperaturas, la expresión de *AmCHS* fue significativamente y 5,7 veces menor a 3 DAF en comparación con 0 DAF, aunque el contenido de antocianina fue significativamente mayor a 3 DAF a bajas temperaturas (capítulo 2). Los resultados coinciden con la diferencia entre máxima expresión de *CHS* y máximo contenido en antocianinas observado en *Petunia* a bajas temperaturas (Shvarts *et al.* 1997). En consecuencia, la expresión de *AmCHS* fue significativamente más alta a bajas temperaturas en comparación con las condiciones estándar a 0 DAA. La pigmentación reducida a altas temperaturas no coincidió con cambios significativos en la expresión de *AmCHS*, lo que indica posibles cambios en otros genes involucrados en la síntesis de antocianinas y / o una degradación por enzimas activas (Liu *et al.*, 2018).

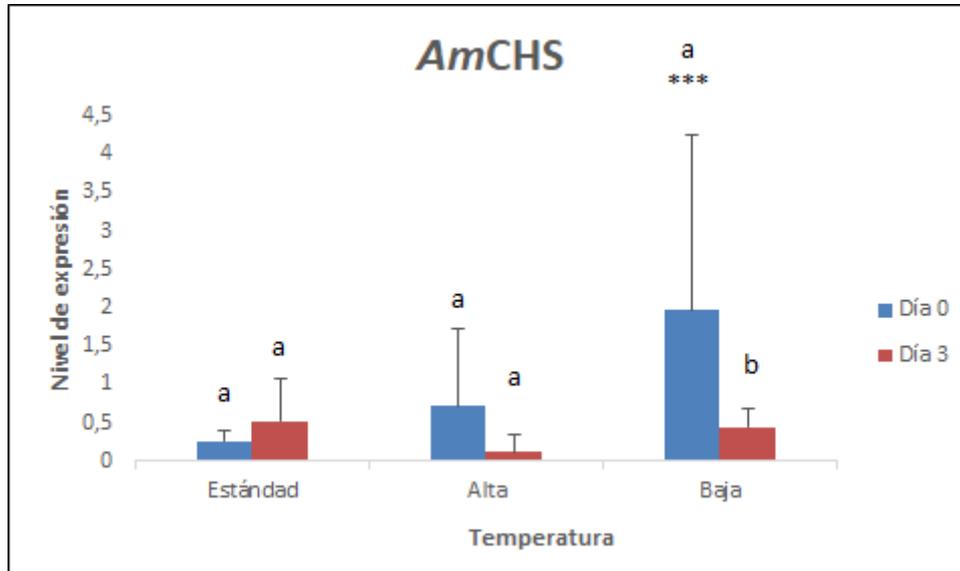


Fig. 4. Expresión de *AmCHS* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{experimental} - Ct_{normalización})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para

cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Alteraciones en un gen relacionado con la estructura celular del pétalo

Las etapas tardías en el desarrollo de pétalos se caracterizan por la expresión de *MIXTA*, una proteína MYB que participa en el control transcripcional de la forma de las células epidérmicas y cuya expresión está controlada por los genes de la función B (Carpenter y Coen, 1990; Noda *et al.*, 1994). La expresión de *MIXTA* conduce a la formación de células cónicas en los lóbulos superior e inferior de los pétalos de *Antirrhinum* (Kolossova *et al.*, 2001). La estructura celular cónica intensifica el color de los pétalos al aumentar la cantidad de absorción de luz de los pigmentos florales, desempeñando así un papel crítico en la atracción de polinizadores (Glover y Martin, 1998). Las células cónicas también están involucradas en la producción de volátiles, ya que la proteína BAMT, la enzima involucrada en la producción del volátil principal de *A. majus*, metilbenzoide, se localiza en las células cónicas de los pétalos (Kolossova *et al.*, 2001). El mutante *compacta (co)* de *A. majus* muestra niveles reducidos de expresión de *MIXTA*, una fuerte disminución en el área celular cónica y una disminución en la producción general de volátiles (Manchado-Rojo *et al.*, 2012). Los niveles de expresión de *MIXTA* diferían notablemente entre las temperaturas estándar frente a altas y bajas temperaturas. Las diferencias fueron significativas solo a los 3 DAF, con una reducción de 6.8 y 9.5 veces, respectivamente. Observaciones previas de microscopía electrónica con respecto al tamaño de las células cónicas en las regiones distales del pétalo abaxial no indicaron diferencias entre los regímenes de temperatura. Sin embargo, la regulación negativa de *MIXTA* indica que las temperaturas altas y bajas tienen un efecto sobre la forma de las células epidérmicas en las flores de *Antirrhinum*. Si bien la expresión de *AmMIXTA* no varió durante antesis en condiciones estándar, las temperaturas más altas y más bajas cambiaron significativamente estos patrones con una expresión 8 veces menor a 3 DAF en comparación con 0 DAF bajo calor y una expresión 22 veces mayor a 3 DAF en comparación con 0 DAF bajo frío.

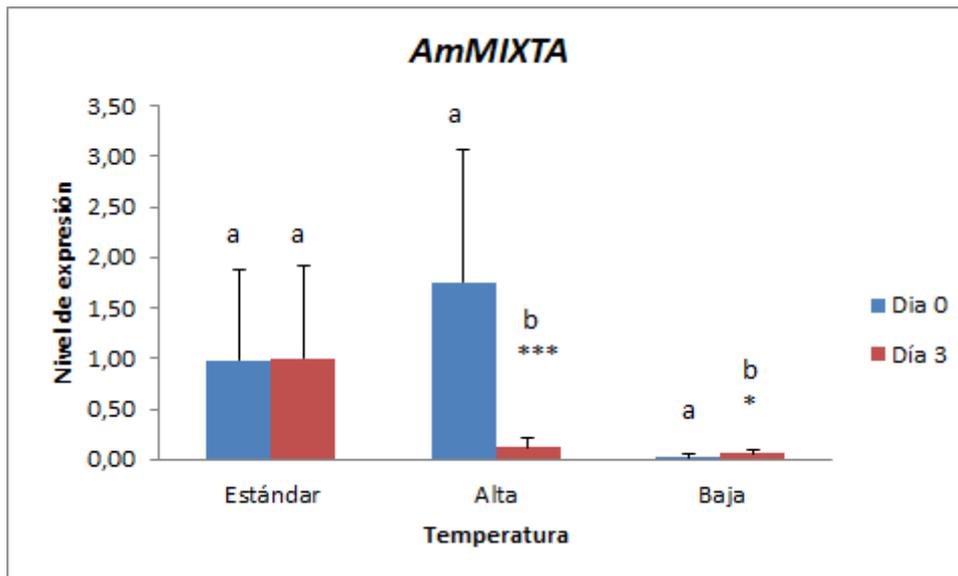


Fig. 5. Expresión de *AmMIXTA* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{experimental} - Ct_{normalización})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

Alteraciones en un gen relacionado con la emisión de VOCs

El análisis previo de los volátiles florales de *A. majus* mostró que, bajo calor, la emisión total de VOCs es similar a las temperaturas estándar a 0 DAF, pero 53% más baja a 3 DAF. Bajo frío, la emisión de VOCs se reduce en un 77% y un 25% a 0 y 3 DAF (capítulo 2). Metilbenzoato es un volátil mayoritario de *A. majus* que contribuye con aproximadamente una cuarta parte de la fragancia de la flor durante la floración en condiciones de temperatura estándar. A bajas temperaturas, la emisión de metilbenzoato se reduce a < 2%, 38% y 70% de emisión en condiciones estándar en los días 0, 3 y 5 DAF. A altas temperaturas, la emisión de metilbenzoato se reduce a 15%, < 2% y 23% de emisión en condiciones estándar en los días 0, 3 y 5 DAF (capítulo 2). De manera similar, en las flores de *Petunia*, los compuestos volátiles del tipo “fenilpropanoide” disminuyen a temperaturas elevadas, coincidiendo con una disminución en la expresión de genes estructurales relacionados con volátiles de las vías fenilpropanoide y shikimato (Cna’ani *et al.*, 2015). Analizamos la expresión de *BAMT* (*Benzoic acid Carboxymethyl*

Transferase) en flores de *A. majus* a 0 y 3 DAF. *BAMT* es un enzima involucrado en la producción de metilbenzoato, y el gen se expresa en las células cónicas de los pétalos, a su vez controlado por la actividad del gen *MIXTA* (Dudareva, 2000; Kolosova *et al.*, 2001). A pesar de la fuerte reducción en la emisión de metilbenzoato a temperaturas altas y bajas a 0 y 3 DAF, así como la reducción en la expresión de *AmMIXTA* a 3 DAA, las diferencias en la expresión de *BAMT* no fueron significativas. Esto indica que las condiciones de temperatura posiblemente afectan la producción de proteína *BAMT* al nivel pos-transcripcional o los procesos de transporte para su emisión. Los niveles de expresión de *BAMT* no difirieron durante la antesis a temperaturas estándar y temperaturas bajas, mientras que aumentaron a 3 DAF a temperaturas más altas, lo que confirma que la temperatura tiene un efecto sobre el perfil de VOCs.

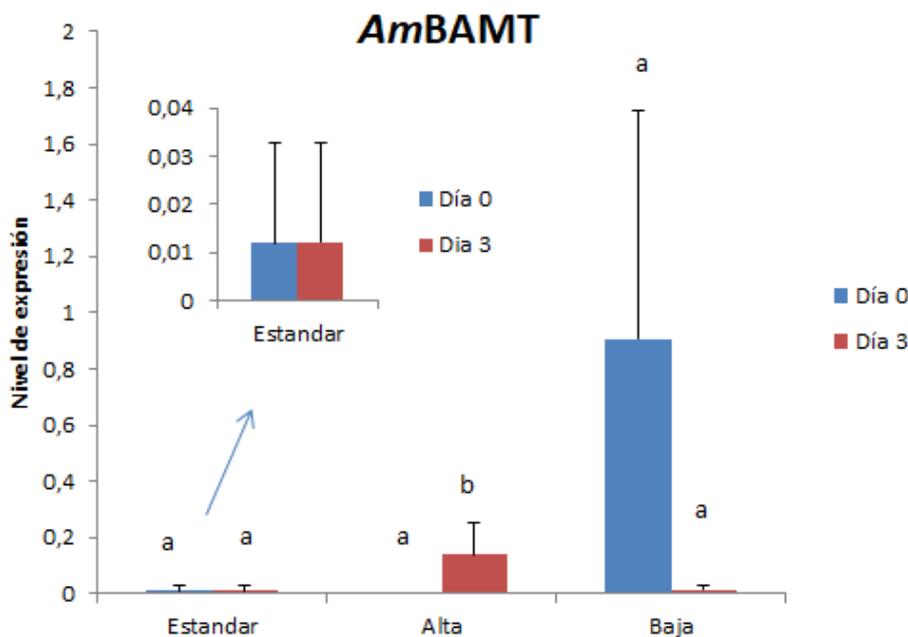


Fig. 6 Expresión de *AmBAMT* en flores de *Antirrhinum majus* a 0 y 3 DAF, mantenidas en condiciones de temperatura estándar, altas y bajas. La expresión representa la expresión normalizada (NE) de acuerdo con la fórmula $NE = 2^{-(Ct_{\text{experimental}} - Ct_{\text{normalización}})}$. Se analizaron tres muestras para cada punto de tiempo y las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas a temperaturas estándar versus altas y bajas por separado para 0 y 3 DAF con * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ mientras que las letras indican diferencias entre 0 y 3 DAF para cada régimen de temperatura por separado según la comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

3.5.-Conclusión

Las temperaturas altas y bajas afectan varias características de las flores, incluyendo el tamaño, el color y la emisión de VOCs. Descubrimos que estos efectos están asociados a cambios en la expresión de determinados genes marcadores de estos caracteres. La expresión del marcador de división celular *AmH4*, pero no de *AmCYCD3a*, se redujo bajo calor y frío, mientras que los marcadores de expansión celular *AmEXP* y *AmBPE* fueron estables, lo que indica un efecto de temperatura sobre el número de células, pero no la expansión celular. Los cambios en el tamaño de la flor a temperaturas más altas y más bajas no parecían estar relacionados con la señalización de auxina, ya que la expresión de *AmANT* era estable. Las alteraciones en el contenido de antocianinas en los pétalos pueden asociarse con cambios en la expresión de *AmCHS* solo bajo tratamiento con frío. Como lo indica una regulación negativa de *AmMIXTA*, un gen involucrado en el desarrollo de células cónicas, la estructura de las células de pétalo se ve afectada por las altas y bajas temperaturas. Este cambio también podría explicar la reducción de emisiones de VOCs, ya que las células cónicas son los principales emisores de VOCs. Sin embargo, *AmBAMT*, un gen involucrado en la síntesis del VOC principal metilbenzoato y expresado en células cónicas, mostró una expresión estable, lo que indica posibles cambios en la proteína BAMT al nivel pos-transcripcional.

3.6.-Referencias

- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. and Genschik, P.** (2008) The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell*, **20**, 2117–2129.
- Carpenter, R. and Coen, E.S.** (1990) Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev.*, **4**, 1483–1493.
- Carvalho, S.M.P., Abi-Tarabay, H. and Heuvelink, E.** (2005) Temperature affects *Chrysanthemum* flower characteristics differently during three phases of the cultivation period. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **80**, 209–216.
- Catley, J.L., Brooking, I.R., Davies, L.J. and Halligan, E.A.** (2002) Temperature and irradiance effects on *Sandersonia aurantiaca* flower shape and pedicel length. *Scientia Horticulturae*, **93**, 157–166.
- Chen, K., Guo, T., Li, X.-M., et al.** (2019a) Translational Regulation of Plant Response to High Temperature by a Dual-Function tRNA^{His} Guanylyltransferase in Rice. *Molecular Plant*. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674205219301625> [Accessed July 22, 2019].
- Chen, X., Shi, L., Chen, Y., Zhu, L., Zhang, D., Xiao, S., Aharoni, A., Shi, J. and Xu, J.** (2019b) Arabidopsis HSP70-16 is required for flower opening under normal or mild heat stress temperatures. *Plant, Cell & Environment*, **42**, 1190–1204.
- Cna'ani, A., Mühlemann, J.K., Ravid, J., Masci, T., Klempien, A., Nguyen, T.T.H., Dudareva, N., Pichersky, E. and Vainstain, A.** (2015) *Petunia × hybrida* floral scent production is negatively affected by high-temperature growth conditions. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 1333–1346.
- Delgado-Benarroch, L., Causier, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009a) FORMOSA controls cell division and expansion during floral development in *Antirrhinum majus*. *Planta*, **229**, 1219–1229.
- Delgado-Benarroch, Luciana., Weiss, J. and Egea-Cortines, M.** (2009b) The mutants *compacta* ähnlich, *Nitida* and *Grandiflora* define developmental compartments and a compensation mechanism in floral development in *Antirrhinum majus*. *Journal of Plant Research*, **122**, 559–569.
- Dudareva, N.** (2000) Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. *PLANT PHYSIOLOGY*, **122**, 627–634.
- Franklin, K.A.** (2009) Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 63–68.
- Gaudin, V., Lunness, P.A., Fobert, P.R., Towers, M., Riou-Khamlichi, C., Murray, J.A.H., Coen, E. and Doonan, J.H.** (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the *cycloidea* gene. *Plant Physiology*, **122**, 1137–1148.
- Glover, B.J. and Martin, C.** (1998) The role of petal cell shape and pigmentation in pollination success in *Antirrhinum majus*. *Heredity*, **80**, 778–784.
- Gray, W.M., Östin, A., Sandberg, G., Romano, C.P. and Estelle, M.** (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *PNAS*, **95**, 7197–7202.
- Hatfield, J.L. and Prueger, J.H.** (2015) Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, **10**, 4–10.
- Hong, S.-W. and Vierling, E.** (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the

acquisition of tolerance to high temperature stress. *PNAS*, **97**, 4392–4397.

Hu, Y.X., Xie, O., Chua, N.H. and Xie, Q. (2003) The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size. *The Plant Cell*, **15**, 1951–1961.

Jagadish, S.V.K., Muthurajan, R., Oane, R., Wheeler, T.R., Heuer, S., Bennett, J. and Craufurd, P.Q. (2010) Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, **61**, 143–156.

Janmohammadi, M., Zolla, L. and Rinalducci, S. (2015) Low temperature tolerance in plants: Changes at the protein level. *Phytochemistry*, **117**, 76–89.

Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. and Franklin, K.A. (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology*, **19**, 408–413.

Kolosova, N., Gorenstein, N., Kish, C.M. and Dudareva, N. (2001) Regulation of circadian methyl benzoate emission in diurnally and nocturnally emitting plants. *The Plant cell*, **13**, 2333–47.

Kurosaki, H. and Yumoto, S. (2003) Effects of Low Temperature and Shading during Flowering on the Yield Components in Soybeans. *Plant Production Science*, **6**, 17–23.

Lai, Y.-S., Yamagishi, M. and Suzuki, T. (2011) Elevated temperature inhibits anthocyanin biosynthesis in the tepals of an Oriental hybrid lily via the suppression of LhMYB12 transcription. *Scientia Horticulturae*, **132**, 59–65.

Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F. and Bovy, A. (2018) Anthocyanin Biosynthesis and Degradation Mechanisms in Solanaceous Vegetables: A Review. *Front Chem*, **6**. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855062/> [Accessed December 12, 2019].

Lozano, R., Angosto, T., Gómez, P., Payán, C., Capel, J., Huijser, P., Salinas, J. and Martínez-Zapater, J.M. (1998) Tomato Flower Abnormalities Induced by Low Temperatures Are Associated with Changes of Expression of MADS-Box Genes. *Plant Physiology*, **117**, 91–100.

Manchado-Rojo, M., Delgado-Benarroch, L., Roca, M.J., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2012) Quantitative levels of Deficiens and Globosa during late petal development show a complex transcriptional network topology of B function. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **72**, 294–307.

Manchado-Rojo, M., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2014) Validation of Aintegumenta as a gene to modify floral size in ornamental plants. *Plant Biotechnology Journal*, **12**.

Marowa, P., Ding, A. and Kong, Y. (2016) Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep*, **35**, 949–965.

Mathur, S., Agrawal, D. and Jajoo, A. (2014) Photosynthesis: Response to high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **137**, 116–126.

Mizukami, Y. and Fischer, R.L. (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 942–7.

Mohanty, S., Grimm, B. and Tripathy, B.C. (2006) Light and dark modulation of chlorophyll biosynthetic genes in response to temperature. *Planta*, **224**, 692–699.

Noda, K., Glover, B.J., Linstead, P. and Martin, C. (1994) Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, **369**, 661–4.

Nole-Wilson, S. and Krizek, B.A. (2006) AINTEGUMENTA contributes to organ polarity and regulates growth of lateral organs in combination with YABBY genes.

Plant Physiology, **141**, 977–987.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl. Acids Res.*, **30**, e36-.

Pressman, E., Peet, M.M. and Pharr, D.M. (2002) The Effect of Heat Stress on Tomato Pollen Characteristics is Associated with Changes in Carbohydrate Concentration in the Developing Anthers. *Ann Bot*, **90**, 631–636.

Qu, A.-L., Ding, Y.-F., Jiang, Q. and Zhu, C. (2013) Molecular mechanisms of the plant heat stress response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **432**, 203–207.

Ruelland, E. and Zachowski, A. (2010) How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, **69**, 225–232.

Ruiz-Hernández, V., Hermans, B., Weiss, J. and Egea-Cortines, M. (2017) Genetic analysis of natural variation in Antirrhinum scent profiles identifies BENZOIC ACID CARBOXYMETHYL TRANSFERASE as the major locus controlling methyl benzoate synthesis. *Frontiers in Plant Science*, **8**.

Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, **3**, 1101–8.

Shin, H.K., Lieth, J.H. and Kim, S.H. (2001) EFFECTS OF TEMPERATURE ON LEAF AREA AND FLOWER SIZE IN ROSE. *Acta Horticulturae*, 185–191.

Shvarts, M., Borochoy, A. and Weiss, D. (1997) Low temperature enhances petunia flower pigmentation and induces chalcone synthase gene expression. *Physiologia Plantarum*, **99**, 67–72.

Sommer, H. and Saedler, H. (1986) Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. *MGG Molecular & General Genetics*, **202**, 429–434.

Szécsi, J., Joly, C., Bordji, K., Varaud, E., Cock, J.M., Dumas, C. and Bendahmane, M. (2006) BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *The EMBO journal*, **25**, 3912–20.

Weiss, J., Alcantud-Rodriguez, R., Toksoz, T. and Egea-Cortines, M. (2016) Meristem maintenance, auxin, jasmonic and abscisic acid pathways as a mechanism for phenotypic plasticity in *Antirrhinum majus*. *Scientific Reports*, **6**.

Wienand, U., Sommer, H., Schwarz, Zs., et al. (1982) A general method to identify plant structural genes among genomic DNA clones using transposable element induced mutations. *Molec Gen Genet*, **187**, 195–201.

Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, **10**, 88–94.

Zenoni, S., D'Agostino, N., Torielli, G.B., et al. (2011) Revealing impaired pathways in the an11 mutant by high-throughput characterization of *Petunia axillaris* and *Petunia inflata* transcriptomes. *The Plant Journal*, **68**, 11–27.

Zenoni, S., Fasoli, M., Torielli, G.B., et al. (2011) Overexpression of PhEXPA1 increases cell size, modifies cell wall polymer composition and affects the timing of axillary meristem development in *Petunia hybrida*. *New Phytol*, **191**, 662–677.

Zenoni, S., Reale, L., Torielli, G.B., et al. (2004) Downregulation of the *Petunia hybrida* alpha-expansin gene PhEXP1 reduces the amount of crystalline cellulose in cell walls and leads to phenotypic changes in petal limbs. *The Plant cell*, **16**, 295–308.

Zhao, D. and Tao, J. (2015) Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Frontiers in Plant Science*, **6**. Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2015.00261/abstract>.

3.7- Información suplementaria

Tabla S1. Expresión relativa (ER) y niveles de significancia (valor p) de los genes *AmCYCD3a*, *AmH4*, *AmEXP*, *AmBPE*, *AmANT*, *AmCHS*, *AmMIXTA* y *AmBAM* en pétalos de *A. majus* a altas y bajas temperaturas frente a temperatura estándar y a 0 DAF frente a 3 DAF en base de comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

	Estándar vs temp. alta 0 DAF		Estándar vs temp. baja 0 DAF		Estándar vs temp. alta 3 DAF		Estándar vs temp. baja 3 DAF	
	ER	p	ER	p	ER	p	ER	P
<i>AmCYCD3a</i>	0,257	0,233	0,591	0,305	1,018	0,916	1,528	0,328
<i>AmH4</i>	0,342	0,034	0,264	0,000	0,560	0,016	0,492	0,000
<i>AmEXP</i>	0,606	0,532	0,437	0,300	1,250	0,574	1,402	0,275
<i>AmBPE</i>	0,748	0,548	0,702	0,810	0,348	0,201	1,642	0,131
<i>AmANT</i>	1,147	0,783	0,591	0,305	0,524	0,102	1,094	0,637
<i>AmCHS</i>	1,046	0,877	3,624	0,000	0,274	0,199	0,906	0,901
<i>AmMIXTA</i>	1,558	0,735	0,003	0,097	0,148	0,000	0,105	0,012
<i>AmBAMT</i>	0,058	0,635	15,235	0,134	29,25	0,057	7,28	0,055

Tabla S2. Expresión relativa (ER) y niveles de significancia (valor p) de los genes (*AmCYCD3a*, *AmH4*, *AmEXP*, *AmBPE*, *AmANT*, *AmCHS*, *AmMIXTA* y *AmBAM*) en pétalos de *A. majus* a 0 DAF frente a 3 DAF a temperatura estándar, calor y frío en base de comparación grupal con el programa REST (Pfaffl *et al.*, 2002).

	0 vs 3 DAF a temp. estándar		0 vs 3 DAF a temp. Alta		0 vs 3 DAF a temp. baja	
	ER	p	ER	P	ER	P
<i>AmCYCD3a</i>	0,246	0,000	2,062	0,398	0,835	0,805
<i>AmH4</i>	0,457	0,047	1,715	0,065	0,771	0,601
<i>AmEXP</i>	0,346	0,032	2,647	0,448	1,633	0,796
<i>AmBPE</i>	0,456	0,933	0,499	0,445	1,164	0,933
<i>AmANT</i>	1,101	0,949	1,192	0,680	1,843	0,305
<i>AmCHS</i>	0,735	0,680	0,092	0,163	0,17	0,034
<i>AmMIXTA</i>	2,507	0,331	0,128	0,00	21,804	0,000
<i>AmBAMT</i>	1,175	0,525	77,854	0,033	0345	0,298

Comunicaciones a conferencias

Congreso: 4th Workshop on agri-food research (WiA)

Organizador: Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Autores: R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Lugar: Cartagena:

Fecha: 11-12/5/2015

Repositorio: <https://repositorio.upct.es/handle/10317/5290>

Congreso: 5th Workshop on agri-food research (WiA)

Organizador: Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Autores: R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Lugar: Cartagena

Fecha: 9-10/5/2016

Repositorio: <https://repositorio.upct.es/handle/10317/5558>

Congreso: 6th Workshop on agri-food research (WiA)

Organizador: Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Autores: R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Lugar: Cartagena

Fecha: 8-9/5/2017

Congreso: 7th Workshop on agri-food research (WiA)

Organizador: Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Autores: R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Lugar: Cartagena

Fecha: 7-8/5/2018

Congreso: 8 th Workshop on agri-food research (WiA)

Organizador: Programa de Doctorado en Técnicas Avanzadas de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

Autores: R. Alcantud, J. Weiss, M. Egea-Cortines

Lugar: Cartagena

Fecha: 27-28/5/2019

Repositorio: <https://repositorio.upct.es/handle/10317/8367>

AGRADECIMIENTOS

Cuando comencé estas investigaciones, no sabía si llegaría a terminar mi tesis, pero el tiempo, el trabajo y sobre todo el equipo de personas que me acompaña, han hecho posible que yo hoy pueda presentarla.

Quiero expresar mi agradecimiento a mi directora Julia Weiss, porque además de enseñarme, ayudarme, apoyarme, nunca perdió la confianza en mi, con una gran paciencia, también a Marcos Egea que siempre me apoyó y me sirvió de ejemplo por su gran capacidad de trabajo, ambos han aportado mucho más que conocimientos científicos y han sabido entender circunstancias personales.

Tan importantes han sido también mis compañeros del laboratorio con los que he compartido los días, y me han prestado ayuda siempre, a Victoria Ruiz porque es una doctora y persona excepcional, a Marta Terry un pilar fundamental de apoyo, ayuda y comprensión, a Julia Muñoz juntas hemos realizado grandes trabajos, a Claudio muchas horas en el laboratorio, y a otros compañeros como Vicky , Fernando, Fabiola, Almudena , María, Sara, Marina que han coincidido conmigo en diferentes épocas.

Otra parte importante del trabajo es el apoyo recibido por otros compañeros del IBV como Perla y Mariano en todo lo que necesité, y M^a José Roca junto con otras compañeras del SAIT muchas gracias.

También me han ayudado personas en otros departamentos también muy necesarios como Paco Artés, Marisa, Trini, para la burocracia y papeleos.

A mis padres que me enseñaron que aprender y ser curiosa es algo que no tiene edad ni tiempo, se puede practicar toda la vida.

A mi marido Antonio y mis hijos, por su amor y apoyo incondicional han sido el motor para que yo pudiera acabar este proyecto, y a ellos lo dedico.

FE DE ERRATAS AL LA TESIS DOCTORAL “EFECTOS GENÉTICOS Y MEDIO AMBIENTALES EN LA ESTRUCTURA FENOTÍPICA DE ANTIRRHINUM”

Técnicas Avanzadas en Investigación Agrario y Alimentario
Raquel Alcantud Rodríguez

Cartagena, 21 de octubre de 2020

(Las correcciones aparecen en negrita)

1. Página 25, los paneles de la Figura 1, de izquierda a derecha son “a, b, c”. En el pie de la Figura 1, donde dice “b) tres (derecho)”, debería decir “b) silvestre (derecha)”.
2. Página 64 y 92 la “T” Student debería estar “**t**” **Student**.
3. Página 73, en la línea donde dice “Existen varias ligasas C0 de 4-coumurato” debería decir “Existen varias **ligasas CoA** de 4-coumurato”.
4. Página 76, donde dice “que una combinación de comportamiento robusto de funciones meristemáticas y una expresión plástica de auxinas, JA y ABA” debería decir: “que una **combinación de comportamiento robusto y expresión plástica de funciones meristemáticas y de auxinas, JA, ABA**”.
5. Página 83, en la Tabla S3, las secuencias *AmTAR2* son:
AmTAR2 - Forward: CGATGAATGTTGTATCTGCC
AmTAR2 - Reverse: TTACCTGTCTTGAACCTGCG
6. Página 88, en la línea donde dice “Otro aspecto es la calidad del polen en términos de beneficio para el polinizado”, debería decir “Otro aspecto es la calidad del polen en términos de beneficio para el **polinizador**”.
7. Página 94, en la línea que dice: “mientras que las temperaturas más bajas produjeron un 32% de flores más ligeras”, debería decir “mientras que las temperaturas más **altas** produjeron un 32% de flores más ligeras”.
8. Página 100, donde dice “La Figura 10 muestra la cantidad total de VOCs emitidos en los días 0, 3 y 5 DDA y la figura 11” debería decir “La **Figura 11** muestra la cantidad total de VOCs emitidos en los días 0, 3 y 5 **DAF** y la **Figura 12**”. Sobre la corrección DDA por DAF, lo mismo sucede en esta página, línea 8, página 101 en la línea 6, página 127 en la línea 14 y página 130 en la línea 5.

9. Página 101, en la línea que dice “La contribución relativa de los diferentes VOCs se muestra en la Fig. 11”, debería decir “La contribución relativa de los diferentes VOCs se muestra en la **Figura 12**”.
10. Página 119, las unidades $250 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ se refiere a la radiación fotosintética activa expresada en microeinsteins por metro cuadrado ($\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$), “1 Einstein = energía de un mol ($6,02214129 (30) \times 10^{23}$). Estas unidades corresponden y deberían aparecer como micromoles de fotones/ m^2/s según el Sistema Internacional de Unidades,
11. Página 120, en el título de la tabla pone Table 1. Debería poner **Tabla 1**.
12. Página 121, Tabla 1, en la última fila y 4a columna dice “calcononaringenina”, debería decir “**chalcona narigenina**”.
13. Página 121, donde dice “Las diferencias estadísticas entre los perfiles de expresión génica se analizaron mediante la comparación (Pfaffl et al., 2002)”, debería decir “Las diferencias estadísticas entre los perfiles de expresión génica se analizaron mediante la comparación **grupar con el programa REST** (Pfaffl et al., 2002)”.
14. Página 124, en la línea que dice “celular y la mediación de la pérdida de rigidez (Zenoni et al., 2011; Marowa et al., 2016)” debería decir “celular y la mediación de la **pérdida de rigidez** (Zenoni et al., 2011; Marowa et al., 2016)”.
15. Página 128, donde dice “involucrada en la producción del volátil principal de *A. majus* metilbenzoide” debería decir “involucrada en la producción del volátil principal de *A. majus*, **metil benzoato**”.

16. INDICE DE ABREVIATURAS

<u>ABREVIATURA</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ABA	Ácido Abscísico
ANOVA	Análisis de Varianza
ANT	Aintegumenta
BAMT	Benzoid Acid Carboximethyl Transferase
BPE	Bigpetal
CHS	Chalcona Sintasa
CYCD3a	Ciclina
DAF	Día de apertura floral
DDA	Día después de la anthesis

EXP	Expansina
GRAM	Graminifolia
H4	Histona
HIRZ	Hirzina
JA	Ácido Jasmónico
MI	Meristemo de inflorescencia
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
ROA	Rosulata
SAM	Shoot Apical Meristem
UBI	Ubiquitina
VOCS	Volatile Organic Compounds