

Trabajo Final de Máster

# **Caracterización de FLOWERING LOCUS T (FT) y otros integradores de la transición floral como elementos reguladores del final de la floración**

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
DE PLANTAS

Joaquín Sánchez Matilla



## **Directores**

Dr Vicente Balanzà Perez

Dr Cristina Ferrándiz Maestre

Departamento Genética Molecular del Desarrollo de Frutos y Carpelos

## **Tutor UPV**

Dr Lynne Yenush

Profesora contratada doctor UPV

Valencia, Febrero 2022

En primer lugar, agradecer el equipo de laboratorio que he tenido alrededor durante esta etapa de mi vida que ha hecho que la rutina y el esfuerzo se convierta en un agradable paseo. Gracias Cris y Vicente por guiarme en este camino y por depositar en mi esa confianza y proporcionarme ese empujón final que tanto necesitaba. Gracias a todos los doctorandos: Edu, Clara, Francisca, Ana Alarcia e Irene, de vosotros no solo me llevo el apoyo de un equipo de trabajo sino unos colegas que espero que estén presentes en las siguientes etapas de mi vida. En especial agradecer a Clara esa gran ayuda y risas en esos momentos en los que el cansancio podía más que la motivación por la ciencia, por personas como tú esto merece aún más la pena. También a agradecer a Majo y Ana Berbel, vosotras aportáis ese lado maternal que te hace sentir más en casa que en un laboratorio. Gracias Paco por esas preguntas desprevenidas sobre los Western que hacían que desconectase un poco de ese burbuja. En definitiva, gracias a todos por ser una familia.

Agradecer a todo mi grupo de amigos que he sacado de este Máster y que han sido un pilar central no solo en la vida académica sino en el ámbito personal. En ningún momento he sentido sensación de soledad y sé que ha sido gracias a todos vosotros. A pesar de que algunos ya no estáis en Valencia, esta ciudad para mi sois vosotros. También gracias a esa gente que he conocido en Valencia y que me ha acompañado en esta etapa.

También agradecer a mis amigos de la carrera y de Granada, a pesar de estar lejos siempre os siento muy cerca.

Y, por último, aunque no menos importante, a agradecer a mis padres, mi hermana y a toda mi familia en general ya que a pesar de que aún no sepan qué \*\*\*\*\* es la biología molecular de plantas, están ahí apoyándome e impulsándome para que no me rinda en hacer lo que me gusta.

## RESUMEN

Un gran parte de las especies de plantas con interés agronómico pertenecen al grupo de las plantas monocárpicas. Estas plantas se caracterizan por tener un único evento reproductivo en su ciclo de vida tras el cual se activan procesos de senescencia que finalizan con la vida de la planta. La elección de esta estrategia será determinante para el éxito reproductivo de la especie. En este grupo de plantas, tras la producción de un número determinado de flores y frutos se produce de manera coordinada el fin de la actividad de los meristemas reproductivos, acabando con la producción de flores y frutos. A este proceso se le denominó Parada Global de la Proliferación (GPA, por sus siglas en inglés *Global Proliferative Arrest*).

Entre los elementos que regulan este proceso se ha propuesto la existencia de una(s) señal(es) procedente de la semilla que se desplazaría de manera sistémica al meristemo, teniendo una gran repercusión en el final de la floración. Sin embargo, esta señal aún es desconocida. Así mismo, se ha establecido que la ruta dependiente de la edad, en la que están implicados los factores de transcripción FRUITFULL (FUL) y APETELA2 (AP2), participan en la regulación de este proceso. A pesar de estos hallazgos, el final de la floración sigue siendo un proceso molecularmente desconocido.

En el presente Trabajo de Fin de Master, se caracterizan dos nuevos candidatos a ser reguladores del final de la floración: *FLOWERING LOCUS T* (FT) y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (SVP). Así mismo, se caracteriza fenotípica y molecularmente el mutante ft-10, observando una relación entre este y otros reguladores de gran importancia en el final de la floración como son AP2 y FUL. También se propone a FT como una de esas señales presentes en las semillas que causarían un efecto en la actividad del meristemo inflorescente.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, final de la floración; GPA; SVP; FT; análisis de expresión; Western Blot.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1.1. Estrategias reproductivas: monocarpia en plantas</b> .....	1
<b>1.2. Final de la floración y parada global de la proliferación (GPA)</b> .....	2
<b>1.3. Transición floral</b> .....	5
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
<b>3.1. Material vegetal</b> .....	9
<b>3.2. Condiciones de cultivo en invernadero</b> .....	9
<b>3.3. Recolección y almacenaje de semillas</b> .....	9
<b>3.4. Esterilización de semillas</b> .....	10
<b>3.5. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	10
<b>3.6. Condiciones de cultivo de microorganismos</b> .....	10
<b>3.7. Cepas bacterianas</b> .....	11
<b>3.8. Agentes de selección</b> .....	11
<b>3.9. Generación de líneas transgénicas</b> .....	11
3.9.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos.....	11
3.9.2. Síntesis de oligonucleótidos.....	12
3.9.3. Amplificación por PCR.....	12
3.9.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa y purificación de DNA.....	13
3.9.5. Transformación de células competentes de los microorganismos.....	13
3.9.6 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> .....	14
3.9.7. Digestión con enzimas de restricción.....	14
3.9.8. Vectores utilizados.....	14
3.9.8. Clonación en PCR8.....	14
3.9.10. Clonación mediante el sistema de clonaje Golden Braid (GB).....	15
3.9.11. Clonación mediante el Sistema de clonaje Gate Way (GW).....	17
3.9.12. Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante agroinfiltración.....	18
<b>3.10. Detección de la actividad <math>\beta</math>-Glucuronidasa (GUS) mediante tinción histoquímica</b> .....	18
<b>3.11. Microscopía de bajo aumento</b> .....	19
<b>3.12. Recolección y procesamiento de las muestras para extracción de proteínas totales y extracción de RNA</b> .....	19
<b>3.13. Extracción y purificación del RNA total</b> .....	20
<b>3.14. PCR cuantitativa (qPCR)</b> .....	20

<b>3.15. Extracción de proteínas totales</b> .....	21
<b>3.16. Cuantificación de proteínas totales</b> .....	21
<b>3.17. Análisis proteico mediante Western blot</b> .....	21
3.17.1. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) en condiciones desnaturalizantes</i> .....	21
3.17.2. <i>Transferencia húmeda</i> .....	22
3.17.3. <i>Incubación de la membrana con anticuerpos</i> .....	22
3.17.4. <i>Revelado de la membrana</i> .....	22
<b>3.18. Recolección y procesamiento de exudados</b> .....	22
<b>3.19. Fenotipado de la cinética de producción de flores</b> .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	23
<b>4.1. Los integradores florales FT y SVP son moduladores del final de la floración</b> .....	23
<b>4.2. Análisis de la expresión génica de FT y la ruta FUL-AP2</b> .....	28
<b>4.3. Análisis de localización de la proteína FT</b> .....	33
<b>4.4. Generación de herramientas moleculares para el estudio del papel de FT durante el final de la floración</b> .....	38
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	43
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA. ....	4
Figura 2. Modelo simplificado de la integración de las señales de la transición floral....	7
Figura 3: Número acumulativo de flores producido por los mutantes nulos de integradores de la transición floral. ....	25
Figura 4. Número total de flores producidas en las diferentes líneas de plantas.....	26
Figura 5. N° de días que permanece el SAM activo y ratio de producción. ....	27
Figura 6. Niveles de expresión relativos de <i>FT</i> , <i>FUL</i> y <i>AP2</i> en el SAM en plantas silvestres, mutantes <i>ft-10</i> y mutantes estériles ( <i>ams-1</i> ). ....	30
Figura 7. Niveles de expresión de <i>FT</i> , <i>FUL</i> y <i>AP2</i> en flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 2DPA en plantas silvestres, mutantes <i>ft-10</i> y mutantes estériles ( <i>ams-1</i> ).....	33
Figura 8. Análisis Western Blot de muestras de tejidos vegetativos (hoja) y tejidos reproductivos (SAM, Antesis, Frutos 2DPA y Frutos 5DPA) en el ecotipo silvestre Col-0. ....	35
Figura 9. Análisis Western Blot de detección de <i>FT</i> en muestras de SAM, flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 2DPA en las líneas Col-0, mutante estéril ( <i>ams-1</i> ) y <i>ft-10</i> .....	37
Figura 10. Análisis Western Blot de exudados de frutos 5DPA y frutos 2DPA. Las muestras fueron recolectadas a 3 semanas después del <i>bolting</i> (3SAB). ....	38
Figura 10. Representación gráfica de las construcciones genéticas que se utilizaran en el presente trabajo.....	39
Figura 11. Detección de la $\beta$ -Glucoronidasa ( <i>GUS</i> ) en línea T0 de <i>HSP18::LhG4 pOP::GW-GUS Tnos</i> en fondo mutante <i>ft-10</i> .....	40
Figura 12. Proporciones de número de flores totales divididas por categorías en las líneas T0 de <i>HSP18::FT<sub>UTR/ATG</sub></i> en el fondo mutante <i>ft-10</i> . ....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutantes de pérdida de función utilizados en el presente trabajo.....	9
Tabla 2. Información de los microorganismos utilizados en este TFM. ....	11
Tabla 3. Agentes de selección empleados en el medio de cultivo.....	11
Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés.....	12
Tabla 5. Vectores usados en la clonación de los genes de interés y en la transformación de <i>A. thalaina</i> .....	14
Tabla 6. Cebadores usados para el análisis de la expresión de genes mediante qPCR. .	20



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Estrategias reproductivas: monocarpia en plantas

El objetivo final de todo ser vivo es la reproducción con el fin de asegurar la transferencia de la información genética propia de una generación a otra. Con esta finalidad, a lo largo de la historia evolutiva los seres vivos han desarrollado diferentes estrategias reproductivas. En términos generales, estas estrategias reproductivas se pueden clasificar en dos grandes grupos: semelpariedad e iteropariedad. En la estrategia semelpara los individuos de la especie experimentan un único evento reproductivo tras el cual mueren. A diferencia de la semelpariedad, la iteropariedad consiste en varios eventos reproductivos alternos en un mismo ciclo de vida. El seguir una tendencia u otra afectará directamente en la eficacia biológica de la especie, por ejemplo, la semelpariedad generalmente implica destinar una mayor cantidad de energía en la producción de un mayor número de descendientes pudiendo ser un aspecto ventajoso cuando las condiciones de supervivencia son bajas (Amasino, 2009). La monocarpia y la polycarpia serían respectivamente las estrategias reproductivas equivalentes en plantas, aunque cabe destacar que las plantas tienen una gran plasticidad en sus estrategias reproductivas, sobre todo frente a cambios en factores ambientales (Fernández Aragón, 2014).

En el grupo de las plantas monocárpicas nos encontramos una gran diversidad de plantas que van desde plantas anuales, bianuales e incluso perennes. Todas ellas, tras finalizar la etapa reproductiva y la producción final de semillas, detienen su crecimiento e inician un proceso senescente que termina con la muerte de la planta. Cabe destacar que a este grupo pertenecen plantas de gran interés agronómico como las gramíneas, de interés ambiental como el bambú e interés científico como *Arabidopsis thaliana*.

El inicio de la etapa reproductiva de las plantas supone un cambio en la identidad de los meristemos, que son las estructuras que albergan y mantienen el nicho de células madre y de los que derivan todos los órganos y estructuras que se forman en una planta (Mayer et al., 1998; Schoof et al., 2000). Así, el inicio de la etapa reproductiva se da con la transición floral, donde el meristemo vegetativo se convierte en un meristemo inflorescente que da lugar a la inflorescencia, estructura sobre la que se sustentan las flores (Araki, 2001; Mouradov et al., 2002). De este modo, los meristemos vegetativos que estaban produciendo hojas, inician la producción de las flores, que contienen los

órganos reproductivos de las plantas. La actividad del meristemo inflorescente determinara el número final de flores y, en consecuencia, el de frutos y semillas. Las inflorescencias pueden clasificarse como indeterminadas o determinadas. Las inflorescencias determinadas son aquellas que, tras la producción de un número de flores, el meristemo apical del tallo (SAM) acaba diferenciándose en una flor terminal. En las inflorescencias indeterminadas, por el contrario, el SAM permanece indeterminado y no se diferencia en una flor terminal. En estas inflorescencias, tras la producción de un determinado número de flores, el meristemo simplemente detiene su actividad al final de la floración.

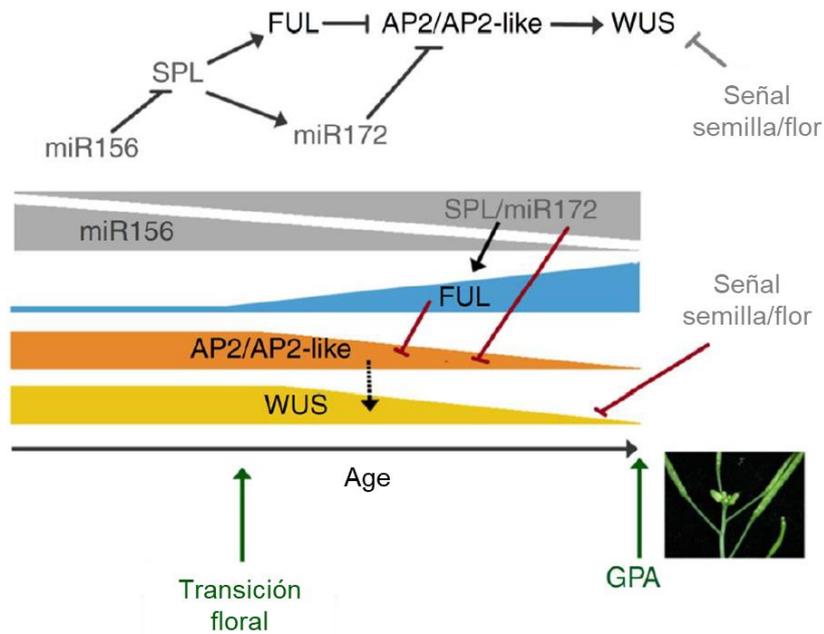
## **1.2. Final de la floración y parada global de la proliferación (GPA)**

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas monocárpicas, tras su etapa reproductiva, inician un proceso senescente cerrando su ciclo de vida. En este proceso senescente destaca la senescencia de órganos somáticos con su posterior movilización de recursos a tejidos aún en desarrollo, y la supresión del crecimiento tanto porque el SAM detiene su actividad como por la supresión de las yemas axilares para evitar la reactivación del crecimiento (o rebrote) (Davies & Gan, 2012).

Esta etapa final del desarrollo en plantas monocárpicas se conoce desde principios del siglo pasado, pero no fue hasta 1994 cuando Hensel et al., utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo, realizaron la primera caracterización detallada de este proceso, acuñando el término “parada global de la proliferación” o GPA por sus siglas en inglés (“General Proliferative Arrest”). El GPA ocurre cuando, tras la producción de un número determinado de flores, el meristemo de la inflorescencia principal detiene su actividad, seguido en un corto periodo de tiempo, por el resto de meristemos activos de la planta. Hensel et al., (1994) confirmaron, gracias a la comparación de un mutante estéril con un ecotipo silvestre, que la presencia de frutos influye directamente en el tiempo en el que se produce el GPA; la ausencia de fruto/semillas prolongaba la vida de la planta, retrasando la parada del SAM. Este mismo efecto se observaba también cuando a las plantas silvestres se le podaban los frutos asociando la parada del meristemo con la presencia de las semillas. Para explicar el efecto de la fertilidad sobre la parada del SAM se han propuesto diferentes hipótesis. Una de ellas sugiere que la entrada en GPA podría deberse a las fuertes relaciones fuente sumidero que se establecerían entre los frutos/semillas en desarrollo y el SAM (Kelly et al., 1988; Sinclair & De Wit, 1975). Así mismo también se ha especulado con la existencia de una posible señal móvil procedente

de la semilla que induciría la parada de los meristemos (Engvild, 1989; Leopold et al., 1959; Noodén et al., 2004). Trabajos recientes han mostrado que la parada del SAM que precede a la senescencia de la planta se asemeja a la entrada en dormancia de meristemos asociada a otros procesos de desarrollo, reteniendo su identidad y funcionalidad (Martínez-Fernández et al., 2020; Wuest et al., 2016). De hecho, tras la parada del SAM al final de la floración, éste es capaz de reactivarse tras la retirada de los frutos ya producidos. Esta respuesta, sugiere de nuevo un papel clave de la semilla en el control de la actividad del SAM al final de la floración, apoyando en parte la hipótesis de la señal móvil.

Además del efecto ejercido por las semillas descrito por Hensel et al., 1994, también sugirieron la existencia de una regulación génica en el control del GPA. Esta regulación génica no se descubrió hasta hace relativamente poco. En el 2018, Balanzà *et al* (2018) observaron que el gen *FRUITFULL* (*FUL*) actuaba como un regulador positivo del GPA de manera independiente a la(s) señal(e)s desconocidas procedentes del fruto. Los autores observaron que mutantes en el gen *FUL* presentaban un retraso al final de la floración lo que se traducía en un claro incremento en el número de flores y frutos producidos por el SAM. *FUL*, un factor de transcripción del tipo MADS box con múltiples funciones durante el desarrollo, regula negativamente y de forma directa la expresión de *APETALA2* (*AP2*), un factor de transcripción con funciones durante el desarrollo floral. *AP2*, además, regula positivamente la expresión de *WUSCHEL* (*WUS*), un gen clave en el mantenimiento de las células madre en el SAM (Balanzà et al., 2018; Huang et al., 2017; Miwa et al., 2009; Würschum et al., 2006). Además de *FUL*, Balanzà et al. (2018) mostraron que en la regulación de *AP2* al final de la floración también participaba el microRNA172. Estas observaciones les permitieron elaborar un modelo que explicaba cómo se regula el final de la floración y relacionarlo con la ruta dependiente de la edad previamente descrita (Chen, 2004; J.-W. Wang et al., 2009; Wu et al., 2009; Zhao et al., 2007) (Figura 1).



**Figura 1. Modelo propuesto para la regulación genética temporal del GPA.** Se representa como los niveles de FUL incrementan a medida que se acerca el GPA. Lactividad de AP2 y WUS se ve reprimida por ese aumento de FUL produciendo esto la llegada del GPA. En la regulación de FUL-AP2 estaría formando parte la ruta de la edad a través de los niveles de microRNA156/miRNA172. Adaptado de Balanzà et al., (2018).

Trabajos recientes muestran que la ruta FUL-AP2 actuaría como un nodo central en la regulación del final de la floración, modulando múltiples factores que intervienen en la regulación de la actividad del SAM (Martínez-Fernández et al., 2020). Entre los factores identificados se encontrarían tanto factores endógenos, como las hormonas citoquininas y ácido abscísico, como factores exógenos, como la temperatura o la calidad de la luz (Martínez-Fernández et al., 2020; Merelo et al., 2021). Todos estos datos indican que el final de la floración es un proceso del desarrollo altamente regulado. En lugar de ser un proceso que ocurre “por defecto”, debido al agotamiento de los recursos destinados al desarrollo de las semillas, el control del final de la floración es un proceso complejo donde intervienen multitud de factores, del que todavía se desconocen sus mecanismos de acción.

De acuerdo con el modelo presentado por Balanzà et al., 2018, se ha descrito que para que una inflorescencia inicie la parada de la actividad meristemática asociada al final de la floración éste debe adquirir la competencia para detenerse, que dependería principalmente de la edad de la inflorescencia (Ware et al., 2020). Además del papel de

las fitohormonas que se han mencionado anteriormente, Ware et al., 2020 han propuesto también un papel para las auxinas como elemento móvil de señalización: Las auxinas exportadas desde los últimos frutos producidos por el SAM podrían desencadenar la parada del meristemo al desestabilizar la canalización de las auxinas derivadas del propio meristemo, induciendo su parada (Ware et al., 2020).

A pesar de que cada vez disponemos de más información sobre la regulación del final de la floración todavía quedan muchas cuestiones básicas por responder: ¿Son realmente las auxinas la señal móvil derivada de las semillas que dispara el final de la floración?, ¿Cómo se regula la ruta FUL-AP2?

### **1.3. Transición floral**

La ruta FUL-AP2 desempeña un papel central en el control del final de la floración, donde las actividades de ambas proteínas ejercen efectos contrarios sobre la actividad del meristemo: FUL promueve la parada del SAM mientras AP2 promueve su actividad. Llama la atención que, a su vez, ambos genes han sido descritos como reguladores de diversos aspectos del desarrollo en plantas, y curiosamente ambos juegan papeles clave en el inicio de la floración.

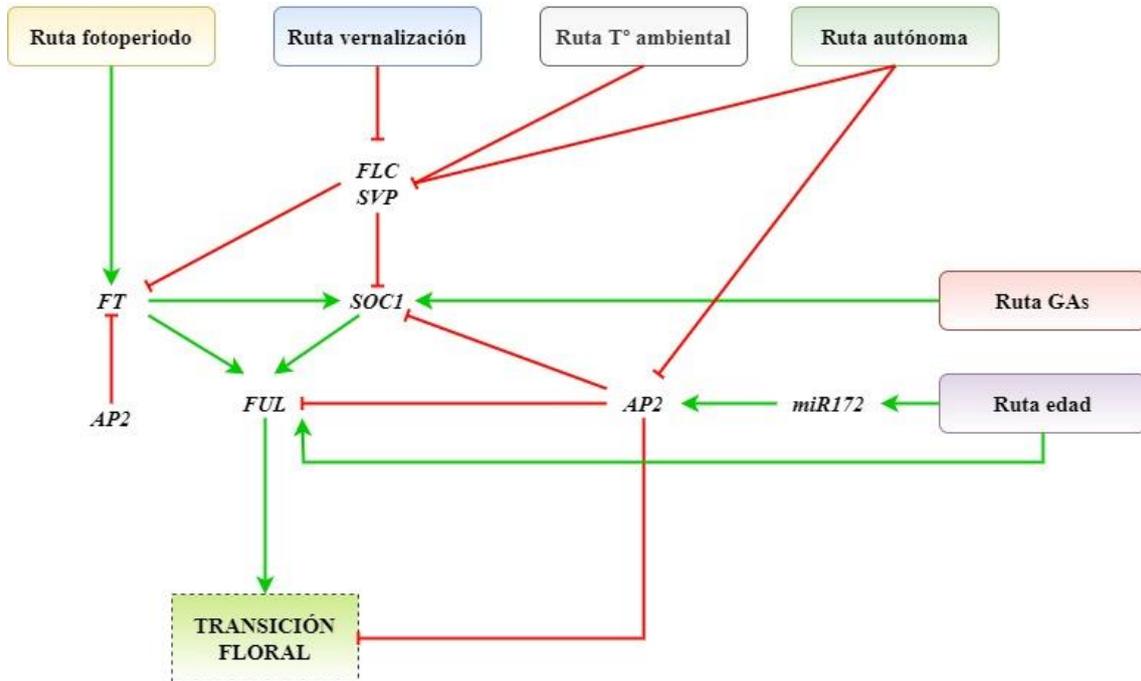
El ciclo de la vida de las plantas superiores se caracteriza, en líneas generales, por estar dividido en una fase de desarrollo vegetativa donde se producen hojas y brotes a partir del meristemo apical del tallo (SAM), y una fase de desarrollo reproductivo donde el SAM sufre una serie de cambios tanto morfológicos como moleculares que lo llevan a adquirir la competencia reproductiva y la consecuente producción de órganos reproductivos (Poethig, 1990). Estas fases pueden ocurrir de manera simultánea o encontrarse divididas espacio/temporalmente. En el caso de *Arabidopsis thaliana* estas dos etapas del desarrollo se encuentran espacio/temporalmente divididas.

La transición floral, debido a su gran importancia en la biología de las plantas, es un proceso altamente controlado tanto por factores endógenos como exógenos. Todas estas señales coordinan la transición floral y se integran a nivel de unos pocos genes denominados integradores de la transición floral (Lee et al., 2006). De este modo, se han descrito diferentes rutas que controlan la transición floral. La ruta del fotoperiodo promueve la transición floral en función de la duración del día (Corbesier et al., 2007; Fornara et al., 2010). La ruta de la vernalización controla la transición floral en respuesta a un periodo de exposición a bajas temperaturas permitiendo a las plantas saber cuándo

ha pasado el periodo invernal (Chandler et al., 1996; D.-H. Kim & Sung, 2014; Koornneef et al., 1991). La ruta autónoma engloba a un grupo de genes de manera independiente a las condiciones ambientales, asegurando que a pesar de todo la planta pueda florecer (Abe et al., 2005; Koornneef et al., 1991; Michaels & Amasino, 2001; Simpson & Dean, 2002). La ruta de la edad, donde señales endógenas dependientes de la edad de la planta mediadas por la acción de algunos microRNA como, por ejemplo, el miR156 y el miR172 (Jung et al., 2011; J.-W. Wang et al., 2009; Wu et al., 2009), informan a la planta de que han alcanzado un desarrollo óptimo para iniciar la fase reproductiva. También se ha descrito que las giberelinas (GAs) son esenciales en la inducción de la floración en día corto (Kobayashi & Weigel, 2007; Simpson & Dean, 2002) al igual que los niveles energéticos, relacionados con la disponibilidad de azúcares (Gibson, 2000) o la temperatura ambiental.

Como he mencionado anteriormente, todas estas rutas y señales se integran a nivel de unos pocos genes. Los principales integradores promotores de la transición floral son *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* y los principales integradores represores de la transición floral son *FLOWERING LOCUS C (FLC)* y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (Figura 3). Interesantemente, tanto FUL como AP2 responden e interactúan con estos integradores de la transición floral y han sido descritos como reguladores de la transición floral mediando señales relacionadas con el fotoperiodo y la edad (Lee et al., 2006; Moon et al., 2003; J.-W. Wang et al., 2009; Wigge et al., 2005). FUL es un promotor de la transición floral (Balanzà et al., 2014; Teper-Bamnolker & Samach, 2005) mientras que AP2 es un represor de la floración (Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010). Tanto FUL como AP2 también interactúan físicamente con algunos de los integradores de la transición floral que responden a la temperatura ambiental y al paso del invierno como son SVP o FLC (Jeong et al., 2007a; Moon et al., 2003). Cabe destacar que FUL está directamente controlado por FT en respuesta al fotoperiodo, mientras que AP2 es capaz de reprimir en este contexto, la expresión de FT y FUL (Mathieu et al., 2009; Teper-Bamnolker & Samach, 2005; Wigge et al., 2005). FT está considerado como el principal integrador de todas las diferentes señales que disparan la transición (Fornara et al., 2010). Cuando las condiciones para la floración son óptimas, FT se expresa y traduce en las hojas. Entonces, la proteína es capaz de desplazarse desde la hoja hasta el SAM donde induce la transición floral mediante la activación directa de SOC1 y FUL (Corbesier et al., 2007; Wigge, 2011;

Yoo et al., 2005). Por otro lado, FLC y SVP, reprimen la transcripción de FT y de SOC1 mientras que promueven la de AP2 (Capovilla et al., 2015; Tao et al., 2012).



**Figura 2. Modelo simplificado de la integración de las señales de la transición floral.** Se puede observar como todas las rutas de inducción de la floración acaban convergiendo en FUL-AP2 a través de las señales mediadas por los integradores de la transición floral aguas arriba como son FT, SVP, SOC1, y FLC. Aún así la regulación de la transición floral es aún más compleja, siendo FT el principal integrador de todas estas señales.

## 2. OBJETIVOS

El estudio de los mecanismos que regulan el final de la floración ha sido un tema olvidado durante las últimas décadas, a pesar de las grandes implicaciones económicas que podría tener su aplicación en el rendimiento de nuestros cultivos. La identificación de la ruta FUL-AP2 que regula este proceso (Balanzà et al., 2018) ha despertado de nuevo el interés en este campo, y en los últimos 5 años se han realizado importantes avances (Balanzà et al., 2019; Goetz et al., 2021; Martínez-Fernández et al., 2020; Y. Wang et al., 2020; Ware et al., 2020) a pesar de ello, todavía desconocemos los elementos de esta ruta que estarían actuando aguas arriba de la ruta FUL-AP2, así como la identidad de las señales que actúan desde las semillas.

Como se ha comentado en la introducción, FUL y AP2, además de controlar el final de la floración, participan también al inicio de la transición floral estando regulados e interaccionando con los genes conocidos como integradores de la transición floral. Datos previos del laboratorio, así como estudios “*in silico*”, indican que estos integradores de la transición floral también están presentes en estadios de desarrollo posteriores, aunque su función y donde la ejercen en estas etapas no está definido.

En este Trabajo de Fin de Máster nos planteamos el objetivo general de averiguar si los genes integradores de la transición floral que interactúan con los genes FUL y AP2 podrían también desarrollar un papel durante el fin de la etapa reproductiva. Para ello nos planteamos el siguiente par de objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípicamente diferentes mutantes implicados en la transición floral durante el desarrollo de la inflorescencia, e identificar cuáles podrían tener un efecto en el control del final de la floración.
- Analizar mediante análisis moleculares como, por ejemplo, Q-PCR para el estudio de los niveles de expresión de estos genes en los diferentes tejidos de la inflorescencia, así como su efecto sobre la ruta FUL-AP2
- Generación de una herramienta que nos permita conocer más sobre la regulación del complejo entramado que conforma el final de la floración

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Los análisis llevados a cabo en este Trabajo fin de Máster realizaron con la especie modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). Se utilizaron los mutantes de pérdida de función detallados en la Tabla 1. Con ellos se realizó un análisis fenotípico de parámetros relacionados con el GPA y análisis moleculares.

**Tabla 1. Mutantes de pérdida de función utilizados en el presente trabajo.**

<b>Gen</b>	<b>Línea</b>	<b>Ecotipo</b>	<b>Procedencia</b>
<i>FT</i>	<i>ft-10</i>	Col-0	Yoo et al., 2005
<i>FUL</i>	<i>ful-2</i>	Col-0	Ferrándiz et al., 2000
<i>TSF</i>	<i>tsf-1</i>	Col-0	Yamaguchi et al., 2005
<i>SVP</i>	<i>syp-32</i>	Col-0	Alonso et al., 2003
<i>FT/TSF</i>	<i>ft-10/tsf-1</i>	Col-0	Yamaguchi et al., 2005
<i>AMS</i>	<i>ams-1</i>	Col-0	Steiner-Lange S et al., 2010

#### 3.2. Condiciones de cultivo en invernadero

Se sembraron las semillas de *A. thaliana* en macetas de plástico de 12 cm centímetros de diámetro para el caso de las transformaciones por *Agrobacterium tumefaciens* y para el resto de análisis se llevaron a cabo en alveolos de 6.5 x 6.5 x 5 cm. El sustrato utilizado fue sustrato universal con una proporción de turba, perlita y vermiculita de 2:1:1. Las semillas se colocaron en los alveolos en los que se había introducido sustrato previamente humedecido con agua potable y se cubrieron con film para hermetizarlas. Posteriormente, se sometieron a un proceso de estratificación en el cual están aproximadamente 3 días a 4°C y en condiciones de oscuridad para que la germinación se sincronice. Pasado el tiempo de estratificación, se trasladaron a una cabina de invernadero con unas condiciones de temperatura de aproximadamente 22°C durante el día/noche, y un fotoperiodo inductivo de 16h de luz y 8h de oscuridad. Las plantas fueron regadas por inmersión con solución nutritiva Hoagland n°1 con oligoelementos (Hewitt and Eden, 1953).

#### 3.3. Recolección y almacenaje de semillas

Una vez que las plantas completaron el ciclo de vida y se secaron por completo, las semillas se recolectaron en tubos de ensayo de 1.5 mL, previamente tamizadas con un colador, y se dejaron secar durante 2 días a 37°C. Para la conservación de las semillas, se almacenaron en una cámara a 10°C, con una humedad del 25% y a completa oscuridad.

### **3.4. Esterilización de semillas**

Previamente al cultivo, las semillas fueron lavadas y esterilizadas. Para ello se empleó etanol al 70% (v/v) con Triton X-100 al 0.005% (p/v), etanol al 96% (v/v) y papel de filtro estéril.

El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente: (1) Se dispusieron las semillas en tubos de ensayo de 1.5 mL. (2) Se agregó a cada tubo 1 mL de etanol al 70% (v/v) con Triton X-100 al 0.005% (p/v). (3) Se agitaron los tubos durante 5 minutos. (4) Se centrifugaron durante 20 segundos a 15000g para que las semillas quedasen en el fondo del tubo de ensayo y retirar así el medio líquido. (4) Se añadió etanol al 96% (v/v). (5) Se depositaron las semillas sobre papel de filtro estéril y se dejaron secar.

### **3.5. Condiciones de cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana***

Una vez esterilizadas, se procedió al cultivo de las semillas de *A. thaliana* en placas de Petri en condiciones de esterilidad bajo la campana de flujo laminar y se almacenaron en condiciones de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) a una temperatura constante de 25°C. La luz fue suministrada por tubos fluorescentes de tipo GroLux 36W (Sylvania) con una intensidad de  $90 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-2}$ .

El medio de cultivo usado para el cultivo *in vitro* fue Musharige y Skoog con sacarosa (MSS) previamente esterilizado mediante autoclavado a 120°C durante 20 minutos, y se ajustó el pH del medio con hidróxido de potasio (KOH) hasta alcanzar un pH 5.7.

Para seleccionar las líneas transformantes de *A. thaliana* se utilizó el antibiótico Kanamicina como agente de selección a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  y Timentina a 300  $\text{mg/mL}$ .

### **3.6. Condiciones de cultivo de microorganismos**

Para el cultivo de microorganismos, se empleó medio Luria-Bertani (LB). El medio LB está compuesto por 10 g/L triptona (Panreac), 10 g/L de NaCl (Duchefa) y 5 g/L de extracto de levadura (Duchefa) y se enrasa con 800 mL de agua miliQ. Posteriormente se esterilizó en un autoclave durante 20 minutos a 120°C y a 1 bar de presión. En el caso de cultivo sólido de LB en placas de Petri, se añadieron 3g/L de agar bacteriológico, se autoclavó, se atemperó a 55°C en un baño termostaticado y se vertió la disolución en placas de Petri bajo condiciones de esterilidad. Las placas de Petri con el LB solidificado se almacenaron a 4°C en oscuridad.

En el caso de ser necesario, se suplementó el medio con un agente de selección (Tabla 3).

### 3.7. Cepas bacterianas

Para la generación de vectores y posterior transformación *in planta* se usaron diferentes cepas bacterianas (Tabla 2).

**Tabla 2. Información de los microorganismos utilizados en este TFM.**

Bacteria	Estirpe	Origen/Referencia
<i>Escherichia coli</i>	DB3.1	Promega
<i>Escherichia coli</i>	Supercharge EZ10	Clontech
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58 pMP90	Koncz y Schell (1989)

### 3.8. Agentes de selección

Para facilitar la selección de las líneas transformantes tanto de *A. thaliana* como de las cepas bacterianas de *E. coli* y de *A. tumefaciens* se usaron diferentes agentes de selección (Tabla 3).

**Tabla 3. Agentes de selección empleados en el medio de cultivo.**

Antibiótico	Stock	Concentración uso <i>A. thaliana</i>	Concentración uso microorganismos
Kanamicina	100 mg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
Spectinomicina	100 mg/mL	-	100 µg/mL
Rifampicina	50 mg/mL	-	50 µg/mL
Timentina	500 mg/mL	300µg/mL	-

### 3.9. Generación de líneas transgénicas

#### 3.9.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

Para la obtención del DNA genómico y posterior amplificación de las regiones génicas de interés, se utilizó el ecotipo silvestre Col-0 de *A. thaliana*. Se colectaron unos 10-15 mg de tejido vegetal y se incluyeron en un tubo de ensayo de 1.5mL con 200 µL de tampón de extracción 200 mM Tris-HCl pH 7.5; 50 mM NaCl; 25m M EDTA, 0.5% SDS en H<sub>2</sub>O miliQ. A continuación, se trituraron las muestras con ayuda de pistilos de plástico, se añadieron otros 200 µL de tampón de extracción y se agitaron en un vortex durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 2 minutos y se recogieron 300 µL del sobrenadante a un nuevo tubo de ensayo. A los nuevos tubos de ensayo, se le añaden 300 µL de isopropanol, se mezclan por inversión y se centrifugan durante 5 minutos a 13000 rpm. Se desecha el sobrenadante y se lava el pellet con etanol al 70% (v/v). Finalmente, se centrifugan los tubos de ensayo

a 13000 rpm durante 5 min, se desecha el etanol y se deja secar el pellet hasta el día siguiente. Una vez eliminado cualquier resto de etanol, se resuspende el pellet con 25-50 µL de H<sub>2</sub>O miliQ y se almacenan a 4°C.

### 3.9.2. Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron diseñados, sintetizados y suministrados por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

Los cebadores se diseñaron con el propósito de amplificar los genes *FLOWERING LOCUS T* y *TWIN SISTER OF FT*. Se amplificaron tanto las secuencias genómicas del gen con regiones no traducidas (UTR) como las CDS de manera independiente (Tabla 4).

**Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de interés.**

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')
<i>FT CDS</i>	<i>FT CDS Fw</i>	ATGTCTATAAATATAAGAGAC
	<i>FT CDS Rv</i>	CTAAAGTCTTCTTCCTCCGCA
<i>FT UTR</i>	<i>FT UTR Fw</i>	ACAAATTAAGAAGCAGAAAC
	<i>FT UTR Rv</i>	TAAAGTATAAATATAACACTTC
<i>TSF CDS</i>	<i>TSF CDS Fw</i>	ATGTCTTTAAGTCGTAGAGATC
	<i>TSF CDS Rv</i>	CTACGTTCTTCTTCCCCAC
<i>TSF UTR</i>	<i>TSF UTR Fw</i>	AAGAAGCAAACATTTGATTG
	<i>TSF UTR Rv</i>	AATCGACTAAACAAATTATATTTTATTC

*Fw: Forward. Rv: Reverse. CDS: secuencias codificantes. UTR: regiones no traducidas*

### 3.9.3. Amplificación por PCR

Para la amplificación de los genes de interés a clonar (*FT* y *TSF*) se recurrió a la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). La técnica también se utilizó para verificar que los procesos de extracción de RNA y de retrotranscripción se habían realizado de manera correcta.

Para las reacciones de PCR, se utilizaron como reactivos: Tampón *Phusion HF Buffer* al 1X, mezcla de dNTPs 200 mM, oligonucleótidos 0.5 µM de interés para la amplificación de casa gen (Tabla 4), 250 ng de DNA genómico previamente extraído y la enzima *Phusion DNA Polymerase* a una concentración final 0,02 U/µL.

El proceso se llevó a cabo en un termociclador *SureCycler 8800* (Agilent Technologies). El programa consistió en: (1) una fase de desnaturalización del DNA a 98°C durante 30 segundos. (2) 30-35 ciclos en los que había una fase de desnaturalización de 10 segundos, una fase de anillamiento a la temperatura indicada para cada pareja de cebadores y una fase de extensión de 72°C también con duración variable dependiendo de la longitud de

la cadena de interés a amplificar. (4) Por último, una fase final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Para la comprobación de la PCR y purificación del DNA, se emplearon unos 5-10 µL de la reacción en una electroforesis horizontal en gel de agarosa como se detalla en el siguiente apartado.

#### *3.9.4. Electroforesis de DNA en gel de agarosa y purificación de DNA*

Para la separación de fragmentos de DNA, se utilizaron geles de agarosa a una concentración del 1-2% (p/v) en tampón TBE 1X (Tris; Borato; EDTA) y bromuro de etidio 0.5 µg/ml. El bromuro de etidio es un agente intercalante que permite visualizar las bandas de DNA tras irradiarlo con luz ultravioleta. Se usó el sistema horizontal *Sub-Cell GT* conectado a una fuente de alimentación *PowerPack™ Basic* (BioRad). Se cargaron las muestras de DNA añadiéndoles tampón de carga *Tritrack 6x* (Thermo Scientific™) en el caso de requerirlo. Como marcador de peso molecular usamos el *GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific™).

Para la purificación de la banda de DNA del gel de agarosa, se procedió a cortar la zona del gel donde se encontraba el DNA de interés con una cuchilla estéril y se purificó con el sistema *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones descritas por la casa comercial.

#### *3.9.5. Transformación de células competentes de los microorganismos*

Para la transformación de microorganismos se usaron las cepas bacterianas descritas en la Tabla 2. Se usó una alícuota de las células competentes necesarias en cada ocasión y se le añadió 1 µl de DNA y se resuspendió. En la transformación vía electroporación, se pasó el contenido del tubo de ensayo a una cubeta de electrodos de 0.1 cm de separación (BioRad) y se sometió a un pulso de corriente eléctrica de 1600 V en el sistema *GenePulse™ TM* (BioRad). En el caso de la transformación vía choque térmico, las células con el DNA se sometieron a un baño de calor de 42°C durante 40-60 segundos. Independientemente del tipo de transformación, después se le añadió 1 mL de LB y se dejó incubar 1h a 37°C en el caso de *E. coli* y 2h a 28°C en el caso de *A. tumefaciens*. Transcurrido ese tiempo se plaquearon 50 µl en placas de LB sólido con el agente de selección necesario en cada caso.

### 3.9.6 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Para el aislamiento de DNA plasmídico se usó el sistema *NZY Miniprep kit* (Nzytech) siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial. Este sistema se basa en la lisis y posterior retención del DNA en unas membranas acopladas a una columna. Una vez extraído el DNA plasmídico, se comprobó la pureza y cantidad del DNA plasmídico haciendo uso del NanoDrop *ND-1000* (ThermoScientific).

### 3.9.7. Digestión con enzimas de restricción

Para la comprobación y verificación de las secuencias genómicas se usaron enzimas de restricción. El tampón y las condiciones usadas con cada enzima fueron las recomendadas por la casa comercial. La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo de 1.5 mL, se utilizaron 5-10 unidades de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA y se incubó la reacción durante 1-2 horas a la temperatura óptima de cada enzima en un Thermomixer (Eppendorf). Transcurrido el tiempo, se procedió a la separación de los fragmentos del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa (poner el vínculo del apartado de electroforesis). Posteriormente, se validó que el patrón de bandas de DNA coincidiese con el patrón específico esperado.

### 3.9.8. Vectores utilizados

Para la clonación de los genes y posterior transformación de *A. thaliana*, se emplearon diferentes vectores que se encuentran detallados en la Tabla 5.

**Tabla 5. Vectores usados en la clonación de los genes de interés y en la transformación de *A. thaliana***

Vector	Resistencia	Utilidad
PCR8/GW/TOPO	Spectinomicina	Vector intermediario usado para la clonación de fragmentos amplificados por PCR en vectores destino GateWay
pUPD2	Cloranfenicol	Ensamblaje multipartito para GoldenBraid
pDGB3 $\alpha$	Kanamicina	Ensamblaje binario para GoldenBraid
pDGB3 $\Omega$	Espectinomicina	Ensamblaje binario para GoldenBraid

### 3.9.8. Clonación en PCR8

El Clonaje en PCR8 de Invitrogen, se basa en el uso de un vector lineal (PCR8) que tiene unos salientes de timina en los extremos 3' que sirven para la ligación directa de productos

de PCR amplificados con una polimerasa Taq. De esta forma, los extremos del inserto se podrían introducir en el vector PCR8 gracias a la complementariedad con las bases de adenina.

En primer lugar, se realizó una fase de adición de cola de adeninas a los productos de PCR previamente amplificados. Para ello, se llevó a cabo una reacción compuesta por: tampón *5X Colorless GoTaq Flexi Reaction Buffer* a una concentración final de 1.25X,  $MgCl_2$  2.5 mM, dATPS 5 mM, la polimerasa *GoTaq G2 DNA Polymerase* ajustada a 1U/ $\mu$ L y el molde de DNA (la concentración de este dependerá de la eficiencia de la PCR y de la purificación). Esta reacción se incubó en un Thermomixer (Eppendorf) a 72°C durante 20 minutos.

En segundo lugar, se preparó la IFC en la que se utilizó 4  $\mu$ L del producto de la reacción de adición de la cola de adenina, 1  $\mu$ L del vector PCR8 y 1  $\mu$ L del tampón de IFC (200 mM NaCl; 10 mM  $MgCl_2$ ). De esta manera, el vector pasaría de una forma lineal a una forma circular con nuestro inserto.

Por último, se transformaron las bacterias de *E.coli* y se plaquearon en placas de LB con la resistencia a espectinomicina *o/v*. La problemática de esta técnica es que el inserto se puede introducir en ambas direcciones al no ser direccional. Para comprobar la direccionalidad del inserto en el vector, se extrajo el DNA plasmídico de la colonia de *E.coli*, se sometió a una digestión con enzimas de restricción para comprobar que el patrón de bandas del DNA coincidiese con el esperado.

La cepa bacteriana que se utilizó en este clonaje fue la cepa *Supercharge* de *E.coli*.

#### 3.9.10. Clonación mediante el sistema de clonaje Golden Braid (GB)

El sistema Golden Braid es una herramienta estandarizada para el ensamblaje modular de estructuras de DNA multigénicas. GB permite la combinación binaria de múltiples ensamblajes y facilita la reusabilidad de las partes de DNA y dispositivos ensamblados para realizar eficazmente construcciones complejas (Sarrion-Perdigones *et al.* 2011; Sarrion-Perdigones *et al.* 2013; Sarrion-Perdigones *et al.* 2014). Es un método basado en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS (*BsaI* y *BsmbI*) que reconocen secuencias no palindrómicas, pero no cortan en la secuencia de reconocimiento sino a unos pocos nucleótidos de este.

En primer lugar, esta tecnología requiere del desarrollo de módulos independientes que posteriormente se ensamblaran mediante el ensamblaje multipartito. El proceso de creación de cada módulo se conoce como domesticación y consiste en adaptar tu secuencia de interés para que sea compatible con el sistema GB. El primer paso fue amplificar la pieza con cebadores que incorporen los sitios de clonaje *BsmBI* flanqueando la secuencia de interés y así permitir que se inserte en el vector pUPD2 el cual incorpora los sitios de corte *BsmBI* y *BsaI* y posibilitará el ensamblaje multipartito de las piezas en un módulo. Las secuencias génicas de interés se amplificaron por PCR y, posteriormente, se realizó una reacción en el termociclador con la enzima *BsmBI*, para unir la secuencia amplificada con el vector de ensamblaje multipartito pUPD2. Gracias a que *BsmBI* es una enzima de restricción IIS, corta en la parte adyacente al sitio de reconocimiento originando el sitio de restricción diana de *BsaI* y un excedente de 4 nucleótidos adyacentes al sitio de reconocimiento de esta que permitirá recuperar la secuencia amplificada. En esta reacción también se pierde el gen marcador *LACZ* que tenía el vector pUPD2, permitiendo que, una vez transformadas las bacterias con el plásmido, se seleccionen aquellas que no den coloración azul debido a que no son capaces de reaccionar con el sustrato X-gal que se añade al medio de cultivo. Además, el medio de cultivo también tendrá cloranfenicol como agente de selección ya que el vector pUPD2 contiene el gen de resistencia a este antibiótico y el DNA plasmídico se verificó por digestión con enzimas de restricción. Se domesticaron el promotor inducible por calor (HSP18), el promotor específico de semilla AT2S3, el factor transcripción artificial LhG4, el promotor artificial pOp, el módulo Gate Way y el marcador  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS).

Posterior a la domesticación de las piezas y generación de los módulos, se procedió al ensamblaje multipartito de estos. Para la unión de los módulos (Promotor + CDS + Terminador) se preparó una reacción de restricción-ligación en la que se añadió en un tubo de ensayo 1.5 mL los siguientes componentes: los módulos en vector pUPD2 que se quieren fusionar, el vector de destino y la enzima *BsaI* con su respectivo tampón. De esta manera quedarán las secuencias de interés con extremos protuberantes y complementarios entre sí y con el vector de destino quedando unificados. Esta reacción se lleva a cabo en un termociclador. De nuevo se repitió el proceso de transformación, cultivo (en este caso dependiendo del vector de destino tendrá resistencia a espectinomicina o kanamicina) y

comprobación mediante digestión con enzimas de restricción. De esta manera se obtuvieron las diferentes unidades transcripcionales.

Por último, se procedió al ensamblaje binario de las unidades transcripcionales sobre los vectores finales. Hay que tener claro que para unificar las unidades transcripcionales deben estar en un mismo vector de destino, es decir, deberán estar en un vector pDGB3 $\alpha_1$  y en un vector pPDGB3 $\alpha_2$  o bien, lo mismo pero en pDGB3 $\Omega_{(1-2)}$ . Si las unidades transcripcionales que queremos unir se encuentran en vectores  $\alpha$  se usará un vector de destino  $\Omega$  o a la inversa. La reacción de cada ensamblaje binario se llevó a cabo en tubos de ensayo de 1.5 mL donde se añadió la pareja de unidades transcripcionales, el vector de destino y la enzima de restricción correspondiente (*BsaI* o *BsmbI*) con su respectivo tampón. La reacción se llevó a cabo en un termociclador. Posteriormente se transformó las bacterias competentes de *E.coli* y se chequeó por digestión con enzimas de restricción (en los pasos que estuviese presente el módulo GW se usarán las cepas DB3.1 de *E.coli*). De esta forma, obtendríamos nuestro vector con los sitios LB y RB flanqueando el sitio de clonación que son necesarios para transformar la planta vía *A. tumefaciens*.

### 3.9.11. Clonación mediante el Sistema de clonaje Gate Way (GW)

La estrategia de clonaje GateWay, desarrollada por Invitrogen, se basa en la capacidad del fago  $\lambda$  para integrarse en el genoma de *E.coli* a través de la recombinación específica. De esta forma, se podrán introducir fragmentos de DNA de interés en vectores específicos.

En nuestro caso, este sistema de clonaje se utilizó para introducir los genes *FT* y *TSF*, previamente clonados en PCR8, en el vector de destino pDG3 $\alpha$  que previamente se había sintetizado vía Golden Braid como se ha detallado anteriormente.

Se realizó una reacción LR en la que los sitios *attL1* y *attL2* del vector PCR8 con el gen clonado recombinaron con los sitios *attR1* y *attR2* del vector pDG3 $\alpha$ . La reacción se llevó a cabo en un tubo de ensayo de 1.5 mL con los siguientes componentes: 4  $\mu$ L del vector PCR con el gen clonado, 1  $\mu$ L del vector de destino pDG3 $\alpha$ , 3  $\mu$ L del tampón TE pH 8 y 2  $\mu$ L de la clonasa LR (*Gateway LR Clonase II enzyme mix; Invitrogen*). La reacción se incubó a 25°C durante 25 minutos. Dicha reacción se detuvo añadiéndole 1  $\mu$ L de la proteinasa K (*Invitrogen*) durante 10 minutos a 37°C.

Una vez terminada la reacción LR, se transformó el vector en *E.coli* y se seleccionaron las colonias en medio sólido de LB con kanamicina. Posteriormente, se confirmaron mediante el aislamiento del DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción.

Se usó la cepa bacteriana *Supercharge* EZ10 de *E.coli* la cual si la reacción de LR falla, muere ya que en el cassette GateWay está presente el gen letal *ccdb*.

### 3.9.12. Transformación de *Arabidopsis thaliana* mediante agroinfiltración

Como ya se ha indicado, para la transformación de *A. thaliana* se sembraron unas 8-12 semillas en macetas de 12 cm de diámetro y se dejaron crecer en las condiciones previamente descritas. Las líneas que se sembraron para la transformación, todas en fondo Columbia, fueron: Col-0 (WT), *ft-10*, *tsf-1* y *ft-10/tsf-1*.

Primero, se inoculó *A. tumefaciens* en un tubo de ensayo de 5 mL con LB líquido y los correspondientes agentes de selección (Kanamicina, Rifampicina y Gentamicina) y se dejaron en una cámara a 28°C y en agitación durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se inocularon los 5 mL del tubo de ensayo en un matraz con 500 mL de LB líquido al que se le añadieron los mismos antibióticos y se dejó crecer durante otras 24 horas en las mismas condiciones. Una vez que las bacterias habían crecido, se precipitaron los precultivos a 5000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 mL de solución de infiltración (sacarosa 50 g/L, Silwet L-77 300 µl/L). Posteriormente, se sumergieron las plantas en la solución de infiltración durante 3 minutos y se cubrieron con una bolsa de plástico durante 24 horas para mantener la humedad.

### 3.10. Detección de la actividad $\beta$ -Glucoronidasa (GUS) mediante tinción histoquímica

Debido a que las plantas transformantes llevaban asociado el gen marcador que codifica  $\beta$ -Glucoronidasa (GUS), se pudo hacer un seguimiento de la expresión del transgén mediante el estudio de la actividad GUS. Para ello se empleó el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-Glucurónido (X-Gluc) que tiñó de azul los dominios físicos de expresión del transgén.

El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente: (1) Las plántulas se colocaron en un tubo de ensayo de 1.5 mL con acetona al 90% (v/v) durante 15 minutos. (2) Se eliminó la acetona y se hizo un lavado de 5 minutos con H<sub>2</sub>O miliQ. (3) Se eliminó el H<sub>2</sub>O miliQ y se añadió al tubo de ensayo el tampón de tinción (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13.42mM a pH 7.2; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

11.58 mM a pH 7.2; ferrocianuro potásico 5 mM, ferricianuro potásico 5 mM, y Tritón X100 0.25mM) al que previamente se le había añadido X-Gluc 5 mM. (4) Se incubaron las muestras a 37°C *o/n*. (5) Se eliminó el tampón de tinción y se procedió a una serie de lavados. (6) Se lavó con etanol al 25% (v/v), al 35% (v/v) y 50% (v/v) durante 10 minutos respectivamente. (7) Se eliminó el etanol y se fijaron las muestras en FAE (50% etanol (v/v), 10% ácido acético glacial (v/v), 5% formaldehído (v/v)) durante 1 hora. (8) Una vez finalizado el proceso de fijación, se conservaron las muestras en etanol al 70% (v/v) hasta su visualización.

### **3.11. Microscopía de bajo aumento**

Para la visualización de las plántulas transformantes teñidas con GUS y los meristemos apicales del brote (SAM) de las plantas de *A. thaliana* a 3 semanas después del *bolting*, se utilizó microscopia de bajo aumento. Se empleó el microscopio Leica DMS1000 y el software de análisis de imagen LAS-X. Las muestras se montaron en un portaobjetos, se cubrieron de H<sub>2</sub>O miliQ, se taparon con un cubreobjetos de 20x20 mm (Labbox) y se procedió a su visualización y fotografiado.

### **3.12. Recolección y procesamiento de las muestras para extracción de proteínas totales y extracción de RNA**

Las muestras tanto para la extracción de proteínas como de RNA, se recolectaron a tres semanas después del *bolting* ya que es un momento próximo al final de la floración. Entendemos por *bolting* cuando el crecimiento de la inflorescencia alcanzó aproximadamente 1 cm y se estableció esto como día 0 (D0). Las muestras se recolectaron haciendo uso de pinzas metálicas estériles, se agruparon las muestras independientes en un tubo de ensayo de 1.5mL con 2-3 perlas y se introdujeron las muestras, de manera inmediata, en nitrógeno líquido. Todas las muestras fueron recolectadas a tres semanas después del *bolting*. En el caso de la recolección de muestras del SAM, se retiraron todas las flores en anthesis y los botones florales cercanas a este y se dejaron en torno a 2-3 botones florales, se cortó el ápice con una longitud de aproximadamente 1 cm y se agruparon unos 10-12 SAMs en un tubo de ensayo 1.5 mL. Con respecto a las flores en anthesis, frutos a 5 días post-antesis (5DPA) y frutos a dos días post-antesis (2DPA), se recolectaron retirando dichos tejidos del tallo junto con el pedicelo y se agruparon de 10-12 muestras en un tubo de ensayo de 1.5 mL. Se siguió el mismo procedimiento para las muestras de hoja, recogiendo 3-5 hojas “jóvenes” antes del *bolting*. Una vez que se tuvieron las muestras en nitrógeno líquido y agrupadas en el tubo de ensayo con perlas,

se trituraron utilizando el homogeneizador Retsch MM 400 a un frecuencia de 30 1/s durante 45s. El proceso se repitió dos veces.

### 3.13. Extracción y purificación del RNA total

Para la extracción del RNA total de las muestras recolectadas (explicado anteriormente) se utilizó el sistema *E.Z.N.A Plant RNA Kit* (OMEGA) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Este sistema se fundamenta en la unión selectiva del RNA a membranas acopladas a columnas de centrifugación. Además, el propio kit incorpora la DNAasa para eliminar todo el ADN genómico presente en nuestras extracciones de RNA.

### 3.14. Síntesis de cDNA (retrotranscripción)

Para la síntesis de cDNA a partir de RNA, conocido como retrotranscripción, se usó la *SuperScript<sup>R</sup> IV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) que se basa en el uso de una transcriptasa inversa (RT) para la síntesis de cDNA a partir de un molde de RNA. La cantidad de RNA que se utilizó de las muestras fue de 1 µg.

### 3.15. Oligonucleótidos para qPCR

Los oligonucleótidos para qPCR se obtuvieron mediante una búsqueda bibliográfica para cada región específica de cada gen (Tabla 6) y así poder analizar su expresión.

**Tabla 6. Cebadores usados para el análisis de la expresión de genes mediante qPCR.**

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Referencia
<i>FT</i>	<i>FT</i> Fw	CCATTGGTTGGTACTGATATCC	Marín-González E <i>et al</i> (2015)
	<i>FT</i> Rv	TTGCCAAAGGTTGTTCCAGTT	
<i>FUL</i>	<i>FUL</i> Fw	GAAGGACAATTAGTCCAATGCTC	Di Marzo M <i>et al</i> (2020)
	<i>FUL</i> Rv	GTGAGATAGTTCTACTCGTTTCG	
<i>AP2</i>	<i>AP2</i> Fw	GTGGAGTAGAAGCGGATATC	Di Marzo M <i>et al</i> (2020)
	<i>AP2</i> Rv	ATTGACCCATTCGAGCTTCC	
<i>TIP41</i>	<i>TIP41</i> Fw	GTGAAAACCTGTTGGAAAGCAA	Diseño propio
	<i>TIP41</i> Rv	TCAACTGGATACCCTTTCGCA	

*Fw*: Forward. *Rv*: Reverse.

### 3.14. PCR cuantitativa (qPCR)

Para llevar a cabo la reacción de qPCR se utilizaron placas de 96 pocillos (Applied Biosystems<sup>TM</sup>). En cada pocillo se añadieron 0,8 µL de cDNA, 2 µL de SYBR® GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems<sup>TM</sup>), 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos (5 µM) y H<sub>2</sub>O miliQ hasta un volumen final de 10 µL. La placa se transfirió a un termociclador *ABI 7500 Fast Real-Time PCR System* acoplado a un software informático

de ThermoFisher. Las condiciones que se programaron en dicho termociclador fueron una fase de atemperación de 20 segundos a 50°C, una fase de desnaturalización de 15 minutos a 95°C y 40 ciclos de amplificación (desnaturalización de 15 segundos a 95°C y elongación de 1 minuto a 60°C). Se utilizaron para cada muestras tres réplicas biológicas y tres réplicas técnicas. Para cuantificar la expresión relativa de los genes, se usó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Applied Biosystems™) donde Ct (Ciclo umbral o Treshold Cycle), es el ciclo en el que empieza a detectarse la amplificación por encima del nivel basal de fluorescencia. El gen de expresión constitutiva que se utilizó para la normalización fue *TIP41*.

### **3.15. Extracción de proteínas totales**

La extracción se realizó con el tampón Laemmli 2x (Tris-HCl 0,5mM pH 6; SDS al 20% (v/v), glicerol, azul de bromofenol al 1,5% (v/v); DL-Ditiotreitol (DTT) al 0,1M). El protocolo que se llevó a cabo fue el siguiente: (1) Se sacaron la muestras del nitrógeno líquido y se le añadieron 150uL de tampón Laemmli 2x. (2) Se dió un vortex a la muestras y se dejaron en nitrógeno líquido. (3) Se pusieron las muestras en un baño durante 5 minutos a 95-100°C. (4) Se centrifugaron las muestras a 4°C durante 12min a 15.000 rpm. (5) Se pasó el sobrenadante a uno tubo de ensayo y se conservan en hielo si se van a usar en el momento o en nitrógeno líquido.

### **3.16. Cuantificación de proteínas totales**

Para la cuantificación de las proteínas totales de los extractos, se utilizó el kit de Biorad “RC DC protein assays” siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se cuantificaron los valores de absorbancia mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 750 nm. Para la medición se empleó un espectrofotómetro de Thermo Scientific y cubetas de 1 cm de paso óptico.

### **3.17. Análisis proteico mediante Western blot**

Se realizó un Western Blot a partir del extracto de proteínas totales.

#### *3.17.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (EGPA) en condiciones desnaturalizantes*

Para ello, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Para ello, usamos el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad). Las dimensiones de los geles usados fueron de 6,5 x 8 cm y el grosor del gel fue en unos casos de 1,5 mm a una concentración de poliacrilamida al 15% (p/v). La cantidad de muestra que se cargó en cada pocillo se

hizo en base al contenido de proteínas totales, según lo descrito anteriormente. El tampón de electroforesis utilizado estaba compuesto de contiene 14,4 g/L de glicina, 3 g/L de Tris (base) y 10 mL/L de SDS 10%. Se trabajó con una corriente eléctrica constante de 100 V.

#### *3.17.2. Transferencia húmeda*

Una vez que las proteínas fueron separadas por electroforesis, se transfirieron a una membrana de PVDF con un tamaño de poro 0,2 µg (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en tampón de transferencia con una corriente constante de 100 V durante 40 minutos a 4°C. Posteriormente, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau como una forma de cuantificación relativa de la cantidad de proteína de cada muestra y se eliminó el colorante.

#### *3.17.3. Incubación de la membrana con anticuerpos*

Previo a la incubación, se saturó la membrana con solución de bloqueo (TBST 0,1% Tris-HCl 50mM; NaCl 150mM; Tween-20 al 0,05% (p/v); leche en polvo al 5% (p/v)) durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó la membrana *o/v* a 4°C con el anticuerpo primario. Finalmente, se retiró el anticuerpo primario, se lavó la membrana, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario y se volvió a lavar esta. El anticuerpo primario que se utilizó en este trabajo fue el anti-FT/TSF (Agrisera) que reconoce específicamente a la proteína FLOWERING LOCUS T o a su homóloga TWIN SISTER OF FT de *A. thaliana* y se diluyó a una concentración de 1:1000. El anticuerpo secundario que se utilizó fue el anti-Rabbit IgG H&L (Agrisera) que se diluyó a una concentración de 1:10000.

#### *3.17.4. Revelado de la membrana*

Para el revelado de las membranas se usó el método de detección muy sensible basado en el kit *AgriseraECL SuperBrighth* (Agrisera) basado en la actividad de la enzima peroxidasa. El sustrato se añadió a la membrana, se incubó durante al menos 5 minutos y se observó mediante el imager LAS-3000 de Fujifilm.

### **3.18. Recolección y procesamiento de exudados**

Las muestras recolectadas de exudados recolectadas fueron de frutos 5DPA y frutos 2DPA de plantas a 3 semanas después del *bolting* (SDB) del ecotipo silvestre, el mutante *ft-10* y el mutante *ams-1*. Para ello se llevó a cabo el siguiente procedimiento: (1) Se recogieron los frutos, junto con el pedicelo, con pinzas metálicas estériles y se depositaron en una placa Petri que contenía EDTA 5 mM (ácido etilendiaminotetraacético). (2) Con

una cuchilla estéril se cortó aproximadamente 1mm del pedicelo del fruto. (3) Se agruparon 15 muestras de fruto en tubos de ensayo de 1.5mL a los que previamente se les había añadido 200 µL de EDTA 5mM. (4) Los tubos de ensayo se dejaron en la cabina del invernadero o/v cubiertos de papel de aluminio en condiciones de oscuridad. (5) Al día siguiente se retiraron los frutos del tubo de ensayo y el exudado se quedó en la solución de EDTA presente en el tubo de ensayo.

Una vez recolectados los exudados, se procedió a liofilizar las muestras con el secador de vacío de alto rendimiento. De esta manera, se eliminó el EDTA y cualquier resto celular que pudiese interferir con el SDS-PAGE.

### **3.19. Fenotipado de la cinética de producción de flores**

Para determinar la producción de flores se realizó un conteo de las flores/frutos presentes en la inflorescencia principal de la planta durante tres días a la semana (Lunes, Miércoles y Viernes). Se marcó la última flor en anthesis presente cada día que se realizaba el conteo para así tenerla como referencia para el siguiente conteo de flores. Además, se recogieron datos sobre el día en el cual la planta producía la transición floral o *bolting* y datos sobre el tiempo que el meristemo se mantuvo activo (produciendo flores) en cada mutante.

Se utilizaron los mutantes *ft-10*, *svp-32*, *tsf-1* y como control el ecotipo silvestre (Col-0) y el mutante *ful-2*.

## **4. RESULTADOS**

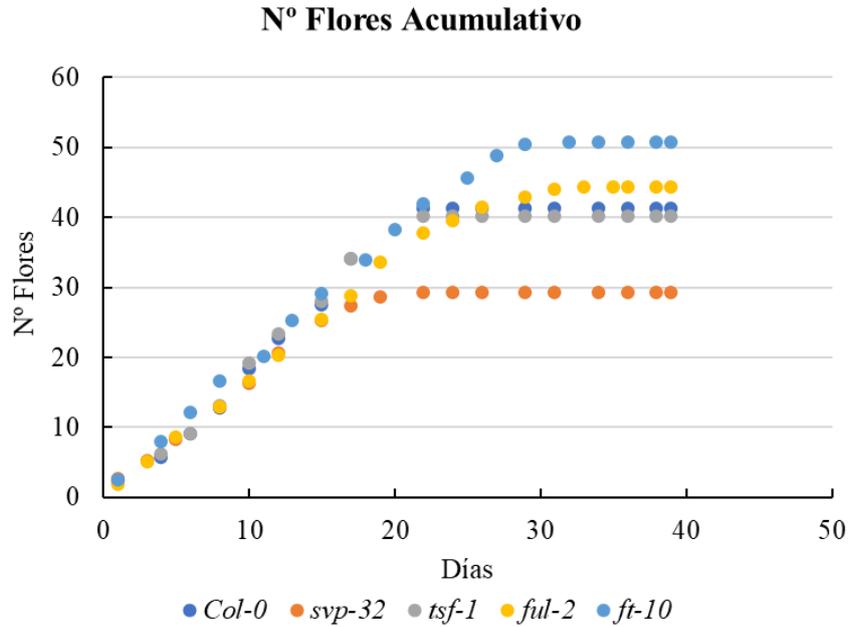
La ruta FUL-AP2 es determinante en el control del final de la floración, pero apenas se conocen elementos reguladores de su expresión durante esta etapa. Por otro lado, tanto FUL como AP2 también actúan durante el inicio de la floración actuando como promotor y represor respectivamente. Durante el inicio de la transición floral sí que se conocen genes que modulan su expresión y actividad, aunque se desconoce si estos genes también ejercen esta función durante otras etapas del desarrollo.

### **4.1. Los integradores florales FT y SVP son moduladores del final de la floración**

Con el fin de identificar nuevos elementos reguladores implicados en el final de la floración se decidió caracterizar fenotípicamente mutantes para algunos de los reguladores descritos de FUL y AP2 y establecer si, al igual que FUL y AP2, estos genes

podrían participar en el control del final de la floración. Se decidió caracterizar los mutantes *FLOWERING LOCUS T* (*ft-10*, FT es un activador de FUL, y represor de AP2), *TWIN SISTER OF FT* (*tsf-1*, gen estrechamente relacionado y redundante con FT) y *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*svp-32*, represor de FT y la transición floral junto a AP2). Como controles se utilizaron plantas silvestres ecotipo Columbia (Col-0) y el mutante *ful-2*. Los datos recogidos del conteo del número de flores nos permitieron generar una gráfica donde observar la cinética de producción de frutos para cada uno de los mutantes analizados (Figura 3). A partir de este tipo de gráficas se pueden establecer no solo la producción total de flores y el tiempo que dura el periodo de floración, sino también la tasa de producción de las mismas, reflejando la actividad del meristemo.

En cuanto al número total de flores, observamos que la inflorescencia principal de las plantas silvestres y el mutante *tsf-1* produjeron un número similar de flores, con una media de  $41,6 \pm 2,1$  y  $38,8 \pm 1,7$  flores respectivamente (Figura 3, 4). Como cabría esperar, el mutante *ful-2* mostro un incremento del número de flores producido en el tallo principal ( $48,1 \pm 1,9$ ) respecto a las plantas silvestres (Figura 3, 4), aunque no tan significativo como en trabajos realizados anteriormente en el grupo (Balanzà et al., 2018, 2019). Los dos mutantes analizados restantes, *ft-10* y *svp-32* llamaron fuertemente nuestra atención: El mutante *ft-10* cesó la actividad meristemática con un total de  $50,3 \pm 4,5$  flores mostrando una mayor producción que las plantas silvestres (Figura 3). Sin embargo, el mutante *svp-32* tuvo una producción total de  $29,1 \pm 3,8$  flores resultando en una menor producción que las plantas control (Figura 3).

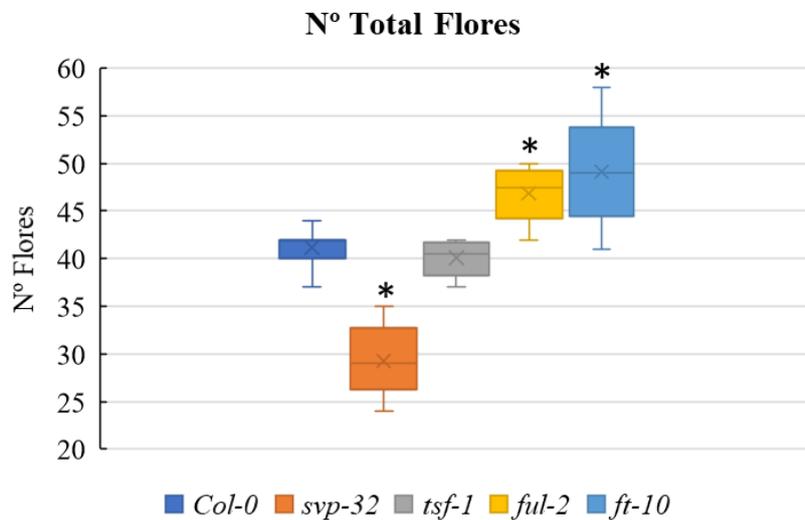


**Figura 3: Número acumulativo de flores producido por los mutantes nulos de integradores de la transición floral.** Se contaron las flores durante tres días a la semana. En el gráfico se representan todas las líneas desde un mismo punto de partida, pero cabe destacar que cada mutante floreció a un tiempo determinado ya que presentaban alteraciones en la transición floral. Cada punto representa la media de al menos 10 plantas. La significancia estadística del número final y de los días que está el meristemo activo se representan en la figura 4.

Los resultados obtenidos indican que tanto FT como SVP modulan la actividad del SAM en la inflorescencia. Nuestros datos indican que FT, al igual que FUL, se comporta como un promotor del final de la floración. Por otro lado, SVP actúa de forma opuesta, promoviendo la actividad del meristemo.

En el número de flores producido por el SAM depende principalmente de dos factores, la velocidad con la que produce nuevos primordios y el tiempo durante el que está produciéndolos. Se ha descrito que el mutante *ful* produce flores al mismo ritmo que las plantas silvestres y que el incremento observado en la producción de flores se debe a una extensión en el tiempo de la actividad meristemática. Con el objetivo de determinar si las diferencias observadas en la producción de flores se debían a un cambio en el ritmo de producción de las flores o bien a una mayor longevidad del SAM, se analizó también la duración del periodo de floración, así como la tasa de producción de flores semanal (Figura 5). Nuestros datos indicaron que tanto las plantas silvestres como todos los mutantes se comportaban de manera similar en torno a las primeras dos semanas (Figura 3). Sin embargo, a partir de aproximadamente 18 días se observaron los primeros cambios

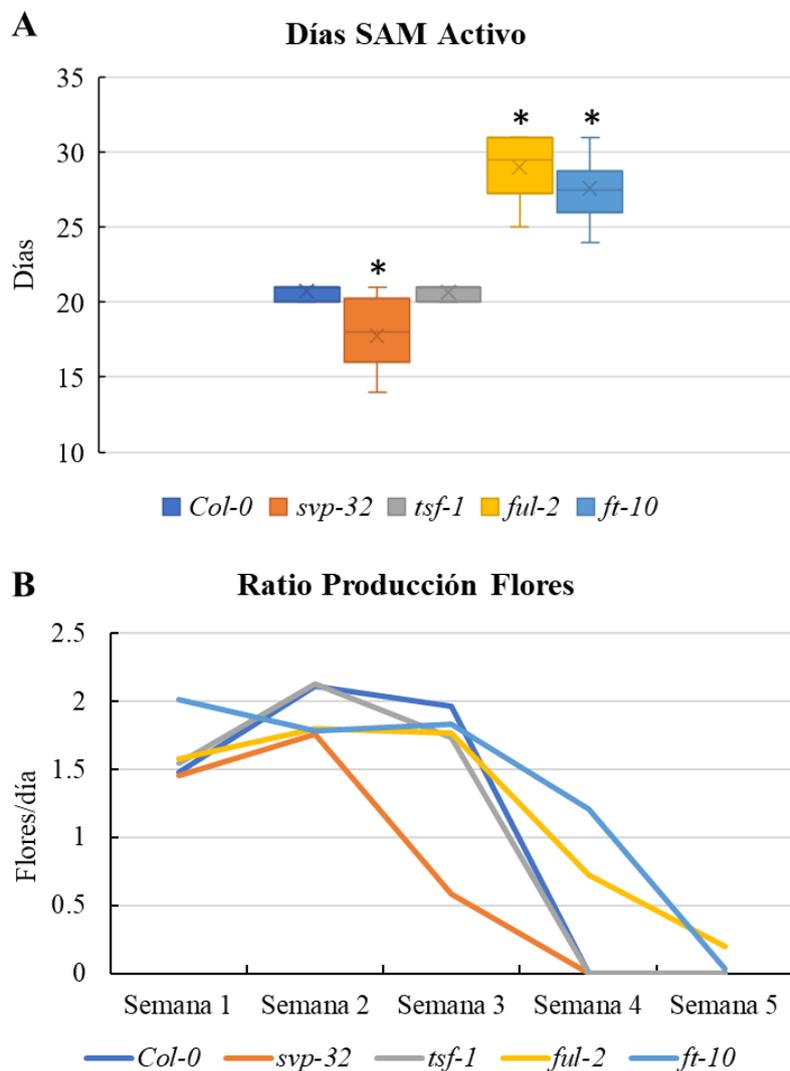
ya que las plantas *svp-32* pararon la producción de flores mientras que el resto de las plantas continuaron produciendo flores (Figura 3, 5). Posteriormente, se observó la parada de las plantas silvestres y el mutante *tsf-1* cesando la producción entorno a los 21 días (Figura 3, 5). Por último, tanto el mutante *ful-2* como la línea *ft-10* mantuvieron la producción de flores hasta aproximadamente 28 días después del *bolting* (Figura 3, 5). Como ya se ha mencionado, el mutante *ful-2* produjo menos flores que en experimentos descritos en la bibliografía, pero, aun así, estuvo produciendo flores durante más tiempo como se esperaba (Figura 3, 5). Estos resultados indicaban claramente que el mutante *ft-10*, al igual que *ful-2* mantenían los meristemos activos durante más tiempo, mientras que el mutante *svp-32* desarrollaba una parada temprana de estos.



**Figura 4. Número total de flores producidas en las diferentes líneas de plantas.** Se utilizaron diferentes mutantes de pérdida de función relacionados con genes integradores de la floración. Representación del número total de flores producidas por los diferentes mutantes de pérdida de función analizados, destacan *svp-32* y *ft-10* por producir, respectivamente, un número significativamente menor y mayor de flores que Col-0 respectivamente. En cada línea se analizaron al menos 10 plantas independientes. Los datos experimentales se sometieron a una prueba estadística t-Student para comprobar las diferencias respecto a Col-0.

Para determinar si la tasa de producción de nuevos primordios producidos por el meristemo se comportaba de forma distinta en los diferentes mutantes, se calculó la tasa de producción de flores diarias por semanas para cada mutante y los controles. Se observó que el comportamiento del SAM fue similar en todas las plantas analizadas durante las dos primeras semanas (Figura 5). Durante la tercera semana, todas las plantas mantuvieron la misma tasa de producción diaria salvo el mutante *svp-32* que disminuyó

claramente su ritmo. Durante la cuarta semana solo permanecieron activas las plantas de los mutantes *ful-2* y *ft-10*, que detuvieron su actividad durante la quinta semana. Estos datos refuerzan la idea propuesta al analizar el periodo de floración de los mutantes indicando que los cambios en el número de flores producidas por el SAM se deben principalmente a un cambio en la regulación temporal del final de la floración más que a un cambio en la tasa de producción de nuevos primordios.



**Figura 5. N° de días que permanece el SAM activo y ratio de producción. A.** N° flores y tiempo de producción. **A.** Días que permanece activo el SAM en las diferentes líneas. **B.** Ratio de producción de flores por día en las diferentes semanas que permanecieron activos los meristemas de las diferentes líneas. En cada línea se analizaron al menos 10 plantas independientes. Los datos experimentales se sometieron a una prueba estadístico t-Student para comprobar las diferencias respecto a *Col-0*.

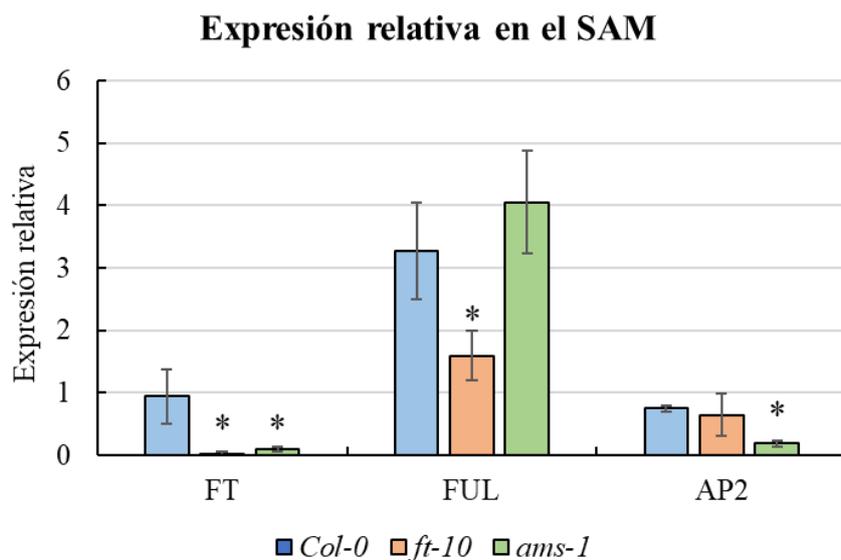
Los resultados obtenidos nos permiten concluir que tanto FT como SVP podrían participar en la regulación del final de la floración. Debido a las limitaciones de tiempo para la realización de este trabajo, se decidió continuar con el estudio de solamente uno de estos dos factores, FT. Los motivos de esta elección fueron que FT se había descrito como el florígeno, una proteína móvil capaz de inducir la transición floral (Corbesier et al., 2007; Fornara et al., 2010). Bajo las condiciones adecuadas, FT se expresa en las hojas donde se traduce y viaja vía floema hasta alcanzar el SAM donde dispara la transición floral. Como se comentó en la introducción, el final de la floración está controlado genéticamente en el SAM por la ruta FUL-AP2, pero también por señales desconocidas mediadas por la presencia de semillas. De este modo, se ha propuesto la posible existencia de una señal móvil que viajara desde las semillas hasta el SAM donde induciría su parada. Puesto que FT parece ejercer una señal inhibitoria sobre la actividad del SAM y, además, tiene la capacidad de moverse a larga distancia por la planta, decidimos continuar con su estudio y determinar si funciona como una señal local o móvil.

#### **4.2. Análisis de la expresión génica de FT y la ruta FUL-AP2**

Para analizar molecularmente qué mecanismos podrían encontrarse detrás del retraso en la parada del meristemo y de la mayor producción de flores en el mutante *ft-10*, se decidió realizar un estudio de la expresión génica tanto de FT como de los elementos principales de la ruta FUL-AP2, tanto en plantas silvestres como en el mutante *ft-10*. Interesantemente, en estudios transcriptómicos previos indican que la expresión de FT en el SAM es muy baja o incluso nula (Tian et al., 2014; Yadav et al., 2009) pero sorprendentemente es muy alta en frutos y semillas en estadios intermedios (Schmid et al., 2005). Ante la posibilidad de que FT pudiera estar actuando como una señal móvil procedente de las semillas se decidió incluir en el estudio el mutante estéril *aborted microspore-1 (ams-1)*. *ABORTED MICROSPORES* es un gen que se expresa exclusivamente en las células del tapetum de las anteras, cuya ausencia genera esterilidad masculina, traduciendo en una prolongación en la actividad del SAM.

En primer lugar, se analizó la expresión de dichos genes en el SAM. Para ello se tomaron muestras eliminando el máximo número de primordios florales circundantes. Según nuestro análisis, FT se expresaba de forma detectable en el SAM de las plantas silvestres, siendo no detectable en las muestras del mutante *ft-10*. En cuanto a la expresión de FT en el SAM del mutante *ams-1*, se observó una fuerte reducción en sus niveles (Figura 6), indicando que en ausencia de las semillas hay una fuerte reducción de los niveles de FT

en el meristemo. Respecto a la expresión de *FUL* en el SAM, se vió que en el fondo *ft-10* la expresión estaba reducida aproximadamente a la mitad en comparación al fondo silvestre, aunque en el mutante estéril no se observaron cambios respecto al control (Figura 6). Por último, la expresión de *AP2* no varió considerablemente entre las plantas silvestres y el mutante *ft-10*, viéndose reducida a la mitad en el mutante *ams-1* (Figura 6). Los resultados obtenidos sugieren que el mantenimiento de la actividad del SAM observado en el mutante *ft-10* podría explicarse por la disminución en los niveles de *FUL*. Esta relación también está de acuerdo con la función activadora de *FUL* propuesta para FT. Por otro lado, la ausencia de FT y la disminución de *FUL* parece no tener efectos sobre la expresión de *AP2*. Curiosamente, en el mutante *ams-1*, que al igual que *ft-10* mantiene durante más tiempo la actividad del SAM, la expresión de *FUL* y *AP2* parece ser diferente. En este caso sí que se observó una clara disminución de la expresión de *AP2* respecto al control, mientras que los niveles de *FUL* eran similares a los observados en el control. Un dato que nos llamó la atención fue que en el mutante *ams-1*, donde solo está afectada la fertilidad, se observará una reducción tan drástica de los niveles de FT en el SAM, y que esta reducción no afectará a la expresión de *FUL* como ocurría en el mutante *ft-10*. Esta observación sugiere que la presencia de semillas sería capaz de inducir la expresión de FT en el SAM. Por otro lado, una posible explicación a los niveles altos de *FUL* en el mutante estéril podría ser que la proteína de FT necesaria para activar la expresión de *FUL* proviniera de otros tejidos de la planta.



**Figura 6. Niveles de expresión relativos de *FT*, *FUL* y *AP2* en el SAM en plantas silvestres, mutantes *ft-10* y mutantes estériles (*ams-1*).** Se muestra el nivel de expresión de cada gen normalizado frente al nivel de expresión del gen constitutivo TIP41-like de tres réplicas biológicas pertenecientes a experimentos independientes. Para cada réplica biológica se llevaron a cabo tres réplicas técnicas. Las barras de error corresponden a la SD de la media. La significancia estadística de las diferencias respecto al ecotipo silvestre se realizaron mediante un análisis t-Student.

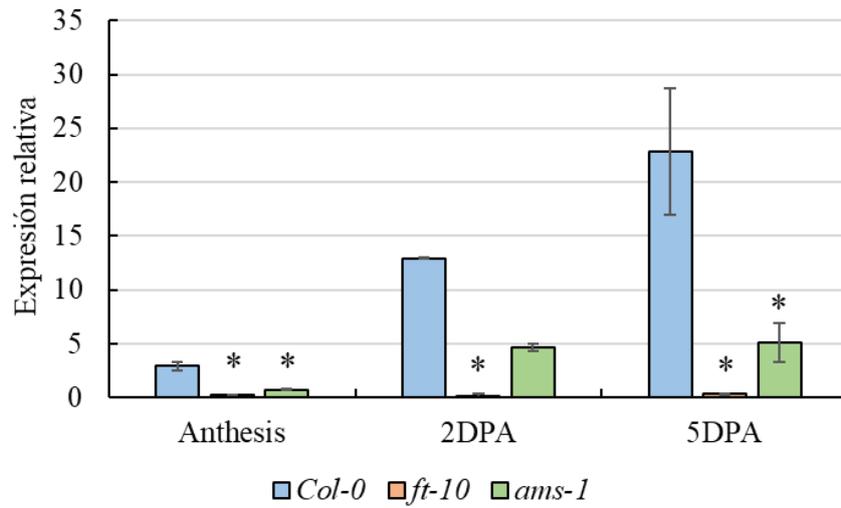
Puesto que la señal derivada de las semillas se debería producir en el fruto, decidimos analizar la expresión de *FT*, *FUL* y *AP2* en diferentes momentos de su desarrollo (Figura 7), analizando flores en antesis, frutos dos días después de antesis (2DPA) y frutos cinco días después de antesis (5DPA).

En cuanto a la expresión de *FT* en las plantas silvestres, se pudo observar un progresivo aumento de la expresión con el desarrollo del fruto, coincidiendo los valores de expresión más altos en los frutos de 5DPA (Figura 7A). En el mutante estéril, al igual que ocurría en el SAM, los niveles de *FT* fueron extremadamente bajos en el estadio de antesis, aumentando significativamente a 2DPA respecto a antesis, aunque sin alcanzar nunca los niveles observados en las plantas silvestres. Los niveles de *FT* en frutos 5DPA fueron similares a los observados en frutos 2DPA, incrementándose en este estadio la diferencia respecto a las plantas silvestres (Figura 7A). Estas diferencias observadas entre plantas silvestres y el mutante *ams-1* podría asociarse al efecto de la polinización y generación de semillas que estarían generando un aumento de *FT* en el fruto debido a esas semillas en desarrollo.

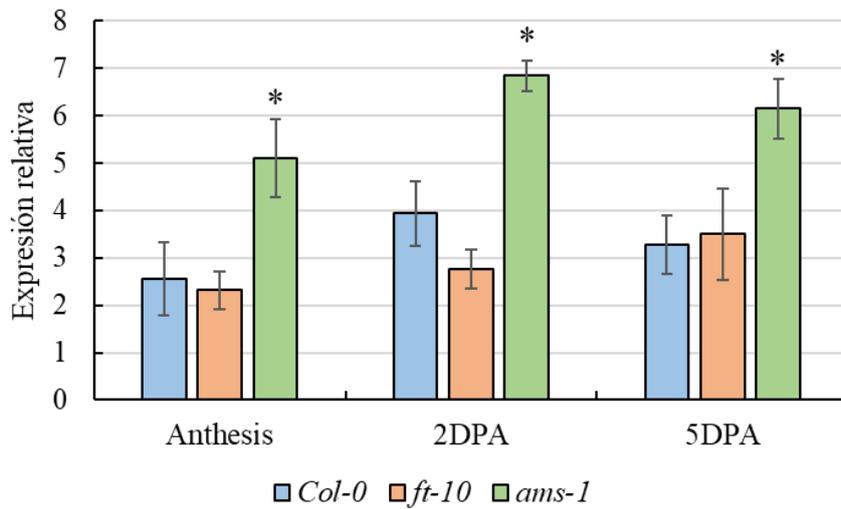
Analizando la expresión de *FUL* durante el desarrollo del fruto, se observó que en las plantas silvestres la expresión de este gen se mantiene constante durante todo el desarrollo del fruto (Figura 7B). Interesantemente, el mutante *ft-10* no tenía afectada la expresión de *FUL* en ninguna de los tres estadios de desarrollo del fruto analizados (Figura 7B), sugiriendo que la expresión de *FUL* durante el desarrollo floral no depende de FT. Por otro lado, se observó que en el mutante estéril los niveles de *FUL* aumentaban significativamente en las tres etapas del desarrollo analizadas (Figura 7B), indicando que la presencia de semillas ejerce un efecto inhibitorio en la expresión de *FUL*.

Por último, se analizó el patrón de expresión de *AP2* en los diferentes estadios del desarrollo del fruto. Al igual que ocurría con la expresión de *FT* en los frutos de silvestres (Figura 7A), la expresión de *AP2*, va incrementándose paulatinamente con el desarrollo del fruto (Figura 7C). En el mutante *ft-10* el aumento en la expresión de *AP2* es mucho mayor que en las plantas silvestres indicando un efecto de FT en el control de los niveles de expresión de *AP2* (Figura 7C). En el mutante *ams-1* se observó una tendencia opuesta, presentando niveles de expresión menores que los observados en las plantas control (Figura 7C), sugiriendo un efecto positivo de las semillas sobre los niveles de *AP2*. Cabe destacar que *AP2* es también un regulador clave del desarrollo de la semilla (Ohto et al., 2009), donde se expresa. La ausencia de semillas podría así, explicar el bajo nivel de expresión respecto a plantas silvestres, y los valores similares de expresión entre frutos 2DPA y 5DPA (Figura 7C).

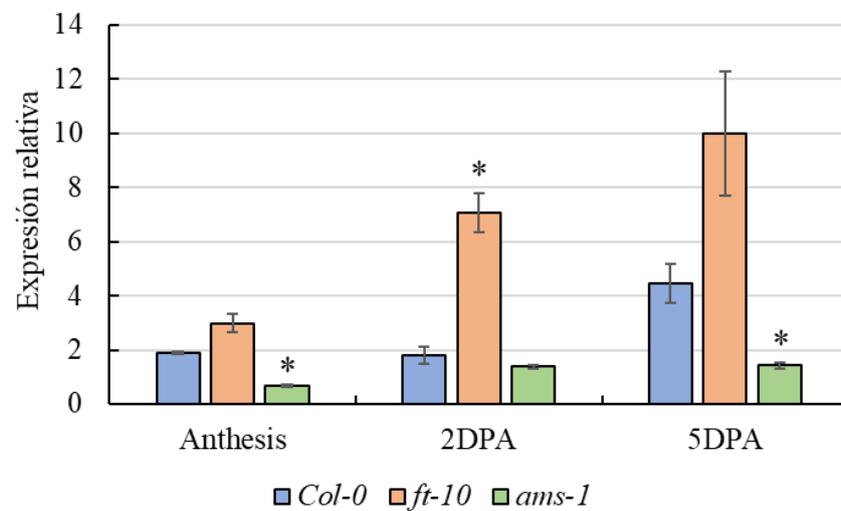
### Niveles expresión relativa *FT*



### Niveles expresión relativa *FUL*



### Niveles expresión relativa *AP2*



**Figura 7. Niveles de expresión de FT, FUL y AP2 en flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 2DPA en plantas silvestres, mutantes *ft-10* y mutantes estériles (*ams-1*).** A. Niveles de expresión relativos de *FT* en flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 5DPA. B. Niveles de expresión relativos de *FUL* en flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 5DPA. C. Niveles de expresión relativos de *AP2* en flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 5DPA. Se muestra el nivel de expresión de cada gen normalizado frente al nivel de expresión del gen constitutivo TIP41-like de tres réplicas biológicas pertenecientes a experimentos independientes. Las barras de error corresponden a la SD de la media.

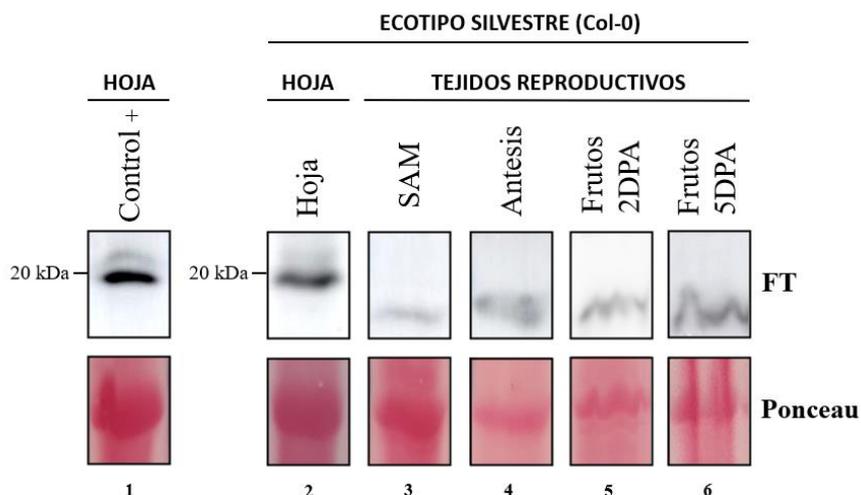
El análisis de expresión realizado en los diferentes estadios de desarrollo del fruto sugiere una regulación diferente a la observada en el meristemo. Mientras en el SAM la expresión de *FUL* parece depender de *FT*, en el fruto, esta dependencia parece no existir. Los niveles de *AP2* mostraron una relación opuesta, observándose un claro efecto represor de *FT* sobre los niveles de *AP2* durante el desarrollo del fruto que parece no actuar en el SAM. Respecto al mutante estéril se observó una clara disminución en los niveles de *FT* durante el desarrollo del fruto, aunque no tan drástica como la observada en el SAM. Además, el mutante estéril mostro un claro incremento en los niveles de *FUL*, sugiriendo un efecto inhibitorio en la expresión de *FUL* durante el desarrollo del fruto dependiente de la presencia de semillas.

#### **4.3. Análisis de localización de la proteína FT**

*FT* es una proteína móvil capaz de desplazarse desde la hoja al SAM y desencadenar la transición floral (Corbesier et al., 2007; Fornara et al., 2010), donde activa la expresión de *FUL* (Mathieu et al., 2009; Teper-Bamnolker & Samach, 2005; Wigge et al., 2005). Nuestros resultados del análisis de expresión determinaban que *FT* se expresa de forma más abundante en frutos que en el SAM (Figura 6, 7), donde presenta niveles muy bajos. La similitud de este movimiento descrito para *FT* con el propuesto para la desconocida señal derivada de la semilla, junto con el fenotipo observado en el mutante *ft-10*, sugerían que *FT* podría formar parte de la(s) señal(es) producida por las semillas para controlar la actividad del meristemo. Con estas premisas, decidimos estudiar la presencia la proteína *FT* en diferentes tejidos. Seleccionamos flores en antesis, frutos 2DPA, frutos 5DPA y su posible acumulación en el SAM. En este análisis volvimos a incluir al mutante estéril *ams-1* para observar si en ausencia de semillas, se observaban cambios en la acumulación de *FT* en correspondencia con los cambios observados a nivel de expresión y si el retraso de en la parada de mutantes estériles se correlaciona con una baja cantidad de *FT*.

Para llevar a cabo el análisis de detección de la proteína FT se utilizó un anticuerpo específico para FT/TSF de *A. thaliana*. Hasta donde nosotros sabíamos, no existían evidencias de su uso para detectar FT en plantas silvestres, aunque su efectividad había sido testada en líneas de sobreexpresión de FT. En primer lugar, se puso a punto un protocolo de Western Blot (WB) que permitiera la detección de la proteína y comprobar la especificidad del anticuerpo. Para llevar a cabo las pruebas de especificidad se utilizó tejido vegetal de hoja antes de la transición floral y las muestras fueron recogidas por la tarde, ya que la expresión de FT durante el desarrollo vegetativo depende del ciclo circadiano acumulándose la proteína a última hora de la tarde. Una vez que se llevaron a cabo las pruebas pertinentes de especificidad, se establecieron las condiciones adecuadas para la detección de FT y se consiguió detectar la proteína FT endógena gracias al uso de un kit de revelado “supersensible”. Como control positivo se usaron muestras de hoja de una línea que expresaba FT mediante un promotor inducible por calor (pHSP18).

En la puesta a punto de nuestro protocolo observamos que la proteína FT mostraba un tamaño diferente en función del tejido (Figura 8), dato que no había sido previamente descrito: La proteína FT de los tejidos reproductivos (Figura 8; 3-6) era de menor tamaño que la proteína FT presente en los tejidos vegetativos (Figura 8; 1-2). Además, también se observó que la proteína FT está presente en todos los tejidos tanto vegetativos como reproductivos (Figura 8; 1-6). La cantidad de proteína en cada muestra no es comparable ya que se realizaron en experimentos independientes con diferentes exposiciones de quimioluminiscencia, pero si nos son indicativos de ese evidente cambio en el tamaño de la proteína. En el control positivo, en el que los niveles de expresión de FT son mayores (Figura 8;1), se observa no solo el incremento en la intensidad de la banda esperado sino también la aparición de una segunda banda de un tamaño superior que podría deberse a una versión modificada de FT o de TSF. Por otro lado, confirmamos que la proteína que estábamos viendo era FT y no TSF ya que utilizamos como control el mutante de pérdida de función *ft-10* en el cual no se detectaba ninguna banda en ningún tejido (Figura 9, 10). Estos datos sugieren la existencia de un mecanismo de modificación postraduccional, o bien de procesos relacionados con el RNA mensajero como eventos de “splicing” alternativos o la existencia de inicios de la traducción alternativos.



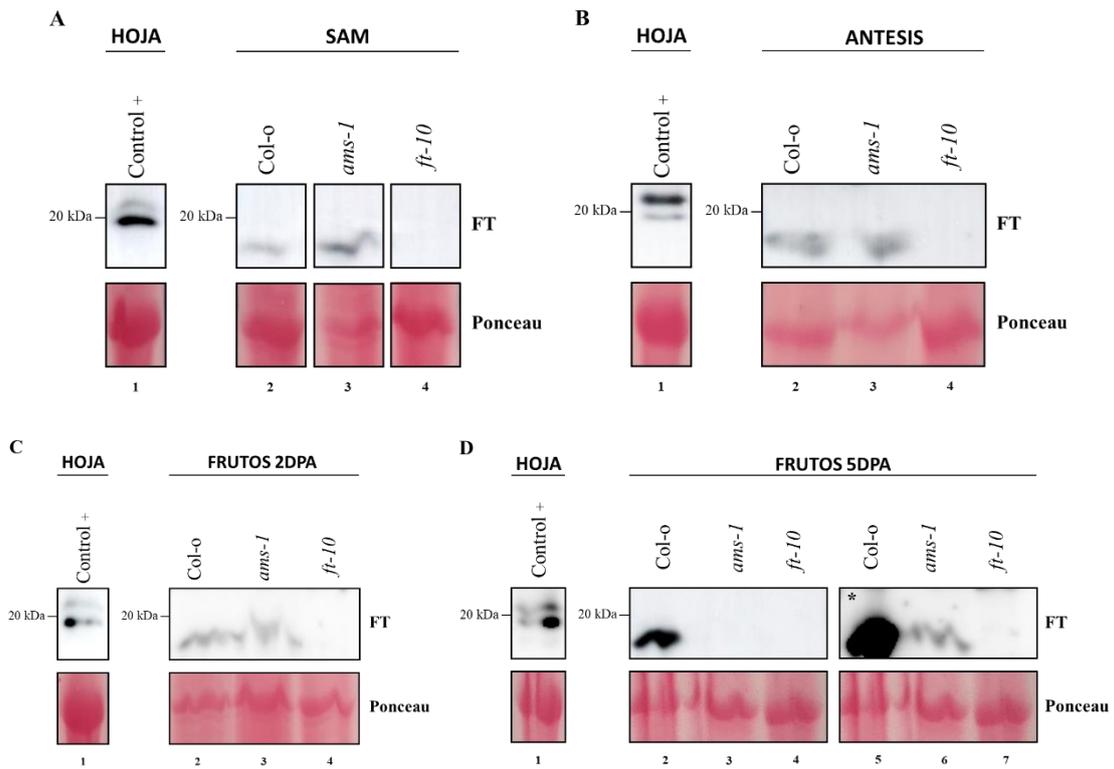
**Figura 8. Análisis Western Blot de muestras de tejidos vegetativos (hoja) y tejidos reproductivos (SAM, Antesis, Frutos 2DPA y Frutos 5DPA) en el ecotipo silvestre Col-0.** **8.1.** Control positivo de hoja. Las muestras del control positivo se recolectaron de una planta transgénica que expresa FT mediante un promotor inducible por calor (HSP18). Se observan dos bandas, la banda cercana a 20 kDa correspondería con el tamaño de FT (19,8 kDa). **8.2.** Muestra de hoja de Col-0, se detecta una banda clara de en torno a 20 kDa que correspondería con FT. **8.3** Muestra de SAM de Col-0, se puede detectar FT. **8.4** Muestras de Antesis de Col-0, FT está presente. **8.5** Muestras de Frutos 2DPA de Col-0, se detecta la presencia de FT. **8.6** Muestras Frutos 5DPA de Col-0, hay presencia de FT. En todos los tejidos reproductivos se observa un cambio en el tamaño de la proteína FT a aproximadamente 18 kDa. También se pueden observar las tinciones de Ponceau que se realizaron de todas las membranas y que utilizamos como un control de carga y de calidad de la transferencia. Todas las muestras fueron reveladas usando un kit de revelado ultrasensible (*ECL ULTRABRIGHT*, AgriSera) y utilizando el modo “Snow” en el imager LAS-3000 Fujifilm.

Para continuar con nuestro estudio, comparamos los patrones de detección de la proteína FT en los diferentes tejidos reproductivos en Col-0, Col podado *ft-10* y el mutante estéril *ams-1*.

Cuando se analizaron muestras del SAM, se pudo detectar la proteína FT en todas las líneas testadas (Figura 9 A;1-3) a excepción de *ft-10* en la que, como esperábamos, no se detectó (Figura 9 A;1-4). Como se ha comentado anteriormente, el tamaño de la proteína FT en todas las líneas estudiadas no correspondía con el tamaño de los 19,8 kDa esperados que se observaba en el control positivo (Figura 9A;1), sino que la proteína observada tenía un menor tamaño (aproximadamente 18 kDa). A pesar de que se realizó la tinción de Ponceau, está solo está recomendada como un control de carga y de calidad de la transferencia, pero no como una medida de cuantificación y normalización (Janes, 2015).

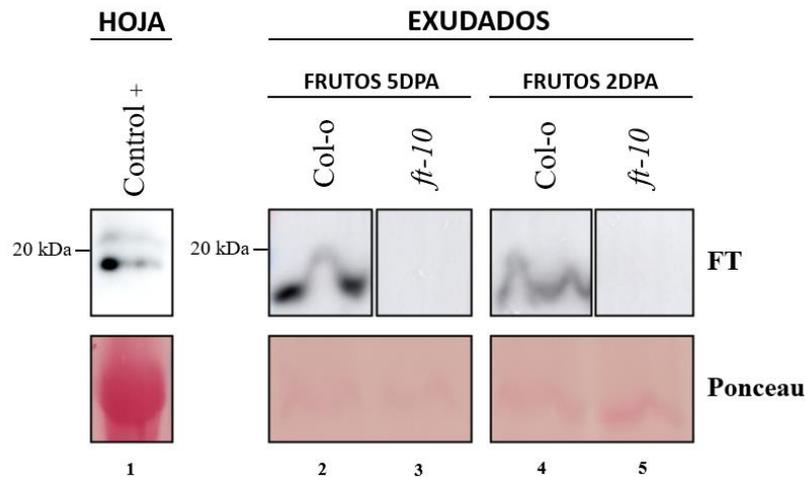
A pesar de esto, los resultados sugieren una mayor cantidad de FT en el mutante estéril respecto al fenotipo silvestre (Figura 9A;2-3).

En las muestras de flores en anthesis se pudo detectar la proteína FT tanto en las plantas silvestres como en las estériles, pero no se pudo detectar en el mutante *ft-10* (Figura 9B;1-4). En frutos de 2DPA y 5DPA (Figura 9C y 9D) se detectó la presencia de FT tanto en el control silvestre como en el mutante *ams-1* (Figura 9C;2-3 y 9D;2-5), sin ser detectable en el mutante de pérdida de función *ft-10* (Figura 9C;4 y 9D;4). A pesar de que la tinción de Ponceau no es un método fiable para cuantificar, se observó una clara diferencia en los niveles de FT entre frutos de 5DPA silvestres y estériles. Los frutos silvestres mostraron una señal óptima en nuestras condiciones optimizadas (Figura 9D;2), mientras que en el mutante estéril solo se detectó cuando sobreexpusimos la membrana (Figura 9D;6), aunque tenían ambas un patrón de control de carga parecido. Estos datos reflejarían cierta correspondencia entre los niveles de expresión observados para FT en frutos silvestres y la mayor cantidad de proteína detectada.



**Figura 9. Análisis Western Blot de detección de FT en muestras de SAM, flores en antesis, frutos 2DPA y frutos 5DPA en las líneas Col-0, mutante estéril (*ams-1*) y *ft-10*.** La muestra control utilizada fue la misma para todos los análisis, obtenida de muestras de hoja de una transgénica que expresaba FT vía un promotor inducible por calor (HSP18). **9A.** Muestras de SAM. Se detecta expresión de FT en todas las líneas con un tamaño de aproximadamente 18kDa a excepción de *ft-10* que no expresa FT. **9B.** Muestras de flores en antesis. Todas las líneas a diferencia de *ft-10* tienen presencia de la proteína FT de 18 kDa. **9C.** Muestras de frutos 2DPA. FT está presente en todas las muestras de fruto 2DPA a excepción de *ft-10*. **9D.** Muestras de frutos 5DPA. En las muestras **9D;2-3-4** podemos observar que FT solo está presente en Col-0 y a gran intensidad. Sin embargo, si aumentamos la exposición de la membrana y la saturamos podemos observar expresión también en el mutante estéril como se representa en **9D;5-6-7**. Tampoco se observa FT en el mutante *ft-10* (9D;4-7). El tamaño de la proteína en todos los tejidos era más pequeño que en el control, en torno a 18 kDa. También se representan las tinciones de Ponceau que se realizaron de todas las membranas y que utilizamos como un control de carga y de calidad de la transferencia. Todas las muestras fueron reveladas usando un kit de revelado ultrasensible (*ECL ULTRABRIGHT*, Agrisera) en el imager LAS-3000 Fujifilm.

Nuestros datos indicaban que FT estaba presente tanto en frutos silvestres como en frutos estériles, pero se acumulaba en mayor medida en los frutos silvestres. Esta observación se correspondía con los niveles de expresión de *FT* observados en frutos, siendo esta más alta en plantas silvestres. En SAM, los niveles de FT fueron similares, aunque en este tejido no había una correlación con los niveles de expresión. Una de las hipótesis que nos planteamos fue si la proteína detectada en el SAM de las plantas estériles podría proceder de otros tejidos, como por ejemplo los frutos o semillas, donde se acumulaba en mayor medida. Para determinar si la proteína FT podría salir del fruto se procedió a testar la presencia de FT en los exudados del fruto. Al analizar dichos exudados, observamos la presencia de FT tanto en exudados de frutos 5DPA (Figura 10;2) como en los de frutos 2DPA (Figura 10;4), mientras que esta señal no se detectó en los exudados de *ft-10* (Figura 10;3-5). Estos datos sugieren que FT podría desplazarse desde el fruto hacia otras partes de la planta como el SAM donde podría estar desempeñando algún papel en el control de su actividad.



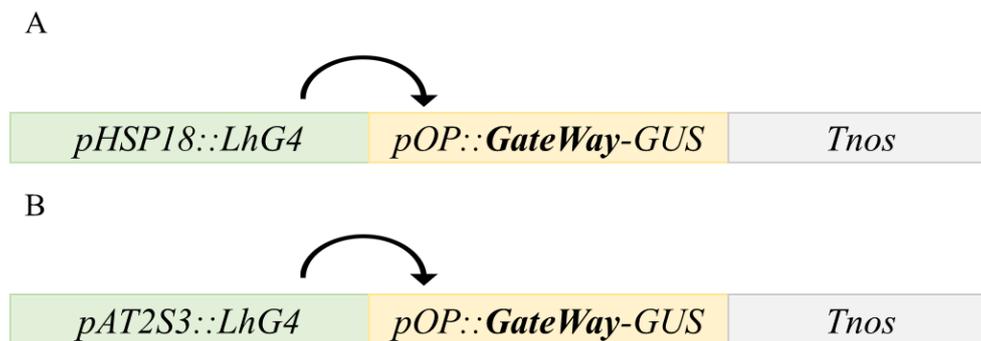
**Figura 10. Análisis Western Blot de exudados de frutos 5DPA y frutos 2DPA.** Las muestras fueron recolectadas a 3 semanas después del *bolting* (3SAB). **9.1** Control positivo de hoja. **9.2-3.** Se puede detectar FT en los exudados de frutos de 5DPA en el ecotipo silvestre pero no en el mutante *ft-10*. **9.4-5.** FT está presente en exudados de frutos 2DPA, pero ausente en el mutante de pérdida de función. La proteína tiene un tamaño menor que el control. Las muestras del control positivo se recolectaron de una planta transgénica que expresa FT mediante un promotor inducible por calor (HSP18). Los exudados fueron recolectados con un total de 15 frutos cada uno. En la parte inferior de la figura, se puede observar las tinciones de Ponceau que se realizaron de todas las membranas, aunque en este caso no sirvieron como control de carga ya que los niveles de proteína hacían que fuese indetectable. Todas las muestras fueron reveladas usando un kit de revelado ultrasensible (*ECL ULTRABRIGHT*, Agrisera) y utilizando el modo “Snow” en el imager LAS-3000 Fujifilm.

A modo de conclusión, podemos decir que la proteína FT está presente en todos los estadios de desarrollo del fruto. Además, la presencia de FT en exudados de fruto sugiere que podría estar desplazándose desde estos a otros tejidos.

#### 4.4. Generación de herramientas moleculares para el estudio del papel de FT durante el final de la floración

La acumulación de FT en frutos y su detección en los exudados de fruto sugieren la posibilidad de que FT pudiera funcionar como la propuesta señal derivada de las semillas que controlara el final de la floración. Para poder demostrar esta hipótesis decidimos desarrollar herramientas que nos permitiesen realizar una caracterización más detallada y concluyente del movimiento de la proteína de FT y su función durante el final de la floración. De este modo se diseñaron dos tipos de construcciones con las que transformar *A. thaliana*. Por un lado, se diseñó un sistema inducible por calor de dos componentes, y por otro, un sistema de dos componentes controlado por un promotor específico de

semilla (Moore et al., 1998) (Figura 10). Para realizar estas construcciones combinamos diferentes métodos de clonación como Golden Braid (GB) o GateWay (GW). Los promotores seleccionados fueron el promotor del gen *HSP18-2* inducible por calor (Figura 10A), y el promotor del gen *At2S3* específico de semilla (Figura 10B). Ambos promotores dirigen la expresión del factor quimérico LhG4 con capacidad de activar la transcripción de genes controlados por las secuencias que reconoce (pOp). En la misma construcción se colocaron bajo el control de LhG4 un cassette GW y un gen reportero (GUS).



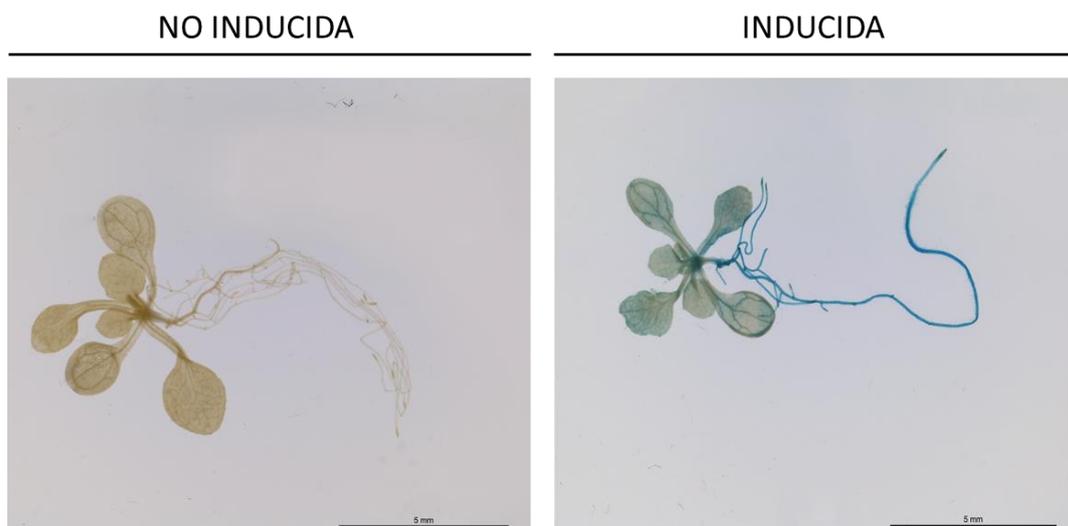
**Figura 10. Representación gráfica de las construcciones genéticas que se utilizarán en el presente trabajo.** **A.** Se representa el promotor de choque térmico (pHSP18) dirigiendo la expresión mediante el sistema LhG4/pOP del cassette Gate Way junto al gen marcador GUS y al terminador (Tnos). **B.** Se representa el promotor específico de semilla (pAT2S3) dirigiendo al expresión mediante el sistema LhG4/pOP del cassette Gate Way junto al gen marcador GUS y al temrinador (Tnos).

La utilización del cassette GW en la construcción nos permite intercambiar ese cassette por el gen que nos interese en cada caso. De esta manera generamos una herramienta que nos permitía inducir un factor de transcripción en el tejido y momento que deseáramos mediante la aplicación de calor o bien expresar el factor elegido en las semillas de forma constante y elevada. La presencia del marcador nos ayudaría a testar si realmente el sistema funciona como esperamos o si existen escapes.

Para finalizar las construcciones se clonaron los genes FT y TSF (a priori TSF no participa en el control del final de la floración, pero está considerado como un gen redundante con FT en el control de la transición floral). En esta ocasión, en lugar de clonar las CDS (región codificante) de los genes, decidimos clonar las regiones genómicas de cada uno, incluyendo las UTRs o sin ellas. Para poder determinar en un futuro si existen variantes de “splicing” u otros eventos dependientes de la traducción.

Debido a la limitación temporal del presente Trabajo de Fin de Máster, solo se pudo realizar un análisis preliminar de algunas de las líneas generadas de la progenie de las plantas transformadas (T1): la línea HSP18::FT<sub>UTR</sub> en fondo *ft-10* y HSP18::FT<sub>ATG</sub> en fondo *ft-10*. Para agilizar la selección de las plantas transgénicas, tras la selección en medio selectivo durante una semana, las plantas fueron sometidas a un tratamiento por calor de 30 minutos y posteriormente se trasladaron a macetas en el invernadero. La idea subyacente a este procedimiento fue que el choque térmico aplicado haría que se activase la expresión del transgén acelerando la transición y complementando el fenotipo del mutante *ft-10* (retraso de la floración). Después del tratamiento térmico, se seleccionaron algunas plántulas resistentes al azar para testar si realmente el tratamiento había funcionado, comprobándose su buen funcionamiento (Figura 11).

#### LÍNEA HSP18::LhG4 pOP::GW-GUS Tnos EN FONDO *ft-10*



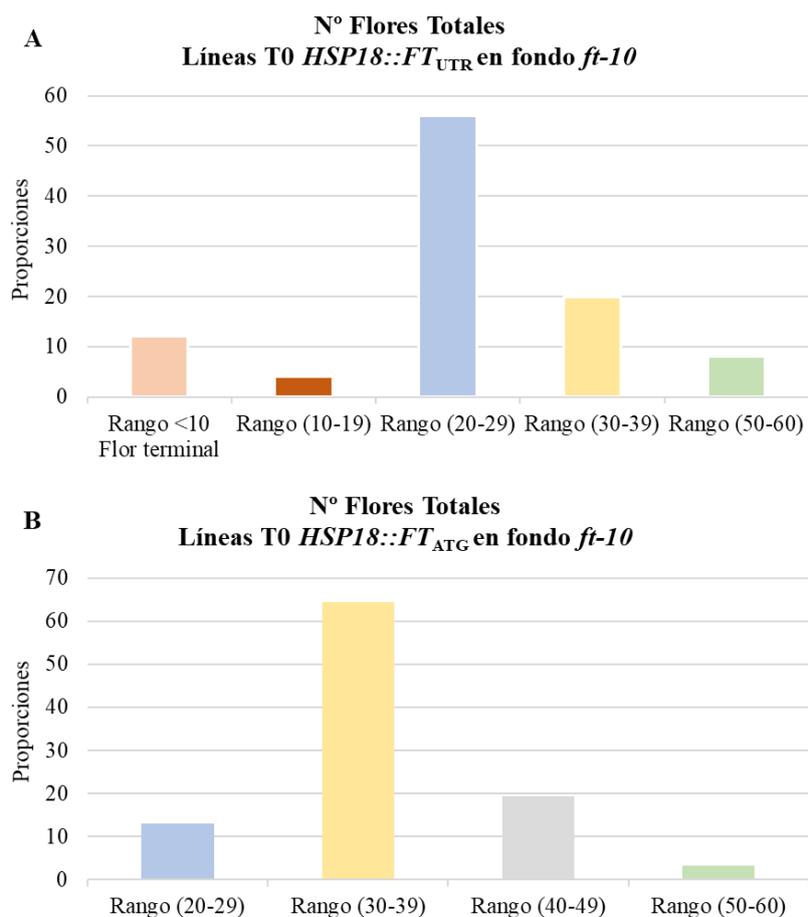
**Figura 11. Detección de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) en línea T0 de HSP18::LhG4 pOP::GW-GUS Tnos en fondo mutante *ft-10*.** Se observa como en la línea inducida no hay presencia de la coloración azul típica de la reacción de la  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) que se puede detectar en la línea inducida. La barra representa una escala de 5 mm. Las imágenes fueron tomadas mediante microscopia de bajo aumento.

Tras la selección de las plantas se realizó un seguimiento del tiempo en el que se producía la transición floral para comprobar el buen funcionamiento de la construcción y se realizó un conteo del número total de flores producidas en la inflorescencia principal. Prácticamente todas las plantas de las dos líneas tuvieron un fenotipo de adelanto de la floración respecto a su control, lo que indicaba de que la construcción funcionaba

correctamente. Tras el conteo de las flores/frutos producidos se establecieron unos rangos de producción de número de flores para dividir a las diferentes líneas transgénicas en categorías. Las categorías fueron: producción de flor terminal (plantas que no tuvieron una producción de más de 10 flores y que generaron una flor terminal) producción de 10-19 flores totales, producción de 20-29 flores, producción de 30-39 y producción de 40-49 flores y producción de 50-59 flores.

En las líneas de *ft-10 HSP18::FT<sub>UTR</sub>* observamos que un 8% de las plantas tuvieron fenotipo de adelanto de la floración y una producción de aproximadamente 50 flores, lo que se asemeja al control (mutante *ft-10* produce una media de 49-50 flores) (Figura 12A). A priori, bajo estas condiciones estas serían las plantas a seleccionar para realizar próximos estudios, puesto que florecen en un tiempo similar a plantas silvestres, pero muestran fenotipo *ft-10* al final de la floración. Sin embargo, la mayoría de las plantas (Figura 12A), un 52%, tuvieron una producción de unas 20-29 de flores (muy inferior respecto al control) o incluso un 12% se determinó una flor terminal (fenotipo similar a una sobreexpresión de *FT*) (Figura 12A). Estos resultados sugieren que tal vez, el tratamiento térmico aplicado fue excesivo, induciendo la acumulación elevada de *FT*. De forma indirecta los datos obtenidos indicarían que niveles altos de *FT* serían capaces de inducir el final de la floración, aunque para poder afirmarlo deberíamos cuantificar los niveles de expresión y proteína de *FT*.

En las líneas *ft-10 HSP18::FT<sub>ATG</sub>*, se observó un efecto similar al observado en *ft-10 HSP18::FT<sub>UTR</sub>* (Figura 12B). Todas las plantas analizadas mostraron adelanto del tiempo de floración, pero en esta ocasión, aproximadamente un 20% de las líneas (Figura 12B) tuvieron una producción similar al mutante *ft-10* (en torno a 49 flores). Además, el 65% produjo un número de flores no tan lejano al control (entre 30-39 flores) (Figura 12B). A pesar de la similitud en los resultados de ambas líneas producidas los datos obtenidos sugieren que la línea que incluye el gen *FT* con las UTRs (Figura 12A) podría presentar mayores niveles de expresión o acumulación de proteína, aunque aún se deben realizar más pruebas en esta línea.



**Figura 12. Proporciones de número de flores totales divididas por categorías en las líneas T0 de *HSP18::FT<sub>UTR/ATG</sub>* en el fondo mutante *ft-10*.** Una vez que las plantas finalizaron la etapa reproductiva, se procedió al conteo total del número de flores y se dividió en diferentes categorías en función al rango de flores producidas o a la producción de una flor terminal asociada a un fenotipo *p35S::FT*. **A.** Se representan las categorías de la producción de flores de las líneas T0 de *HSP18::FT<sub>UTR</sub>* en el fondo mutante *ft-10*. **B.** Se representan los diferentes rangos de producción de las líneas T0 de *HSP18::FT<sub>ATG</sub>* en el fondo mutante *ft-10*.

## 5. DISCUSIÓN

El estudio genético y molecular del final de la floración, así como de los factores que desencadenan el final de la floración ha sido un proceso olvidado en la biología de plantas a pesar de su gran interés y potencial agronómico y medioambiental. En la última década, el estudio de estos procesos ha tomado gran relevancia y se han comenzado a identificar factores que tienen una gran implicación en el final de la floración. Se ha descrito una ruta dependiente de la edad que estaría regulando dicho proceso. En esta ruta intervienen los miR156/miR172 regulando a FUL-AP2 (Balanzà et al., 2018; Martínez-Fernández et al., 2020). La ruta AP2-FUL controla de la actividad del meristemo a través de la regulación de *WUS*. (Balanzà et al., 2018; Martínez-Fernández et al., 2020; Wuest et al., 2016). Por otro lado, se ha propuesto la existencia de una(s) señal(es) móvil, aún desconocida, que se desplazaría desde la semilla regulando la actividad del meristemo inflorescente (Engvild, 1989; Leopold et al., 1959; Noodén et al., 2004; Wuest et al., 2016). A pesar de que en la última década se ha avanzado en el conocimiento de esta regulación, la regulación genética y molecular del final de la floración es un proceso aún por desentrañar.

En este trabajo hemos identificamos dos nuevos posibles reguladores del final de la floración: *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*. En nuestras condiciones, hemos observado como la producción de flores en el mutante *svp-32* disminuía en un 30% respecto a las plantas silvestre. El periodo de floración en ausencia de SVP se redujo unos 3 días respecto a las plantas silvestres. Estos resultados señalan a SVP como un regulador negativo en el final de la floración. Se ha descrito que SVP es un represor de la floración ya que, junto con FLC, reprime la expresión de FT y SOC1 (inductores de la floración) inhibiendo su acción (Jeong et al., 2007b; Li et al., 2008; Moon et al., 2003). SVP también es capaz de dimerizar con FUL modificando su actividad (Balanzà et al., 2014; Jang et al., 2009). De este modo, la ausencia de SVP podría estimular la expresión de FT (Capovilla et al., 2015; Tao et al., 2012), disparando la parada del meristemo. A su vez, la ausencia de SVP y el incremento de FT podrían disparar los niveles de FUL que podría estar más activo y promover el fin de la etapa reproductiva.

A diferencia de SVP, la ausencia de FT produjo un aumento de la producción de un 20% y retrasó el final de la floración 7 días, indicando que FT estaría actuando como un inductor del final de la floración. También se ha descrito que FT en el meristemo se une

al factor de transcripción FD (Abe et al., 2005; Tylewicz et al., 2015) y juntos son capaces de activar a FUL (Teper-Bamnolker & Samach, 2005). Esto explicaría que en ausencia de FT el fin de la etapa reproductiva se retrase debido a una menor activación de FUL por parte de FT/FD en el meristemo. Adicionalmente, FT es capaz de activar al miRNA172 y reprimir a genes de la familia AP2 (Mathieu et al., 2009; Yant et al., 2010). Con estas premisas, la ausencia de FT podría provocar una menor expresión de *FUL* y, además, una mayor expresión de *AP2*. Estos dos supuestos explicarían perfectamente la mayor producción de flores y el retraso en el final de la floración del mutante *ft-10*. De este modo, nuestros resultados parecen confirmar que la acción antagónica de FT y SVP en la transición floral se estaría manteniendo en el control del final de la etapa reproductiva.

Para confirmar estas relaciones recurrimos al análisis de la expresión génica en el meristemo, centrándonos en el mutante *ft-10*. Nuestros resultados confirman que en ausencia de FT la expresión de *FUL* en el meristemo se ve reducida, apoyando nuestra hipótesis. El descenso en los niveles de FUL podría justificar que el meristemo se mantuviese más tiempo activo en ausencia de FT. Sin embargo, *AP2* no varía su patrón de expresión. La regulación de *AP2* es muy compleja. *AP2* está regulado a nivel transcripcional por otros factores de transcripción como podría ser FUL. Además, presenta regulación postranscripcional a diferentes niveles mediada por la acción del miR172. El miR172 puede actuar sobre *AP2* de dos modos: por un lado, dirigiendo el corte del transcrito de *AP2* y por otro, impidiendo su traducción, aunque la relación entre ambos mecanismos aún no se conoce con exactitud (Aukerman & Sakai, 2003; Chen, 2004). Por último, *AP2* actúa sobre sí mismo reprimiendo su propia expresión (Yant et al., 2010). Interesantemente, FT activa indirectamente la expresión del miR172 (Mathieu et al., 2009; Song et al., 2013; Yant et al., 2010). De este modo, la ausencia de FT produciría una menor activación del miRNA172. En un escenario con menores niveles del miRNA172 esperaríamos mayores niveles de *AP2*, aunque estos no tendrían por qué ser a nivel de transcrito. En un supuesto donde la ausencia de miR172 produjera una mayor traducción y acumulación de la proteína *AP2*, su capacidad de auto-represión podría traducirse en bajos niveles de expresión. Esta implicación del miR172 en el control del final de la floración estaría de acuerdo con el modelo propuesto previamente por Balanzà et al. 2018., donde está considerado como un elemento de la ruta FUL-*AP2*. Por otro lado, tampoco podríamos descartar una desregulación mediada por el miR172 a nivel de otros miembros de la familia *AP2* (Eckert et al., 2005).

Un dato relevante que se puede deducir de este trabajo es la existencia de una relación directa entre la ausencia de semillas y la expresión de *FT* en el meristemo. En el mutante estéril se observó una fuerte disminución en la expresión de *FT* en el SAM (Figura 6). Curiosamente, a pesar de los bajísimos niveles del transcrito de *FT*, los niveles de *FUL* en el meristemo del mutante estéril no se vieron alterados. Esto podría explicarse si la escasa expresión de *FT* en el meristemo de *ams-1* fuera capaz de mantener la expresión de *FUL*. Otra posible explicación podría ser que los niveles de *FUL* en el meristemo se mantuvieran de un modo no autónomo, mediante la llegada de algún factor proveniente de otra parte de la planta.

Considerando posible la existencia de una(s) señal(es) que viajara desde el fruto hacia el meristemo para dirigir el final de la etapa reproductiva (Hensel et al., 1994; Wuest et al., 2016), *FT* podría considerarse un buen candidato, ya que nuestros resultados muestran su implicación en el control del final de la floración. Por otro lado, se ha descrito que *FT* es una proteína móvil que puede desplazarse de manera sistemática por la planta (Corbesier et al., 2007). De hecho, a pesar de los bajos niveles de expresión de *FT* en el SAM de plantas estériles, la acumulación de la proteína *FT* es comparable a la observado en el SAM de plantas silvestres, sugiriendo que la proteína detectada procediera de otros tejidos.

Nuestros resultados también muestran que la expresión de *FT* en Col-0 aumenta de manera evidente conforme las semillas se van desarrollando. Interesantemente, al analizar las bases de datos disponibles sobre expresión génica en *A. thaliana*, no se detecta expresión de *FT* en otros tejidos reproductivos salvo en los frutos y semillas, sugiriendo que la proteína detectada en el SAM de los mutantes estériles procediera de estos tejidos. A pesar de que los niveles de expresión de *FT* en frutos estériles son mayores en el estadio de anthesis y 2DPA respecto a las plantas silvestres, la mayor diferencia de expresión se observa en frutos de 5DPA. Esta diferencia en los niveles de expresión se traduce en estos tejidos en una clara diferencia en la acumulación de proteína, que de algún modo podría traducirse en una menor capacidad de translocación de la proteína. Apoyando el posible desplazamiento de la proteína *FT* hemos sido capaces de detectar la proteína en exudados de frutos 2DPA y 5DPA. Debido a las limitaciones de tiempo para realizar el trabajo no se han podido analizar exudados del mutante estéril, aunque se realizaran en un futuro próximo.

Otro dato interesante que se deduce de nuestro trabajo sería que la regulación de la ruta FUL-AP2 mediante FT parece ser diferente entre el SAM y las diferentes etapas de desarrollo del fruto. El efecto de FT sobre FUL parece no actuar durante el desarrollo del fruto. Una posible explicación sería que FD no está presente en fruto, por lo que FT no podría interactuar con éste para activar a *FUL*, por lo que su activación sería dependiente de otros factores. Por otro lado, la ausencia de FT durante el desarrollo del fruto dispara la expresión de *AP2*. De nuevo, la expresión del miRNA172 podría explicar la respuesta observada. De hecho, el miR172 se expresa de forma clara durante el desarrollo del fruto (Aukerman & Sakai, 2003; Song et al., 2013). Si en estos tejidos FT participara en la activación del miR172, en el mutante *ft-10*, existiría una menor represión de *AP2*.

Otro aspecto importante observado en este trabajo ha sido identificar dos variantes de la proteína FT. La presencia de esta proteína más pequeña se había descrito previamente estudiando tejido vegetativo (S. J. Kim et al., 2016). Los autores lo correlacionaron con una proteína FT que tenía una parte escindida considerándola como una especie de residuo. Sin embargo, nuestro estudio, incluyendo en el que hemos incluido tejidos reproductivos, indica que esta forma de menor tamaño es la única detectable durante esta etapa del desarrollo. Esto sugiere que la proteína FT que actúa en el tejido vegetativo podría ser diferente a la que actúa en el reproductivo. Interesantemente, se ha descrito que la expresión de *FT* es diferente entre tejido reproductivo y vegetativo. Durante el desarrollo vegetativo la expresión de FT está regulada por el reloj circadiano, ciclando en función del fotoperiodo (Suárez-López et al., 2001; Wigge et al., 2005), pero durante la etapa reproductiva la expresión de *FT* se vuelve constante y no está afectada por el fotoperiodo. La posible relación entre las dos formas de la proteína FT y la regulación de su expresión aún está por esclarecer.

A modo de perspectiva futura, quedaría pendiente por establecer y ajustar las líneas transgénicas generadas tanto con el promotor inducible por calor (pHSP18) como con el promotor de semilla (pAT2S3). Estas líneas nos facilitarían el seguimiento del movimiento de FT por toda la planta y también cuantificar de manera individual el efecto que tiene la expresión de *FT* desde las semillas. Con el uso del promotor inducible por calor podremos inducir de manera local la expresión de FT. De esta manera conoceremos el efecto en el final de la floración de FT en cada tejido y esclarecer el impacto que puede tener esto. Aún con la limitación de tiempo, ya se han observado algunas líneas

transgénicas de interés en las que el retraso de la floración que caracteriza al mutante *ft-10* se complementa con la inducción de *FT*, mientras que la inflorescencia principal produce un número de flores típico del mutante *ft-10*. Adicionalmente, quedaría complementar este estudio con análisis moleculares sobre el miRNA172 y otros genes de gran importancia como los de la familia *AP2* para conocer de forma más clara y directa el mecanismo de acción de FT en la regulación del final de la floración.

## 6. CONCLUSIONES

1. FT es un regulador positivo del final de la floración y SVP es un regulador negativo de esta, constituyendo dos nuevos elementos reguladores del final de la floración. Tienen una acción antagónica entre ellos que se asimila a la que tienen en el final de la floración.
2. FT es capaz de promover los niveles de *FUL* en el meristemo inflorescente correlacionándose con el retraso del final de la floración que se produce en ausencia de éste.
3. Existe un mecanismo de regulación diferente de la ruta *FUL-AP2* entre el meristemo y las flores/frutos.
4. FT podría formar parte de esas señales que están presentes en el fruto y que tienen una repercusión en el final de la floración.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., & Araki, T. (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5737), 1052–1056. <https://doi.org/10.1126/science.1115983>
- Amasino, R. (2009). Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biology*, *10*(7), 228. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-7-228>
- Araki, T. (2001). Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology*, *4*(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00137-0)
- Aukerman, M. J., & Sakai, H. (2003). Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *The Plant Cell*, *15*(11), 2730–2741. <https://doi.org/10.1105/TPC.016238>
- Balanà, V., Martínez-Fernández, I., & Ferrándiz, C. (2014). Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *Journal of Experimental Botany*, *65*(4), 1193–1203. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT482>
- Balanà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., & Ferrándiz, C. (2019). Inflorescence Meristem Fate Is Dependent on Seed Development and FRUITFULL in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1622. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01622/BIBTEX>
- Balanà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kaufmann, K., Angenent, G. C., Bemer, M., & Ferrándiz, C. (2018). Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nature Communications*, *9*(1), 565. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03067-5>
- Capovilla, G., Schmid, M., & Posé, D. (2015). Control of flowering by ambient temperature. *Journal of Experimental Botany*, *66*(1), 59–69. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru416>
- Chandler, J., Wilson, A., & Dean, C. (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *10*(4), 637–644. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.1996.10040637.X>
- Chen, X. (2004). A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5666), 2022–2025. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1088060>
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., & Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, *316*(5827), 1030–1033. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1141752/SUPPL\\_FILE/CORBESIER.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1141752/SUPPL_FILE/CORBESIER.SOM.PDF)
- Davies, P. J., & Gan, S. (2012). Towards an integrated view of monocarpic plant senescence. *Russian Journal of Plant Physiology*, *59*(4), 467–478. <https://doi.org/10.1134/S102144371204005X>
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biology*, *6*(13). <https://doi.org/10.1186/GB-2005-6-13-246>
- Engvild, K. C. (1989). The death hormone hypothesis. *Physiologia Plantarum*, *77*(2), 282–285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb04982.x>
- Fernández Aragón, C. (2014). Evolución de las estrategias vitales en plantas: desde Cole hasta la ecología de las especies invasoras. *Ecosistemas*, *23*(3), 6–12. <https://doi.org/10.7818/re.2014.23-3.00>

- Fornara, F., de Montaigu, A., & Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of Flowering in Arabidopsis. *Cell*, *141*(3), 550-550.e2. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.04.024>
- Gibson, S. I. (2000). Plant Sugar-Response Pathways. Part of a Complex Regulatory Web. *Plant Physiology*, *124*(4), 1532–1539. <https://doi.org/10.1104/PP.124.4.1532>
- Goetz, M., Rabinovich, M., & Smith, H. M. (2021). The role of auxin and sugar signaling in dominance inhibition of inflorescence growth by fruit load. *Plant Physiology*, *187*(3), 1189–1201. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAB237>
- Hensel, L. L., Nelson, M. A., Richmond, T. A., & Bleecker, A. B. (1994). The Fate of Inflorescence Meristems Is Controlled by Developing Fruits in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *106*(3), 863–876. <https://doi.org/10.1104/pp.106.3.863>
- Huang, Z., Shi, T., Zheng, B., Yumul, R. E., Liu, X., You, C., Gao, Z., Xiao, L., & Chen, X. (2017). APETALA2 antagonizes the transcriptional activity of AGAMOUS in regulating floral stem cells in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist*, *215*(3), 1197–1209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14151>
- Janes, K. A. (2015). An Analysis of Critical Factors for Quantitative Immunoblotting. *Science Signaling*, *8*(371), rs2. <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.2005966>
- Jang, S., Torti, S., & Coupland, G. (2009). Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *60*(4), 614–625. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2009.03986.X>
- Jeong, H. L., Seong, J. Y., Soo, H. P., Hwang, I., Jong, S. L., & Ji, H. A. (2007a). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes and Development*, *21*(4), 397–402. <https://doi.org/10.1101/gad.1518407>
- Jeong, H. L., Seong, J. Y., Soo, H. P., Hwang, I., Jong, S. L., & Ji, H. A. (2007b). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes & Development*, *21*(4), 397–402. <https://doi.org/10.1101/GAD.1518407>
- Jung, J. H., Seo, P. J., Kang, S. K., & Park, C. M. (2011). miR172 signals are incorporated into the miR156 signaling pathway at the SPL3/4/5 genes in Arabidopsis developmental transitions. *Plant Molecular Biology*, *76*(1–2), 35–45. <https://doi.org/10.1007/S11103-011-9759-Z/FIGURES/7>
- Kim, D.-H., & Sung, S. (2014). Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *12*, e0171. <https://doi.org/10.1199/TAB.0171>
- Kim, S. J., Hong, S. M. M., Yoo, S. J. J., Moon, S., Jung, H. S. S., & Ahn, J. H. H. (2016). Post-Translational Regulation of FLOWERING LOCUS T Protein in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *9*(2), 308–311. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.11.001>
- Kobayashi, Y., & Weigel, D. (2007). Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes & Development*, *21*(19), 2371–2384. <https://doi.org/10.1101/GAD.1589007>
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., & van der Veen, J. H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Molecular & General Genetics : MGG*, *229*(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>
- Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Park, O. K., Lee, J., & Ahn, J. H. (2006). Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of Constans 1. *Physiologia Plantarum*, *126*, 475–483. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00619.x>

- Leopold, A. C., Niedergang-Kamien, E., & Janick, J. (1959). Experimental Modification of Plant Senescence. *Plant Physiology*, *34*(5), 570–573. <https://doi.org/10.1104/pp.34.5.570>
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E., & Yu, H. (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, *15*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2008.05.002>
- Martínez-Fernández, I., Menezes de Moura, S., Alves-Ferreira, M., Ferrándiz, C., & Balanzà, V. (2020). Identification of Players Controlling Meristem Arrest Downstream of the FRUITFULL-APETALA2 Pathway. *Plant Physiology*, *184*(2), 945–959. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00800>
- Mathieu, J., Yant, L. J., Mürdter, F., Küttner, F., & Schmid, M. (2009). Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. *PLoS Biology*, *7*(7), e1000148. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000148>
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., & Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, *95*(6), 805–815. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81703-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81703-1)
- Merelo, P., González-Cuadra, I., & Ferrándiz, C. (2021). A cellular analysis of meristem activity at the end of flowering points to cytokinin as a major regulator of proliferative arrest in Arabidopsis. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.069>
- Michaels, S. D., & Amasino, R. M. (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGADA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, *13*(4), 935–941. <https://doi.org/10.1105/TPC.13.4.935>
- Miwa, H., Kinoshita, A., Fukuda, H., & Sawa, S. (2009). Plant meristems: CLAVATA3/ESR-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. *Journal of Plant Research*, *122*(1), 31–39. <https://doi.org/10.1007/s10265-008-0207-3>
- Moon, J., Suh, S. S., Lee, H., Choi, K. R., Hong, C. B., Paek, N. C., Kim, S. G., & Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *35*(5), 613–623. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2003.01833.X>
- Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., & Palme, K. (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(1), 376–381. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.1.376>
- Mouradov, A., Cremer, F., & Coupland, G. (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell*, *14* Suppl(Suppl). <https://doi.org/10.1105/TPC.001362>
- Noodén, L. D., Guiamét, J. J., & John, I. (2004). 15 - Whole Plant Senescence *Academic Press*, *25*(3) 227-244 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012520915-1/50018-7>
- Ohto, M., aki, Floyd, S. K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2009). Effects of APETALA2 on embryo, endosperm, and seed coat development determine seed size in Arabidopsis. *Sexual Plant Reproduction*, *22*(4), 277–289. <https://doi.org/10.1007/S00497-009-0116-1>
- Poethig, R. S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, *250*(4983), 923–930. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.923>
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., & Lohmann, J. U. (2005). A gene expression map of Arabidopsis thaliana

- development. *Nature Genetics*, *37*(5), 501–506. <https://doi.org/10.1038/NG1543>
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K. F. X., Jürgens, G., & 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*(6), 635–644. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80700-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80700-X)
- Simpson, G. G., & Dean, C. (2002). Arabidopsis, the Rosetta stone of flowering time? *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5566), 285–289. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.296.5566.285>
- Sinclair, T. R., & De Wit, C. T. (1975). Photosynthate and nitrogen requirements for seed production by various crops. *Science (New York, N.Y.)*, *189*(4202), 565–567. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.189.4202.565>
- Song, Y. H., Ito, S., & Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends in Plant Science*, *18*(10), 575–583. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2013.05.003>
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, *410*(6832), 1116–1120. <https://doi.org/10.1038/35074138>
- Tao, Z., Shen, L., Liu, C., Liu, L., Yan, Y., & Yu, H. (2012). Genome-wide identification of SOC1 and SVP targets during the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *70*(4), 549–561. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.04919.X>
- Teper-Bamnolker, P., & Samach, A. (2005). The flowering integrator FT regulates SEPALLATA3 and FRUITFULL accumulation in Arabidopsis leaves. *Plant Cell*, *17*(10), 2661–2675. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.035766>
- Tian, C., Zhang, X., He, J., Yu, H., Wang, Y., Shi, B., Han, Y., Wang, G., Feng, X., Zhang, C., Wang, J., Qi, J., Yu, R., & Jiao, Y. (2014). An organ boundary-enriched gene regulatory network uncovers regulatory hierarchies underlying axillary meristem initiation. *Molecular Systems Biology*, *10*(10), 755. <https://doi.org/10.15252/MSB.20145470>
- Tylewicz, S., Tsuji, H., Miskolczi, P., Petterle, A., Azeez, A., Jonsson, K., Shimamoto, K., & Bhalerao, R. P. (2015). Dual role of tree florigen activation complex component FD in photoperiodic growth control and adaptive response pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(10), 3140–3145. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1423440112/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Wang, J.-W., Czech, B., & Weigel, D. (2009). miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell*, *138*(4), 738–749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.014>
- Wang, Y., Kumaishi, K., Suzuki, T., Ichihashi, Y., Yamaguchi, N., Shirakawa, M., & Ito, T. (2020). Morphological and Physiological Framework Underlying Plant Longevity in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1693. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.600726/BIBTEX>
- Ware, A., Walker, C. H., Šimura, J., González-Suárez, P., Ljung, K., Bishopp, A., Wilson, Z. A., & Bennett, T. (2020). Auxin export from proximal fruits drives arrest in temporally competent inflorescences. *Nature Plants*, *6*(6), 699–707. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0661-z>
- Wigge, P. A. (2011). FT, A Mobile Developmental Signal in Plants. *Current Biology*, *21*(9), 374–378. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2011.03.038>
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in

- Arabidopsis. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5737), 1056–1059. <https://doi.org/10.1126/science.1114358>
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. *Cell*, 138(4), 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>
- Wuest, S. E., Philipp, M. A., Guthörl, D., Schmid, B., & Grossniklaus, U. (2016). Seed Production Affects Maternal Growth and Senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 171(1), 392–404. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01995>
- Würschum, T., Groß-Hardt, R., & Laux, T. (2006). APETALA2 Regulates the Stem Cell Niche in the Arabidopsis Shoot Meristem. *The Plant Cell*, 18(2), 295–307. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.038398>
- Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., & Reddy, G. V. (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4941–4946. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900843106>
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., & Schmid, M. (2010). Orchestration of the Floral Transition and Floral Development in Arabidopsis by the Bifunctional Transcription Factor APETALA2. *The Plant Cell*, 22(7), 2156–2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>
- Yoo, S. K., Chung, K. S., Kim, J., Lee, J. H., Hong, S. M., Yoo, S. J., Yoo, S. Y., Lee, J. S., & Ahn, J. H. (2005). CONSTANS activates SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 through FLOWERING LOCUS T to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(2), 770–778. <https://doi.org/10.1104/pp.105.066928>
- Zhao, L., Kim, Y., Dinh, T. T., & Chen, X. (2007). miR172 regulates stem cell fate and defines the inner boundary of APETALA3 and PISTILLATA expression domain in Arabidopsis floral meristems. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 51(5), 840–849. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2007.03181.X>