

Estudio del posible papel de la
señalización del ABA mediando el
control de la floración y la
inflorescencia por *TERMINAL
FLOWER 1*.



Iván Pastor Martínez

Tutor:

Francisco Madueño Albi

Directora experimental:

Ana Berbel Tornero

Febrero 2022

AGRADECIMIENTOS

Hace dos años que empecé mi andanza por el IBMCP y ahora le pongo un punto, pero un punto y seguido. Empecé hace dos años el máster, en mitad de una pandemia, con todo lo que ello supone y puedo decir que han sido de los mejores años que he vivido. Todo lo que he conseguido y donde he llegado no habría sido posible sin todas las personas que me han acompañado en este camino y las cuales quiero dar las gracias por ello.

En primer lugar, a Paco por haber depositado en mí una confianza plena desde el principio. Por tus palabras de ánimo. Se nota que en torno a ti crece el laboratorio 1.07 y, al conocerte, se entiende muy bien el porqué del buen ambiente en el laboratorio y como es una pequeña gran familia.

Como no, a la persona con las que más horas he pasado en estos dos años, Ana. Me has enseñado a amar la ciencia tanto como lo haces tú, a no rendirme nunca frente a los mil problemas que hemos tenido, desde muestras perfectas que han desaparecido hasta construcciones que no han salido hasta el último día, nuestros pequeños *poltergeist*. Pero no solo me has enseñado ciencia, has contribuido en mi vida más de lo que crees. Consejos de vida que me dabas cada vez que llegaba con algún problema y un cariño inmenso con el que me he sentido como en casa cada vez que hablaba contigo. Me llevo todo eso conmigo y, como no, algo de tus pequeñas manías para que absolutamente nada se contaminara. Creo que todos los que hemos tenido el privilegio de trabajar contigo entendemos lo que digo.

¿Qué sería del laboratorio sin Majo? No solo se te echa en falta porque cuando no estás el laboratorio es un pequeño caos, sino también por la compañía. Nunca has dudado en ofrecerme ayuda cuando me has visto apurado sin ni siquiera pedirlo. Creo que este TFM también te pertenece un poco a ti, porque sin todos los consejos y cosillas que te he ido “pidiendo prestadas” no hubiera sido posible.

También, al resto de compañeros del laboratorio 1.07, Jesús, Francisca, Rick, gracias por haberme ayudado en todo lo que he necesitado tanto a nivel científico como personal. Y, como no, al laboratorio 1.09 donde también he conocido a gente maravillosa que nunca olvidaré.

Como no, gracias a mis compañeros del máster con los que he vivido experiencias inolvidables... Desde fiestas y festivales con más de uno perdido, hasta rutas por los Pirineos con coches que no arrancaban. A toda la gente que he conocido estos dos años y que nunca olvidaré... Unas amistades que me llevo para toda la vida. Uno no se enamora de una ciudad por sus calles, plazas o monumentos, se enamora por todas las experiencias vividas junto a la gente que quiere.

Finalmente, a mi familia, mis padres y mis hermanos. Por haber apostado por mí en todo momento. Por confiar más en mí de lo que yo mismo confiaba. Sin vosotros a mi lado no habría llegado donde he llegado. Gracias por todo.

Acabo mi etapa en Valencia con este TFM, dejando atrás a un Iván inseguro que tenía miedo de pisar un laboratorio y saludo a un nuevo Iván que ha encontrado en la ciencia su pasión. Aunque suene repetitivo, muchas gracias a todas las personas que he conocido en todo este tiempo, este TFM os pertenece de alguna forma. Gracias.

Iván

RESUMEN

Las plantas han adoptado un desarrollo post-embriionario en el que a partir de los meristemos apicales que se forman durante la embriogénesis surgen el resto de las estructuras que formarán la planta adulta. Uno de estos meristemos es el meristemo apical del tallo (SAM, Shoot Apical Meristem en inglés) compuesto por células madre que pueden diferenciarse en células que den lugar al tallo o a meristemos secundarios.

Arabidopsis thaliana sufre dos etapas tras la germinación, en primer lugar, una vegetativa en la que el meristemo genera hojas y una fase reproductiva en la que el meristemo es capaz de formar flores. Este paso de fase vegetativa a fase reproductiva se conoce como transición floral.

El SAM adquiere una identidad indeterminada durante la transición floral para entrar a la fase de desarrollo. Este cambio del SAM está regulado por un complejo circuito de rutas genéticas que perciben y responden a diversos estímulos ambientales (fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, disponibilidad de nutrientes) y endógenos (edad, el estado hormonal, niveles de sacarosa). Entre los genes que regulan la floración se encuentran *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* que forman parte de la familia de las proteínas PEBPs pero que tienen funciones opuestas. Mientras que *FT* promueve la floración, *TFL1* la reprime.

En experimentos previos de ChIP-seq de TFL1 realizados en nuestro laboratorio se encontraron genes diana que juegan un papel en la señalización del ácido abscísico (ABA). El papel del ABA en la floración no es desconocido, pero existe controversia ya que se observa tanto un papel positivo como uno negativo.

Debido a las preguntas que esto genera, en este Trabajo de Fin de Master se ha intentado ahondar en la conexión entre TFL1 y el ABA. Para ello, se ha estudiado el papel de *ANAC102*, *HAI1* y *MYB3*, genes reguladores de la señalización del ABA, en la floración y su posible papel con TFL1. Para ello se ha analizado el patrón de expresión de estos genes, así como se han caracterizado, a nivel de procesos regulados por TFL1, el fenotipo de mutantes de pérdida de función y de sobreexpresión de estos genes. Además, se ha profundizado más en el papel conjunto de TFL1 y GBF3 en la floración estudiando la posible interacción proteína-proteína y caracterizando el doble mutante *tfl1-1 gbf3* y la sobreexpresión de *GBF3* en Col-0 y *tfl1-1* en cuanto al fenotipo asociado a la transición floral.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. FLORACIÓN Y ARQUITECTURA DE LA PLANTA.....	1
2. CONTROL GENÉTICO DE LA FLORACIÓN.....	4
3. EL PAPEL DE <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i> Y <i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> EN LA FLORACIÓN	6
4. RELACIÓN ENTRE EL ÁCIDO ABCSCÍICO (ABA) Y EL MODO DE ACCIÓN DE TFL1	10
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. MATERIAL BIOLÓGICO	17
1.1. Material vegetal.....	17
1.1.1. Líneas mutantes de Arabidopsis	17
1.1.2. Líneas transgénicas de Arabidopsis	18
1.1.3. Cultivo de Arabidopsis en el invernadero	18
1.1.4. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i>	18
1.1.5. Fertilización cruzada en Arabidopsis.....	19
1.1.6. Conservación de semillas de Arabidopsis	19
1.1.7. Cultivo de <i>N. benthamiana</i> en invernadero.....	19
1.2. Material bacteriano	20
1.2.1. Cultivo de bacterias <i>in vitro</i>	20
1.2.2. Conservación de los microorganismos en glicerol.....	20
2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	21
2.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	21
2.1.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	21
2.1.2. Extracción de ADN plasmídico de <i>A. tumefaciens</i>	21
2.1.3. Extracción de ADN genómico de Arabidopsis	21
2.1.4. Extracción de ARN total de Arabidopsis.....	22
2.2. Manipulación de ácidos nucleicos	22
2.2.1. Síntesis de cDNA.....	22
2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
2.2.3. Purificación de fragmentos de ADN.....	23
2.2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción	24
2.2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	24
2.3. Técnicas de clonación	24
2.3.1. Vectores plasmídicos utilizados	24
2.3.2. Construcciones plasmídicas utilizadas	25
2.3.3. Obtención de construcciones.....	28
2.3.3.1. Sistema de clonación basado en la tecnología <i>Gateway</i>	28
2.3.3.2. Sistema de clonación basado en la tecnología <i>In-Phusion</i>	28
2.3.3.3. Sistema de clonación <i>Golden Gate</i>	29
2.4. Secuenciación	29
2.5. Estudios de expresión	30
2.5.1. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	30
2.6. Transformación de cepas bacterianas	30

2.7. Transformación genética de plantas	31
2.7.1. Transformación de <i>Arabidopsis</i>	31
2.7.1.1. Transformación genética mediante inmersión floral	31
2.7.1.2. Selección de plantas transgénicas	31
2.7.2. Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	31
2.7.2.1. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)	32
2.7.2.2. Ensayo de localización subcelular.....	32
3. GENERACIÓN Y GENOTIPADO DE LÍNEAS MUTANTES <i>GBF1GBF2</i> MEDIANTE EL SISTEMA CRISPR/CAS9	33
4. ENSAYOS DE SOBREENPRESIÓN EN ARABIDOPSIS.....	33
5. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS PLANTAS MUTANTES Y LÍNEAS TRANSGÉNICAS.....	34
5.1. Fotografía a bajo aumento	34
5.2. Técnicas de microscopía	34
5.2.1. Microscopía confocal	34
5.3. Caracterización del tiempo de floración.....	34
6. TRATAMIENTOS CON ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)	35
7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	35
7.1. Análisis de secuencias obtenidas por secuenciación Sanger	35
7.2. Análisis de las secuencias de la comparación de los ChIP-seq	36
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	37
RESULTADOS	38
1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 (ANAC102)</i>	38
1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>ANAC102</i>	38
1.1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>ANAC102</i> en bases de datos de transcriptoma.....	38
1.1.2. Análisis del patrón de expresión de <i>ANAC102</i> mediante RT-qPCR.....	39
1.1.2.1. Patrón de expresión de <i>ANAC102</i> en diferentes tejidos	39
1.1.2.2. Patrón de expresión de <i>ANAC102</i> en el ápice del tallo durante distintas fases del desarrollo	40
1.2. Identificación y caracterización fenotípica del mutante <i>anac102</i>	41
1.2.1. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante <i>anac102</i>	42
2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>HIGHLY ABA-INDUCED1 (HAI1)</i>	44
2.1. Análisis del patrón de expresión de <i>HAI1</i>	44
2.1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>HAI1</i> en bases de datos de transcriptoma.....	44
2.1.2. Análisis del patrón de expresión de <i>HAI1</i> mediante RT-qPCR	44
2.1.2.1. Patrón de expresión de <i>HAI1</i> en diferentes tejidos.....	44
2.1.2.2. Patrón de expresión de <i>HAI1</i> en el ápice del tallo durante distintas fases del desarrollo	45
2.2. Identificación y caracterización fenotípica de los mutantes <i>hai1-1</i> , <i>hai1-2</i> y el triple mutante <i>hai1-2aip1-1hai3-1</i>	48
2.3. Generación de líneas de sobreexpresión de <i>HAI1</i> en <i>Arabidopsis</i>	50
3. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>MYB DOMAIN PROTEIN 3 (MYB3)</i>	51

3.1. Análisis del patrón de expresión de <i>MYB3</i>	51
3.1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>MYB3</i> en bases de datos de transcriptoma.....	51
3.1.2. Análisis del patrón de expresión de <i>MYB3</i> mediante RT-qPCR.....	52
3.1.2.1. Patrón de expresión de <i>MYB3</i> en diferentes tejidos.....	52
3.1.2.2. Patrón de expresión de <i>MYB3</i> en el ápice del tallo	54
durante distintas fases del desarrollo	
3.2. Identificación y caracterización fenotípica del mutante <i>myb3</i>	55
3.2.1. Tratamiento con ABA del mutante <i>myb3</i>	56
3.3. Generación de líneas de sobreexpresión de <i>MYB3</i> en <i>Arabidopsis</i>	57
4. ESTUDIO DE GBF3 COMO MEDIADOR DE LA FUNCIÓN DE TFL1	60
4.1. Obtención de mutantes triples <i>gbf1 gbf2 gbf3</i> por CRISPR-Cas9.....	60
4.2. Genes diana de TFL1 y GBF3	63
4.3. Análisis de la localización subcelular de GBF3 y TFL1	67
4.4. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)	68
entre TFL1 y GBF3.	
4.5. Análisis de la interacción genética entre TFL1 y GBF3 mediante la caracterización del doble mutante <i>gbf3 tf1-1</i>	72
4.6. Efecto de la mutación <i>tf1-1</i> sobre la actividad de <i>GBF3</i> en el tiempo de floración	73
DISCUSIÓN	75
1. <i>NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 (ANAC102)</i>	75
2. <i>HIGHLY ABA-INDUCED1 (HAI1)</i>	77
3. <i>MYB DOMAIN PROTEIN 3 (MYB3)</i>	78
4. Estudio de GBF3 como mediador de la función de TFL1	79
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83
ANEXO.....	99

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Desarrollo post-embriionario.....	1
Figura 2. Fases del desarrollo en <i>Arabidopsis</i>	3
Figura 3. Integración de las rutas genéticas que controlan la floración en <i>Arabidopsis</i>	6
Figura 4. Patrón de expresión de TFL1 en <i>Arabidopsis</i>	8
Figura 5. Patrón de expresión de TFL1 en <i>Arabidopsis</i>	9
Figura 6. Ruta de señalización por ABA.	12
Figura 7. Señalización del ácido abscísico y regulación de la floración.	13

Figura 8. Patrón de expresión y fenotipos asociados a GBF3.....	14
RESULTADOS	
Figura 9. Patrón de expresión de <i>ANAC102</i> en Arabidopsis.....	38
Figura 10. Patrón de expresión de <i>ANAC102</i> en Arabidopsis.....	39
Figura 11. Expresión relativa de <i>ANAC102</i> en diferentes tejidos.....	40
Figura 12. Expresión relativa de <i>ANAC102</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante <i>tfl1-1</i>	41
Figura 13. Esquema del gen <i>ANAC102</i> mostrando la posición del T-DNA en la línea SALK_030702C.....	42
Figura 14. Fenotipo asociado al mutante <i>anac102</i>	43
Figura 15. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante <i>anac102</i>	44
Figura 16. Patrón de expresión de <i>HAI1</i> en Arabidopsis.....	45
Figura 17. Patrón de expresión de <i>HAI1</i> en Arabidopsis.....	46
Figura 18. Expresión relativa de <i>HAI1</i> en diferentes tejidos.....	47
Figura 19. Expresión relativa de <i>HAI1</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante <i>tfl1-1</i>	48
Figura 20. Esquema del gen <i>HAI1, AIP1, HAI3</i> mostrando la posición del T-DNA.....	48
Figura 21. Fenotipo asociado a los mutantes <i>hai1-1, hai1-2</i> y <i>hai1-2aip1-1hai3-1</i>	50
Figura 22. Fenotipo asociado a la sobreexpresión de <i>HAI1</i>	51
Figura 23. Patrón de expresión de <i>MYB3</i> en Arabidopsis.....	52
Figura 24. Patrón de expresión de <i>MYB3</i> en Arabidopsis.....	53
Figura 25. Expresión relativa de <i>MYB3</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante <i>tfl1-1</i>	54
Figura 26. Esquema del gen <i>MYB3</i> mostrando la posición del T-DNA en la línea GK-815G05.....	55
Figura 27. Fenotipo asociado al mutante <i>myb3</i>	56
Figura 28. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante <i>myb3</i>	57
Figura 29. Fenotipo asociado a la sobreexpresión de <i>MYB3</i>	58
Figura 30. Árbol filogenético de bZIPs que componen el grupo G.....	61
Figura 31. Esquema de las guías de sgRNA diseñadas para CRISPR-Cas9.....	62
Figura 32. Resultados del genotipado de las plantas T1 modificadas por CRISPR-Cas9 en fondo Col-0.....	64
Figura 33. Resultados del genotipado de las plantas T1 modificadas por CRISPR-Cas9 en fondo <i>gbf3</i>	65

Figura 34. Genes diana comunes de TFL1 y GBF3 con los términos de Ontología Genética asociados.....	66
Figura 35. Esquema de las construcciones para ensayo de localización subcelular en <i>N. benthamiana</i>	67
Figura 36. Localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-TFL1 y GFP-GBF3.	69
Figura 37. Esquema de las construcciones para ensayo de BiFC en <i>N. benthamiana</i>	70
Figura 38. Análisis de interacción proteína-proteína entre TFL1 y GBF3 mediante ensayos de BiFC.....	71
Figura 39. Fenotipo asociado a los presuntos dobles mutantes <i>tfl1-1gbf3</i>	73
Figura 40. Fenotipos asociados a la sobreexpresión de <i>GBF3</i> en fondo Col-0 y <i>tfl1-1</i>	74

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Genes diana de TFL1 identificados por ChIP-Seq y que tienen relación con la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) (Goretti <i>et al.</i> , 2020).	11
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Líneas mutantes de Arabidopsis utilizadas.	17
Tabla 3. Líneas transgénicas utilizadas.	18
Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas.	20
Tabla 5. Antibióticos con los que se suplementó el medio LB para la selección bacteriana.	20
Tabla 6. Condiciones utilizadas para la amplificación de ADN por PCR. Se muestran las mezclas de reacción estándar.....	23
Tabla 7. Condiciones generales utilizadas para la amplificación de ADN por PCR.	23
Tabla 8. Vectores plasmídicos utilizados.	24
Tabla 9. Construcciones plasmídicas utilizadas.	25
Tabla 10. Guías de ARN diseñadas para dirigir la Cas-9 a los loci <i>GBF1</i> y <i>GBF2</i>	33
Tabla 11. Programas utilizados para el análisis de secuencias obtenidas por Sanger.....	35
Tabla 12. Programas utilizados para el análisis de las secuencias obtenidas de los ChIP-seq.	36

RESULTADOS

Tabla 13. Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal en plantas T1 Col-0 35S:: <i>GBF3</i> o plantas T1 <i>tfl1-1</i> 35S:: <i>GBF3</i> , con y sin fenotipo de floración tardía.	74
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ABREVIATURAS

< : menor que	F1 : generación filial 1	RT-PCR : PCR con transcripción inversa
°C : grados Celsius	F2 : generación filial 2	RT-qPCR : PCR cuantitativa en tiempo real
% : porcentaje	F3 : generación filiar 3	Rv : reverso
μ : micro	Fw : directo	RNA-seq : secuenciación del ARN
aa : aminoácidos	g : gramos	rpm : revoluciones por minuto
ADN : ácido desoxiribonucleico	GFP : Proteína Verde Fluorescente	SAM : Meristemo Apical del Tallo
ARN : ácido ribonucleico	gRNA : guía ARN CRISPR-Cas9	SD : Día corto
At : <i>Arabidopsis thaliana</i>	h : horas	sgRNA : guía única de ARN para CRISPR-Cas9
ATG : inicio de la traducción (Adenina, Timina, Guanina)	kb : kilobase	T^º : temperatura
BiFC : Complementación Bimolecular de la Fluorescencia	KDa : KiloDaltons	T0 : generación transgénica 0
bp : pares de bases	L : litro	T1 : generación transgénica 1
cDNA : ADN complementario	LB : Caldo de Lisogenia	T2 : generación transgénica 2
CDS : secuencia codificante	LD : Día largo	TAIR : The Arabidopsis Information Resource
ChIP-seq : Co-inmunoprecipitación de la cromatina	m : mili	T-DNA : ADN de transferencia
cm : centímetros	M : molar	Tm : temperatura de hibridación
Col-0 : ecotipo Columbia-0 <i>Arabidopsis thaliana</i>	Mb : megabase	U : unidades
CRISPR-Cas9 : repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interesparadas – CRISPR-asociado 9	miRNA : micro ARN	UTR : región no traducida
C-term : C-terminal	mQ : mili Q	UV : ultravioleta
ddH2O : agua doblemente destilada	mRNA : ARN mensajero	V : volumen
et al. : <i>et alia</i> , y otros	MS : Medio Murashige & Skoog	v : voltios
F0 : generación filial 0	n : nano	V/V : volumen/volumen
	N-term : N-terminal	x : multiplicado por
	O/N : toda la noche	YFP : Proteína amarilla fluorescente
	PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa	
	pro : promotor	
	RFP : Proteína roja fluorescente	

INTRODUCCIÓN

FLORACIÓN Y ARQUITECTURA DE LA PLANTA

Durante su evolución, las plantas han adquirido principalmente un desarrollo post-embriionario. Durante la embriogénesis el plan corporal básico de la planta adulta queda establecido con la formación a lo largo del eje apical-basal, de los meristemos del tallo y de la raíz, los cotiledones, el hipocotilo y la radícula y, con la formación a lo largo del eje radial, de una disposición concéntrica de la epidermis, el tejido conectivo y el cilindro vascular central (Laux *et al.*, 2004). Todas las estructuras de la planta adulta derivan de la actividad de los meristemos apicales formados durante la embriogénesis, que son pequeños grupos de células madre totipotentes que determinan los patrones de crecimiento de las plantas y en consecuencia su arquitectura (Figura 1; Bowman, 1994; Wolpert *et al.*, 1998).

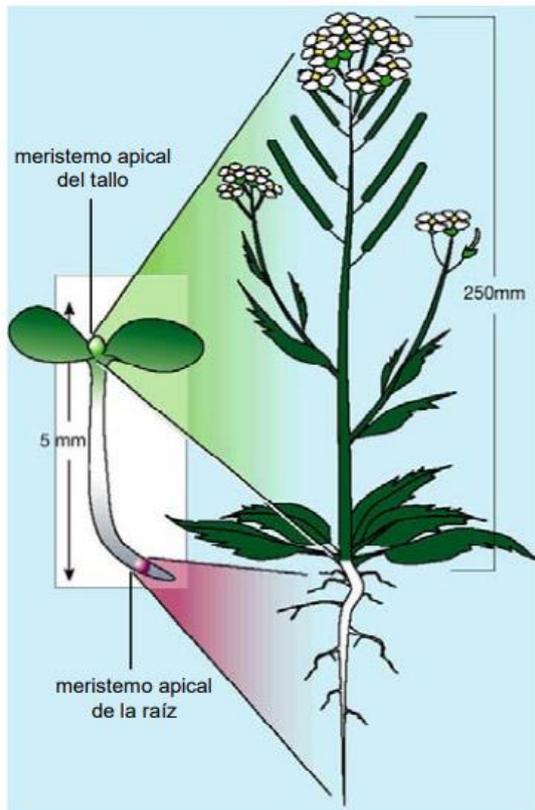


Figura 1. Desarrollo post-embriionario. Tras la germinación, la plántula presenta una estructura básica que será la planta adulta. A partir del meristemo apical del tallo y apical de la raíz se desarrollará esta estructura, establecidos durante la embriogénesis. Las escalas son aproximadas (Figura tomada de Serrano-Mislata, A, 2010).

El meristemo de la parte aérea es el meristemo apical del tallo (SAM, Shoot Apical Meristem en inglés). Las células madre están confinadas en el centro del meristemo del tallo. Se dividen lentamente dando lugar a dos tipos de células hijas. Las células que se quedan en el centro permanecen como células madre, mientras que las células hijas que son desplazadas hacia la periferia del meristemo entran en una vía de desarrollo que conduce a su diferenciación en células específicas de tallo u órganos específicos tales como hojas, o la iniciación de meristemos secundarios (Weigel y Jürgens, 2002).

INTRODUCCIÓN

Arabidopsis thaliana es una especie dicotiledónea que pertenece a la familia de las Brassicas (Brassicaceae) y se considera un sistema modelo ideal para el estudio de la biología vegetal, por tratarse de una planta herbácea autógama, de pequeño tamaño, corto ciclo de vida y de gran descendencia (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994). Tras la germinación, las plantas pasan primero por una etapa vegetativa juvenil en la que no son capaces de producir flores. Durante esta etapa, las hojas se generan de manera opuesta, con forma redondeada y sin tricomas en el envés. Posteriormente, sufren una transición hacia una etapa vegetativa adulta que se caracteriza por la generación de hojas en espiral, siendo estas más grandes, alargadas y con tricomas en haz y envés (Fouracre y Poethig, 2019; Reinhardt y Kuhlemeier, 2002). Debido a que durante estas dos etapas no hay elongación de los entrenudos entre las hojas que se van generando en los flancos del meristemo apical, se genera una estructura llamada roseta (Bowman, 1994; Irish, 2010). Únicamente cuando la planta ha alcanzado la fase vegetativa adulta y, si se dan las condiciones apropiadas, la planta puede florecer y entrar en la fase reproductiva de desarrollo. El cambio a la fase reproductiva se conoce como transición floral y el momento en el que ésta tiene lugar está regulado por factores ambientales y endógenos (Bäurle y Dean, 2006; Fornara y Coupland, 2009).

Durante el desarrollo reproductivo de *Arabidopsis* se genera la inflorescencia, que es la parte de la planta que contiene las flores (Coen y Nugent, 1994; Weberling, 1989). La arquitectura de la inflorescencia viene determinada por el patrón de ramificación y por el tamaño, forma y posición de las flores y de las hojas (Benlloch *et al.*, 2007; Reinhardt y Kuhlemeier, 2002). En *Arabidopsis* se pueden distinguir dos fases durante el desarrollo reproductivo: la fase de inflorescencia temprana y la fase de inflorescencia tardía. La primera se caracteriza por la generación de hojas caulinares por parte del SAM, que tras la transición floral adquiere la identidad de meristemo inflorescente. En las axilas de la inflorescencia temprana se inician nuevos meristemas inflorescentes, mientras que, en la fase de inflorescencia tardía, el meristemo da lugar a flores sin hoja caulinar. Seguidamente tiene lugar el “*bolting*”, proceso mediante el cual comienza un elongación de los entrenudos, permitiendo así la separación de las hojas caulinares con respecto a las vegetativas que permanecen en la base del tallo formando la roseta (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994). Finalmente, una vez se ha formado la inflorescencia principal, tiene lugar la generación de inflorescencias secundarias a partir de las axilas de las hojas de roseta, del mismo modo que tiene lugar la aparición de inflorescencias que surgen de las axilas de las hojas caulinares o coflorescencias (Álvarez *et al.*, 1992 (**Figura 2**)).

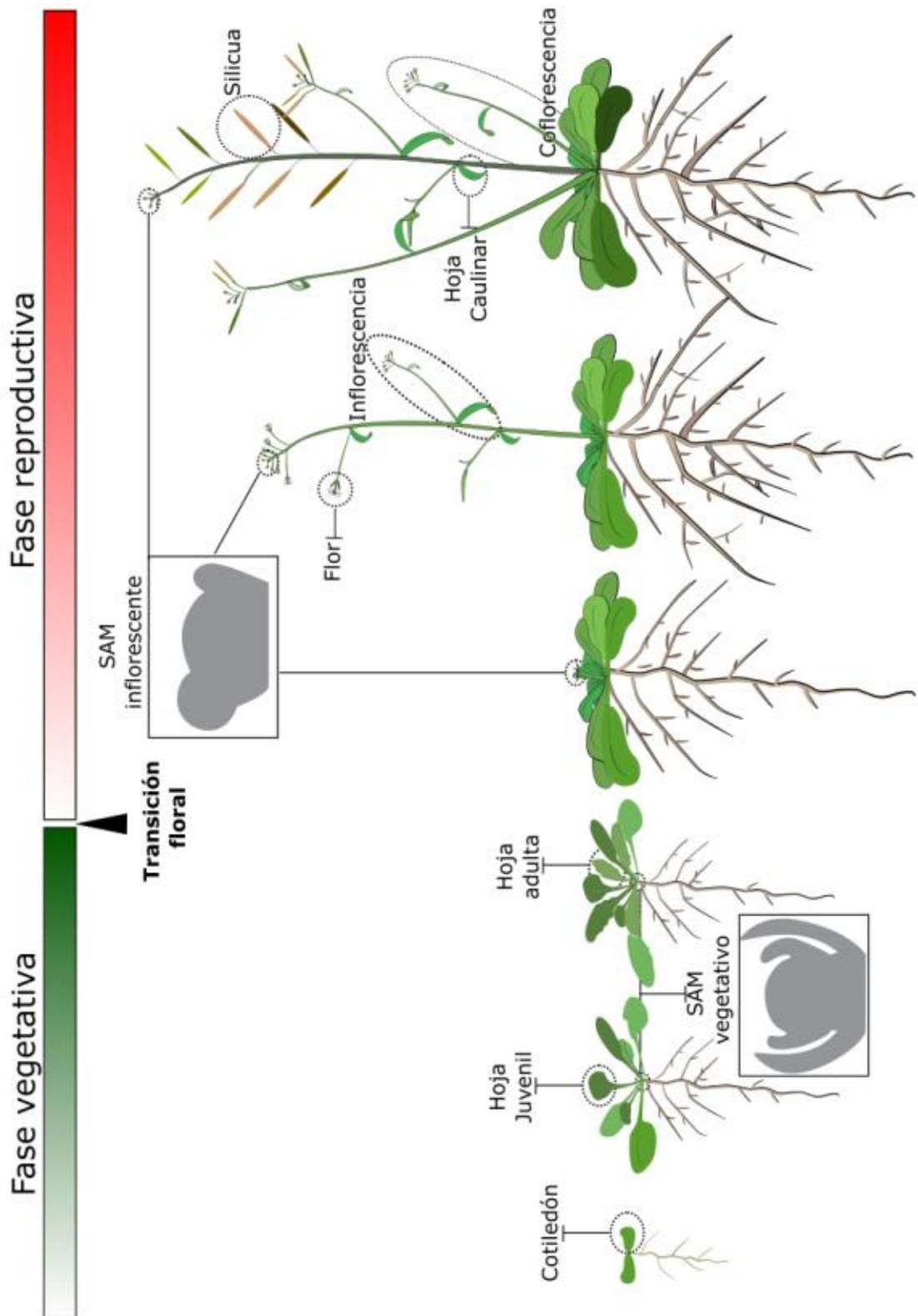


Figura 2. Fases del desarrollo en Arabidopsis. Tras la germinación, Arabidopsis comienza una fase de crecimiento vegetativo juvenil caracterizada por la formación de hojas redondeadas, con tricomas en la cara adaxial; tras pasar a la fase vegetativa adulta, las hojas producidas son alargadas y levemente serradas. En ambas fases las hojas se producen sin elongación del tallo que tiene lugar cuando comienza la transición floral. Al iniciar el crecimiento

INTRODUCCIÓN

reproductivo la planta deja de producir hojas para generar órganos reproductivos, flores e inflorescencias. En una primera etapa de inflorescencia temprana las coflorescencias se encuentran sustentadas por una hoja caulinar; mientras que, en la segunda etapa de inflorescencia tardía el meristemo apical produce flores sin hoja caulinar (Figura tomada de Silvestre, M, 2021).

Arabidopsis es una planta facultativa de día largo (LD, Long Day en inglés). Eso significa que, aunque es capaz de florecer bajo condiciones de día corto equivalentes al otoño/invierno (SD, Short Day en inglés), las condiciones de día largo, equivalente a primavera/verano, promueven una floración más temprana (Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012; Gregory y Hussey, 1953).

CONTROL GENÉTICO DE LA FLORACIÓN

Para asegurar el éxito reproductivo de las plantas es fundamental que la floración ocurra únicamente cuando las condiciones ambientales sean las óptimas. Por ello, un complejo circuito de rutas genéticas que perciben y responden a diversos estímulos ambientales (fotoperiodo, intensidad lumínica, temperatura, disponibilidad de nutrientes) y endógenos (edad, el estado hormonal, niveles de sacarosa) regulan el proceso de la transición floral (Amasino, 2010; Srikanth y Schmid, 2011).

Gracias a los estudios genéticos y fisiológicos llevados a cabo en diferentes mutantes de tiempo de floración se han identificado seis principales rutas genéticas que regulan la floración en Arabidopsis: la ruta del fotoperiodo, la vernalización, la temperatura, las giberelinas, la edad y la ruta autónoma. Todas ellas convergen en la regulación transcripcional de un grupo reducido de genes a los que se les conoce como genes integradores de la floración: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*, *AGAMOUS LIKE 24 (AGL24)*. Estos genes se encargan de integrar la información procedente de las distintas rutas y, a su vez, son capaces de activar directa o indirectamente a los genes responsables de la identidad de meristemo floral, como son *APETALA 1 (AP1)*, *CAULIFLOWER (CAL)*, *LEAFY (LFY)* y *FRUITFULL (FUL)*, cuya función es la formación de los meristemos florales en los flancos del meristemo inflorescente (Srikanth y Schmid, 2011).

En cuanto a la ruta del fotoperiodo, como se ha comentado, Arabidopsis es una planta facultativa de día largo (LD) y las condiciones de día largo (equivalente a primavera/verano) promueven una floración más temprana (Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012; Gregory y Hussey, 1953). Las plantas son capaces de medir la longitud del día por medio de

INTRODUCCIÓN

fotorreceptores y esta información es integrada por el reloj circadiano, el cual regula la expresión de *CONSTANS* (*CO*) por la acción de *GIGANTEA* (*GI*). En condiciones de día largo, la proteína *CO* se estabiliza al final del día, cuando activa la expresión del gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*), conocido como “florigeno”. El gen *FT* se expresa en las hojas y su proteína se transporta al SAM, a través del floema, donde forma un complejo con el factor de transcripción tipo bZIP FD. El complejo FT-FD induce la floración, la formación de las flores (Corbesier *et al.*, 2007; Pin y Nilsson, 2012). La floración también puede verse inducida por una exposición prolongada al frío, lo que se conoce como ruta de vernalización, en la cual se reprime la expresión de *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un factor de transcripción tipo MADS que actúa como un regulador negativo de la floración, reprimiendo la expresión de *FT* y *SOC1* (Song *et al.*, 2012). A su vez, la floración puede verse inducida por una exposición a altas temperaturas, en la cual se ve reprimido el gen *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) que a su vez regula negativamente la expresión de *SOC1* y *FT*, con ayuda de *FLC* (Srikanth y Schmid, 2011). La ruta autónoma, por su parte, depende de las condiciones de desarrollo de la planta. En esta ruta, se reprime la expresión de *FLC*, el regulador negativo de la floración, por medio de remodelación de la cromatina o uniones de RNA (Cheng *et al.*, 2017). También se conoce una ruta dependiente de la edad, en la cual el miRNA156 reprime la transición floral y se expresa a nivel alto en tejidos jóvenes, pero con el paso del tiempo, la expresión empieza a disminuir de forma gradual y comienza a expresarse el miRNA172, que es capaz de activar la floración (Fornara y Coupland, 2009). Por último, aunque se conoce que diversas hormonas como el ácido abscísico (ABA), brasinosteroides (BRs), citocininas (CKs), etileno (ET) y óxido nítrico (NO) son capaces de activar o reprimir la floración, las giberelinas (GAs) son probablemente las mejor estudiadas y su papel es clave para la inducción de la floración bajo condiciones de SD (Figura 3; Conti, 2017; Davis, 2009, Kazan y Lyons, 2016).

INTRODUCCIÓN

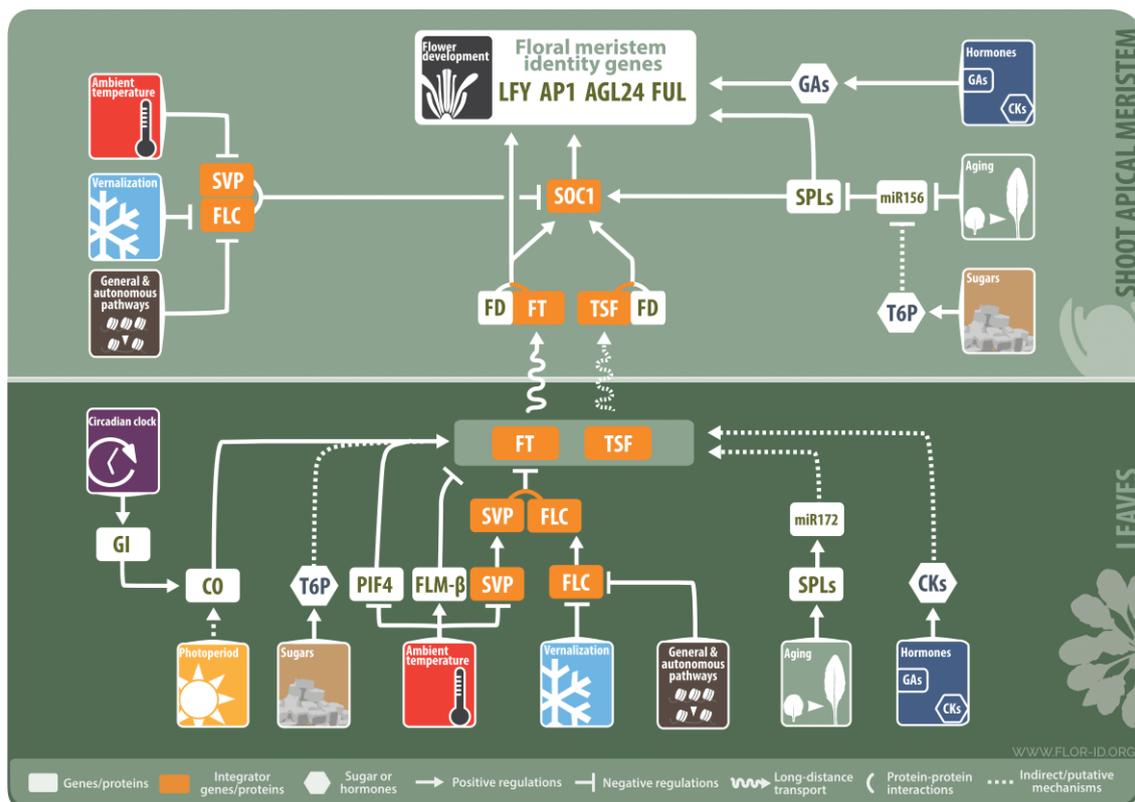


Figura 3. Integración de las rutas genéticas que controlan la floración en *Arabidopsis*. Representación de las rutas genéticas que controlan la floración en *Arabidopsis* como son la del fotoperiodo, los azúcares, la vernalización, la temperatura, la edad, la ruta autónoma y la de las hormonas encargadas de percibir las señales exógenas y endógenas. Se representan también los genes integradores que reciben toda la información procedente de cada una de las rutas y la integran permitiendo así la expresión de genes responsables de la identidad e iniciación de la floración. Imagen tomada de FLOR-ID <http://www.phytosystems.ulg.ac.be/florid/> (Bouché *et al.*, 2016).

EL PAPEL DE *FLOWERING LOCUS T* (FT) Y *TERMINAL FLOWER 1* (TFL1) EN LA FLORACIÓN

Como ya se ha mencionado, *FLOWERING LOCUS T* (FT) es el denominado “florigeno”. Los mutantes *ft* presentan una floración tardía mientras que la sobreexpresión causa adelanto (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Koornneef *et al.*, 1991).

El mecanismo por el cual FT ejerce su acción no es del todo conocido. Se sabe que FT codifica una proteína con homología a las proteínas de unión a la fosfatidiletanolamina (PEBPs, *phosphatidylethanolamine binding proteins*) (Zhu *et al.*, 2021) que regulan rutas de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación celular y que están presentes en bacterias, levaduras y animales (Karlgrén *et al.*, 2011). La proteína FT se sintetiza en hojas, pero es capaz de moverse a través del floema hasta llegar al SAM por medio de las células acompañantes. Una vez allí, FT es capaz de interactuar con la proteína FD, un factor de transcripción de tipo bZIP,

INTRODUCCIÓN

por mediación de proteínas de tipo 14-3-3, formándose el llamado Complejo de Activación Floral (FAC, en inglés) que incluye FT-(14-3-3)-FD (Zhu *et al.*, 2020b). Este complejo es capaz de activar genes integradores de la floración como *SOC1* y de identidad floral como *LFY* y *AP1* (Abe *et al.*, 2005b; Amasino, 2010; Wigge *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2020b). Debido a que FT se sintetice en las hojas, se mueva por el floema al SAM y active la floración en el SAM, recibe el nombre de florígeno (Liu *et al.*, 2013).

El gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* codifica también una proteína de tipo PEBP, pero con función antagónica a FT. La proteína TFL1 se sintetiza en el SAM, donde es capaz de moverse, aunque de manera más limitada, y de interactuar con FD, formando un complejo, similar al que forma FT con FD y las proteínas de tipo 14-3-3, y que es llamado Complejo represor de la floración (FRC), formado por TFL1-(14-3-3)-FD (Goretti *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021).

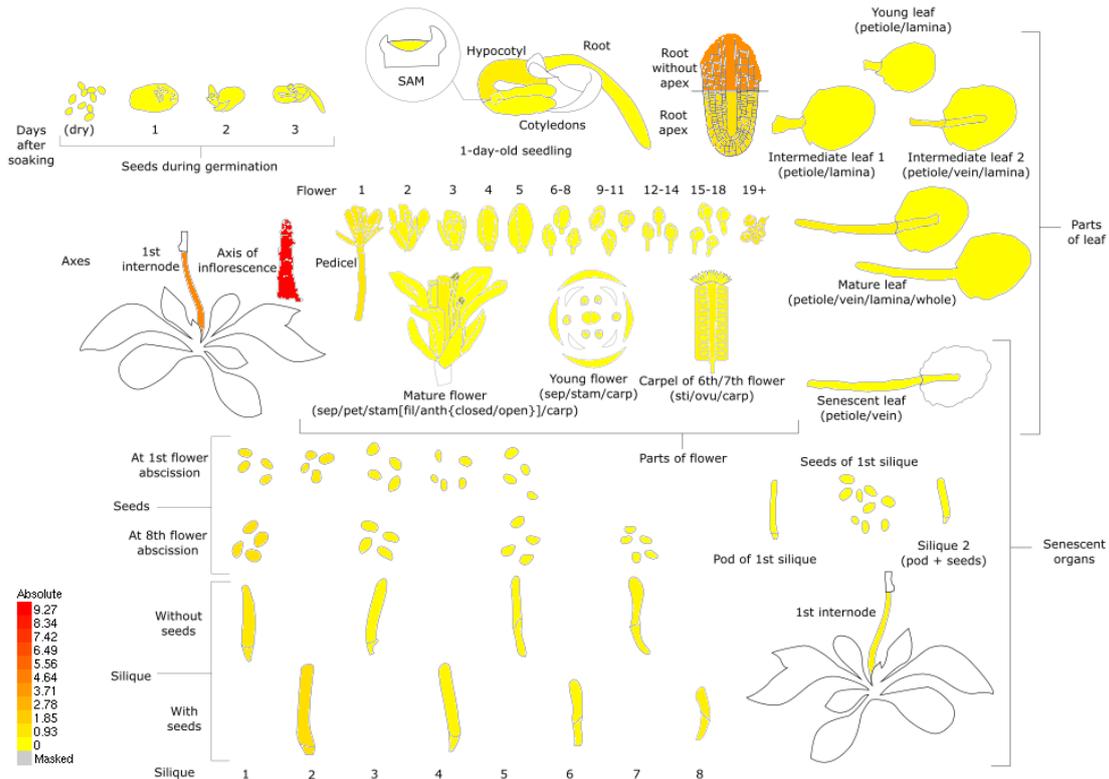
Se ha propuesto que las actividades opuestas en el control del tiempo de floración de los complejos FAC y FRC podrían basarse en un reclutamiento de diferentes co-factores transcripcionales específicos (Ho y Weigel, 2014). Esto se basa en que, aunque las proteínas TFL1 y FT presentan una alta identidad a nivel de aminoácidos, muestran diferencias en la conformación tridimensional del bolsillo de unión a ligando que podrían ser clave para explicar la divergencia en su función bioquímica, afectando a su capacidad de formar complejos con otras proteínas. Estudios realizados con estas proteínas han mostrado que unos pocos aminoácidos son clave para la divergencia funcional entre ambos genes de forma que FT puede ser convertida en TFL1 y viceversa por la sustitución de un único aminoácido (TFL1-H88; FT-Y85) o del segmento B codificado por el cuarto exón (Ahn *et al.*, 2006; Hanzawa *et al.*, 2005; Ho y Weigel, 2014).

El gen *TFL1* tiene un papel clave en la regulación del tiempo de floración y también en la especificación de la identidad del meristemo inflorescente, papel que está determinado por un complejo y dinámico patrón de expresión (**Figuras 4 y 5**). Tras la germinación, *TFL1* se expresa débilmente en el centro del SAM vegetativo, y esta expresión sube significativamente cuando tiene lugar la transición floral y deja de ser un meristemo vegetativo para ser un meristemo inflorescente (Bradley *et al.*, 1997a). Por otro lado, a nivel de meristemas axilares, se puede apreciar cómo la expresión es inicialmente fuerte, pero conforme se desarrollan las ramas, disminuye gradualmente, y se restringe a nivel espacial al centro del meristemo inflorescente axilar (Conti y Bradley, 2007; Serrano-Mislata *et al.*, 2016b).

INTRODUCCIÓN

A5G03840A5G03840

Klepikova Arabidopsis Atlas eFP Browser at bar.utoronto.ca
Klepikova *et al.* 2016. Plant J. 88:1058-1070



Data from A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling: Klepikova *et al.*, 2016, Plant J. 88:1058-1070. Total RNA was extracted with RNeasy Plant Kit and Illumina cDNA libraries were generated using the respective manufacturer's protocols. cDNA was then sequenced using Illumina HiSeq2000 with a 50bp read length. The read data are publicly available in NCBI's Sequence Read Archive under the BioProject ID 314076 (accession: PRJNA314076). Reads were aligned to the reference TAIR10 genome (Lamesch *et al.*, 2012) using TopHat (Trapnell *et al.*, 2009). Default TopHat settings and job resource parameters were used, with read groups unspecified. Reads per gene were counted with an in-house Python script using functions from the HTSeq package (Anders *et al.*, 2015). Reads were filtered so that only uninterrupted reads corresponding to a region within exactly one gene were used for RPKM calculation. If a gene's expression level is not displayed, this indicates the reads for this gene did not pass the filtering criteria. RPKM values were compiled using an in-house R script.

Figura 5. Patrón de expresión de *TFL1* en *Arabidopsis*. Atlas Klepikova *Arabidopsis* extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca. Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova *et al.*, 2016.

Así, las plantas mutantes *tfl1* florecen antes, y tras producir menos hojas que las plantas silvestres, tanto en condiciones de LD como de SD. Además, desarrollan una inflorescencia determinada, como consecuencia de la conversión de los meristemas inflorescentes en meristemas florales, produciéndose la formación de flores en las axilas de las hojas caulinares (flores axilares) y una flor terminal en el SAM (Bradley *et al.*, 1997b; Shannon y Meeks-Wagner, 1991).

Por el contrario, las plantas 35S:*TFL1*, que expresan constitutivamente *TFL1*, muestran floración tardía y producen un mayor número de hojas de roseta que las plantas silvestres; además, al igual que la fase vegetativa, la fase de inflorescencia también está extendida, generándose una inflorescencia mucho más ramificada, con la formación de coflorescencias no sustentadas por

INTRODUCCIÓN

hojas caulinares, que acaba produciendo flores normales (Baumann *et al.*, 2015; Ratcliffe *et al.*, 1998; Serrano-Mislata *et al.*, 2016).

La expresión de *TFL1* también se ha observado en la vasculatura del tallo de la inflorescencia y en raíces, pero su función en estos tejidos todavía es desconocida (Bradley *et al.*, 1997; Shon *et al.*, 2007). Por último, la expresión de *TFL1* se ha detectado también en semillas, y se ha documentado que la proteína TFL1 tiene un papel esencial en la determinación del tamaño de las semillas, regulando la correcta celularización del endospermo, función que lleva a cabo a través de su interacción con ABCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) al que estabiliza (Zhang *et al.*, 2020).

Las funciones de FT y de TFL1 como reguladores de la floración y de la arquitectura de la inflorescencia han sido documentados en una amplia variedad de especies, lo cual confiere a estos genes una gran importancia agronómica y un gran potencial biotecnológico.

RELACIÓN ENTRE EL ÁCIDO ABCÉSICO (ABA) Y EL MODO DE ACCIÓN DE TFL1

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína TFL1 es capaz de moverse en el SAM y reprimir la expresión de los genes de identidad de meristemo floral. TFL1 no es un factor de transcripción y no puede unirse directamente a DNA, y su función como represor transcripcional la ejerce actuando en un complejo con el factor de transcripción tipo bZIP FD (Goretti *et al.*, 2020; Hanano y Goto, 2011; Ratcliffe *et al.*, 1999). En trabajos previos realizados en nuestro grupo, se identificaron genes diana de TFL1 por combinación de un análisis ChIP-seq con una línea pTFL1::TFL1-Venus y con el análisis de RNA-seq de una línea TFL1-GR, donde TFL1 es activable por dexametasona (Goretti *et al.*, 2020; Silvestre, M, 2021). Entre las dianas directas de TFL1 se identificó un enriquecimiento en proteínas clave de la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) (**Tabla 1**).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Genes diana de TFL1 identificados por ChIP-Seq y que tienen relación con la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) (Goretti *et al.*, 2020).

GEN	ID	REGULACIÓN	VÍA ABA	TIPO
<i>GBF3</i>	AT2G46270	Up	Signalling	TF/bZIP
<i>MYB3</i>	AT1G22640	Up	Signalling	TF/MYB
<i>HB12</i>	AT3G61890	Up	Signalling	TF/HDZIP
<i>HB16</i>	AT4G40060	Up	Signalling	TF/HDZIP
<i>ABF3</i>	AT4G34000	Up	Signalling	TF/bZIP
<i>HAI1</i>	AT5G59220	Up	Signalling	Phosphatases
<i>SnRK2.7</i>	AT4G40010	Up	Signalling	Kinases
<i>SnRK3.9</i>	AT4G18700	Up	Signalling	Kinases
<i>AFP2</i>	AT1G13740	Up	Signalling	Ninja
<i>AFP4</i>	AT3G02140	Up	Signalling	Ninja
<i>P5CS1</i>	AT2G39800	Up	Response	Proline synthesis
<i>AIRP2</i>	AT5G01520	Up	Response	Ub ligase
<i>NFCY-C2</i>	AT1G56170	Down	Signalling	TF/NFY
<i>ABI5</i>	AT2G36270	Down	Signalling	TF/bZIP
<i>ANAC102</i>	AT5G63790	Down	Responde	TF/NAC

El núcleo de la cascada de señalización por ABA se compone de cuatro proteínas principales (Umezawa *et al.*, 2010). Brevemente, el ABA se une a receptores de la familia conocida como PYRABACTIN RESISTANCE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCARs; Ma *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Una vez que estos receptores se han unido al ABA, interactúan con unas proteínas fosfatasa denominadas PROTEIN PHOSPHATASE 2Cs (PP2Cs). La interacción inhibe la actividad fosfatasa de las PP2Cs, permitiendo que su sustrato, proteínas kinasas del grupo SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2s) sea fosforilado. Por tanto, las SnRK2s en presencia de ABA se fosforilan y se activan, fosforilando y activando a su vez a proteínas diana muy diversas entre las que se incluyen los factores de transcripción (ABFs/AREB), de tipo bZIPs (Yoshida *et al.*, 2015), que se encargarán de activar la expresión de genes inducibles por ABA (Conti, 2019; Cutler *et al.*, 2010). En ausencia de ABA, las PP2C se unen a las SnRK2 y las mantienen en una forma inactiva defosforilada (**Figura 6**).

INTRODUCCIÓN

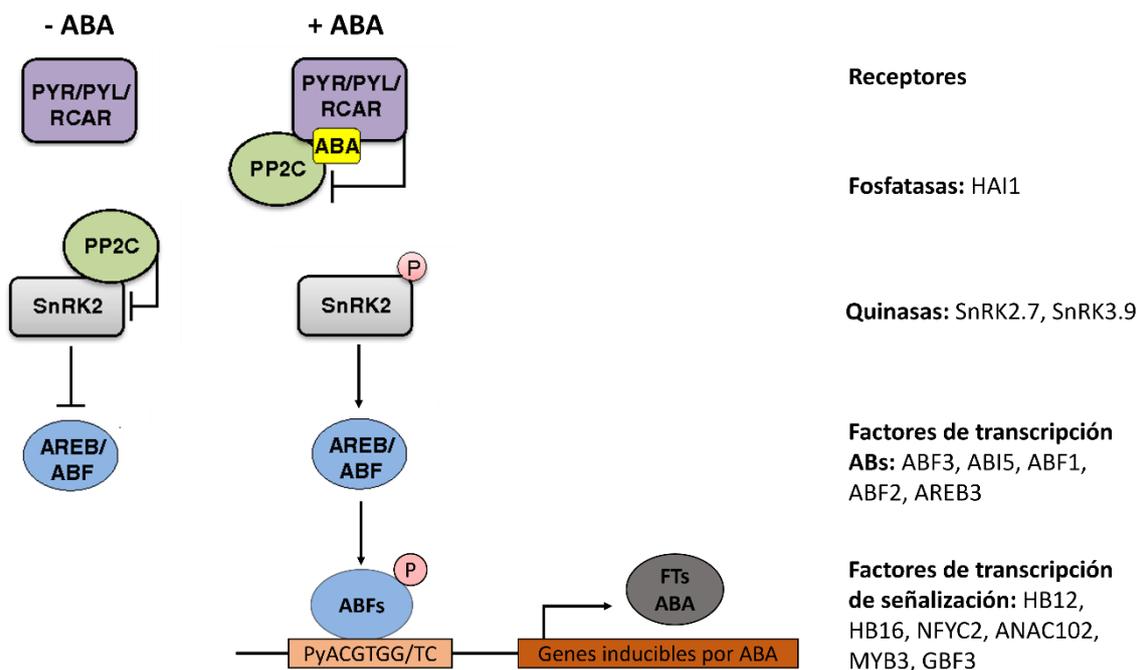


Figura 6. Ruta de señalización por ABA. El ABA es reconocido por los receptores PYR/PYL/RCAR formando un complejo que inhibe a las fosfatasas PP2C, permitiendo la fosforilación de las quinasas SnRK2. Estas quinasas fosforilan y activan proteínas diana incluyendo los factores de transcripción ABF que median la activación de genes de respuesta a ABA (Figura tomada con modificaciones de Danguah *et al.* 2014).

El ABA es una hormona isoprenoide que se conoce habitualmente como la hormona del estrés hídrico y se ha implicado en varios procesos del desarrollo como la dormancia de la semilla, el retraso de la germinación y la resistencia al estrés abiótico (Vishwakarma *et al.*, 2017), pero también se ha visto cierta relación con la floración (Conti, 2019; El-Antably y Wareing, 1966). La contribución del ABA en la floración es controvertida. Se han documentado efectos positivos y negativos de la ABA en el tiempo de floración (Conti, 2017). El ABA es capaz de activar la floración por la ruta de escape de sequía (DE, Drought Escape en inglés), activando a *FT* y *TSF*. De esta forma, las plantas pueden producir flores y semillas antes de sufrir un estrés elevado por sequía (Hwang *et al.*, 2019). En relación con esto, se han identificado mutantes de ABA que presentan afectada la floración, pero sólo en condiciones de LD (Martignago *et al.*, 2020; Shu *et al.*, 2018) lo que ha llevado a proponer un modelo en el que el ABA es capaz de activar la expresión de FT a través de la modulación en la expresión de *CO* y *GI*. Además, los ABFs son capaces de activar la expresión de *SOC1* que actúa de manera indirecta sobre FT. FT es capaz de moverse al SAM donde interacciona con bZIPs, como FD y así tiene lugar a la activación de los genes de identidad floral y, por otro lado, la de los de señalización y homeostasis del ABA. TFL1-FD, a su vez, regula

INTRODUCCIÓN

negativamente genes que FT-FD es capaz de activar como son el gen de biosíntesis de ABA, *ABA1*, así como genes de señalización de ABA como los bZIPs *ABF4/AREB2* y *ABI5*, junto con el regulador de *ABI5*, *AFP2* (Figura 7; Martignago *et al.*, 2020, Zhu *et al.*, 2020b).

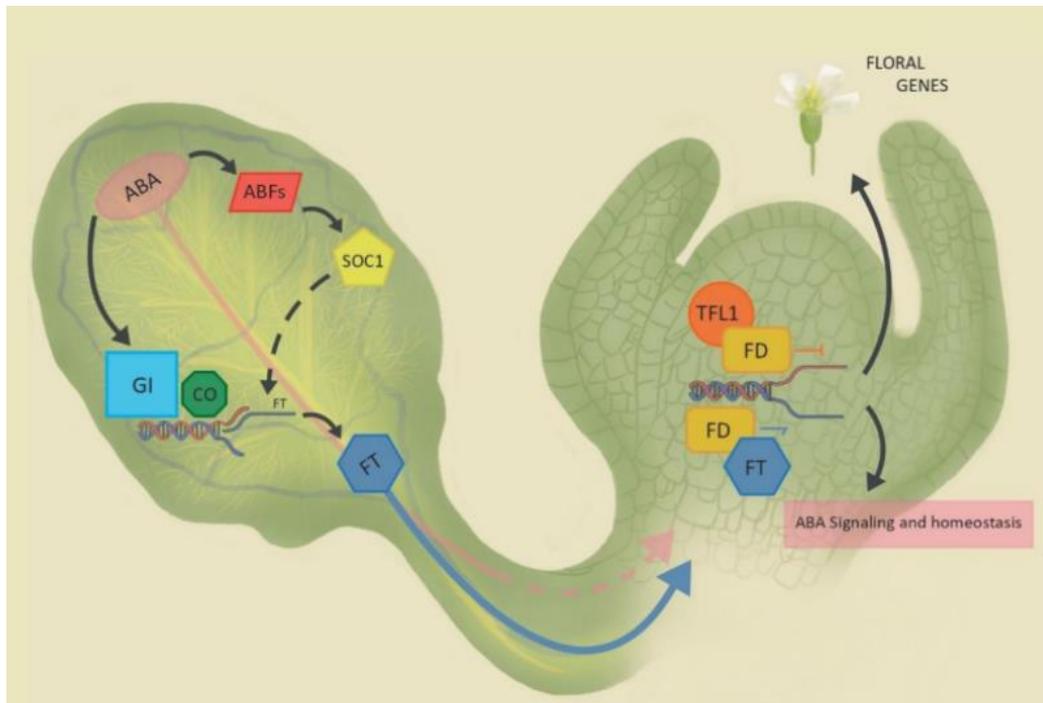


Figura 7. Señalización del ácido abscísico y regulación de la floración. En las hojas el ABA controla la transcripción de *FT* a través de *GI* y *CO*. Los ABFs a su vez son capaces de modular la expresión de *SOC1*, afectando a *FT* de forma indirecta. *FT* se mueve hasta el SAM donde interacciona con *FD* y con otros bZIPs para activar los genes de identidad floral y los de señalización de ABA. *TFL1* juega un papel opuesto a *FD* (Figura tomada de Martignago *et al.*, 2020).

El efecto inhibitorio del ABA en la transición floral ha sido también documentado. El mutante deficiente de ABA *aba2-2* (*gin1-1*, Wassilewskija background) florece ligeramente más pronto que las plantas silvestres tanto bajo condiciones de LD y SD (Domagalska *et al.*, 2010). Además, los mutantes insensibles a ABA *abi1* (*abi1-1*), *abi4* (*abi4-1*), y *abi5* (*abi5-4*) tienen también floración temprana indicando el efecto inhibitorio del ABA en la transición floral (Wang *et al.*, 2013; Riboni *et al.*, 2016; Shu *et al.*, 2016). Aunque el mecanismo molecular que subyace al retraso de floración por ABA no se conoce, se ha sugerido que podría estar mediado por factores de transcripción tipo bZIP como *ABI5* promoviendo la expresión de *FLC* (Wang *et al.*, 2013).

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio estamos intentando caracterizar la conexión entre el ABA y la ruta genética de la floración y la arquitectura de la inflorescencia, a través del análisis de cómo la ruta de señalización del ABA media la actividad de TFL1.

Como se ha dicho anteriormente, entre las dianas directas de TFL1 identificadas en nuestro grupo por los análisis de RNA-seq y ChIP-seq se identificaron diversos genes clave en la ruta de señalización del ABA y que considerando sus patrones de expresión espacio-temporal resultaban ser buenos candidatos como mediadores de la función de TFL1. Algunos de ellos han sido ya objeto de estudio en el laboratorio *AFP2*, *AFP4*, *P5CS1*, *HB12*, *HB16* y *GBF3* (García, C, 2021). En particular, *GBF3* resultó de especial interés por tratarse de un factor de transcripción de tipo bZIP ya que los fenotipos de pérdida, y especialmente el de ganancia de función de este gen, no descritos previamente sugerían la participación de *GBF3* en la regulación del tiempo de floración, arquitectura de la inflorescencia y el desarrollo de la semilla que son procesos del desarrollo en los que se ha descrito que participa TFL1 (**Figura 8**; García, C, 2021).

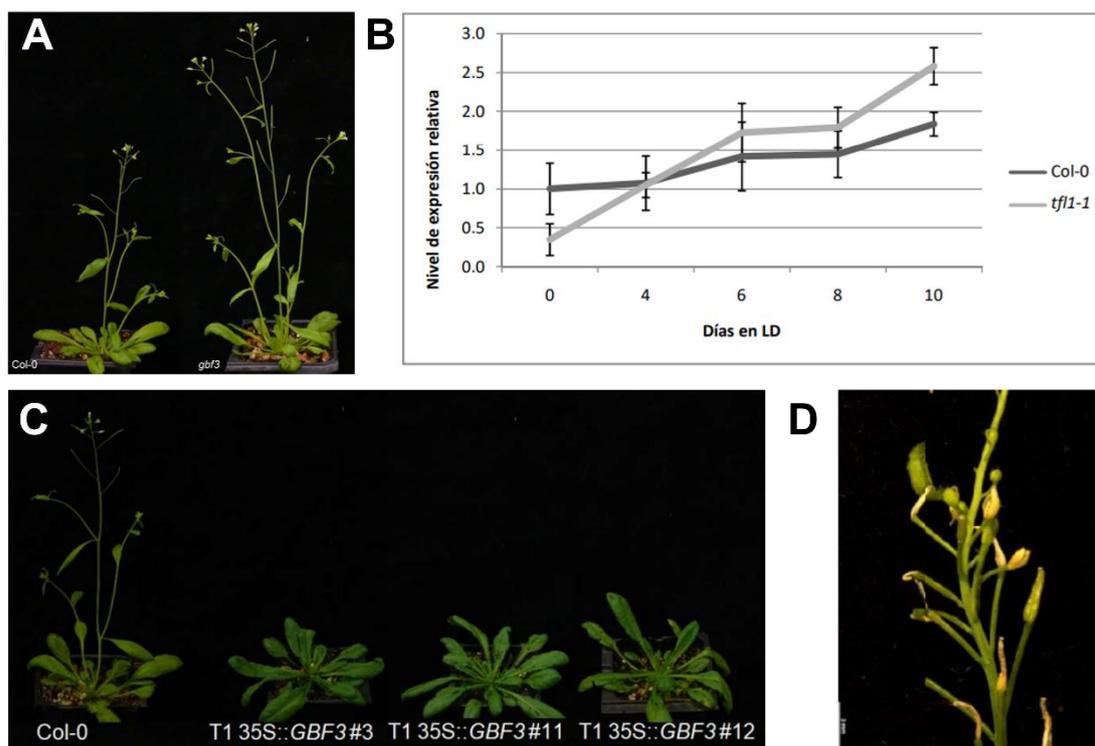


Figura 8. Patrón de expresión y fenotipos asociados a *GBF3*. (A) Fenotipo de adelanto de la floración asociado al mutante de pérdida de función *gbf3* en condiciones de día largo. (B) Patrón de expresión de *GBF3* en el ápice del tallo durante distintas etapas del desarrollo en fondo genético Col-0 y *tf1-1*. (C) Fenotipo de retraso de la floración y (D) fenotipo del ápice principal comprimido y con crecimiento detenido asociado a la sobreexpresión de *GBF3* en condiciones de día largo (Fotos tomadas de García, C, 2021)

INTRODUCCIÓN

Entre los genes dianas directas de TFL1, que eran genes clave en la ruta de señalización por ABA y cuyo patrón de expresión espacio-temporal parecía sugerir un posible papel como mediadores de la función de TFL1, se identificaron también la fosfatasa HAI1 y los factores de transcripción de la señalización por ABA ANAC102 y MYB3, genes que son objeto de estudio en este trabajo.

HIGHLY ABA-INDUCED1 (HAI1) codifica una de las tres fosfatasas HAI de la familia de las fosfatasas 2Cs (PP2Cs). Los mutantes simples *hai1* no presentan hipersensibilidad a ABA, que sólo se observa en el caso de mutantes dobles o triples (Yoshida *et al.*, 2006). Se ha visto un papel de *HAI1* en respuesta a estrés abiótico siendo uno de los genes relacionados con estrés (Iyer-Pascuzzi *et al.*, 2011). Además, *HAI1* parece jugar un papel como regulador negativo de la respuesta a estrés osmótico mediado por ABA (Bhaskara *et al.*, 2012). También se sabe que *HAI1* es capaz de regular la fosforilación de AT-Hook-Like 10 (AHL10), siendo éste un mecanismo que utilizan las plantas para regular el crecimiento frente a la respuesta a estreses ambientales (Wong *et al.*, 2019).

NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 (ANAC102), codifica un miembro de la familia de los factores de transcripción NAC. *ANAC102* parece tener un papel en la mediación de la respuesta a hipoxia (Christianson *et al.*, 2009). Además, *ANAC102* es inducible por β -ciclocitral (β -cc), un metabolito que se genera como consecuencia de la fotooxidación en condiciones de estrés lumínico, y es capaz de activar la expresión de otros factores NAC, como son *ANAC002*, *ANAC030* y *ANAC081*, activando así la ruta de detoxificación del β -ciclocitral, lo que genera una tolerancia frente al estrés fotooxidativo (D'alessandro *et al.*, 2018). Por último, cabe destacar que recientemente se ha visto que *ANAC102* se localiza en núcleo y cloroplasto y es capaz de regular negativamente la expresión de genes en el cloroplasto a través de su interacción con las RNA polimerasas del mismo (Xin *et al.*, 2021).

MYB DOMAIN PROTEIN 3 (MYB3), codifica un factor de transcripción de tipo MYB que pertenece al subgrupo 4 de los factores de transcripción R2R3-MYB compuesto por 4 miembros: *MYB3*, *MYB4*, *MYB7* y *MYB32* (H *et al.*, 2000). Se conoce que *MYB3* juega un papel como represor de la biosíntesis de fenilpropanoides a través de la unión al promotor de la Cinamato 4 Hidroxilasa (C4H) reprimiendo su expresión (Zhou *et al.*, 2017).

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

Para tratar de profundizar en cómo la ruta de señalización del ABA, diana directa de TFL1, media la actividad de TFL1 nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar la expresión de *ANAC102*, *MYB3* y *HAI1* en líneas con niveles alterados de *TFL1*, líneas mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión.
2. Estudiar el papel de estos genes de respuesta a ABA en procesos del desarrollo controlados por *TFL1*, analizando los fenotipos causados por la pérdida de función y la sobreexpresión de dichos genes.
3. Profundizar en el estudio de GBF3 como mediador de la función de TFL1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Material vegetal

En este trabajo se han utilizado plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*. Las líneas de *Arabidopsis* usadas fueron el ecotipo Columbia-0 (Col-0) silvestre como control, ya que todas los mutantes y líneas transgénicas generadas están en este fondo genético y los mutantes de pérdida de función que proceden de la colección de mutantes de T-DNA del instituto SALK (<http://signal.salk.edu>) y de la colección de líneas mutantes de la universidad de Bielefeld GABI-KAT (<https://www.gabi-kat.de/>). Los mutantes simples *hai1-1* y *hai1-2*, así como, el triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1* fueron cedidos por el Dr. José León (IBMCP). Plantas de *Nicotiana benthamiana* se usaron para los ensayos de localización subcelular y de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC).

1.1.1. Líneas mutantes de *Arabidopsis*

Las líneas mutantes de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Líneas mutantes de *Arabidopsis* utilizadas.

LÍNEA	MUTÁGENO	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	COLECCIÓN CÓDIGO DE REFERENCIA
<i>gbf3</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_082840C
<i>anac102</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_030702C
<i>myb3</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GK-815G05
<i>hai1-1</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_142672
<i>hai1-2</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_108282
<i>hai1-2aip1-1hai3-1</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	(Bhaskara <i>et al.</i> , 2012)
<i>tfl1-1</i>	EMS	Col-0		(Shannon y Meeks-Wagner, 1991)

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.2. Líneas transgénicas de Arabidopsis

Las líneas utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Líneas transgénicas utilizadas.

LÍNEA	CONSTRUCCIÓN	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	PROCEDENCIA
35S::ANAC102	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S::MYB3	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S::HAI1	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S::GBF3	pMDC32	Col-0	Higromicina	García, C, 2021
35S::GBF3	pMDC32	<i>tf1-1</i>	Higromicina	Este trabajo
pHEE401_3sgRNA		Col-0	Higromicina	Este trabajo
pHEE401_3sgRNA		<i>gbf3</i>	Higromicina	Este trabajo

1.1.3. Cultivo de Arabidopsis en el invernadero

Para el cultivo de Arabidopsis se utilizó una mezcla de tierra 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita en alveolos de 6,5 x 6,5 x 5 cm. Tras la siembra, las semillas sufrieron un proceso de vernalización en una cámara a 4°C en condiciones de oscuridad durante 4 días con el objetivo de sincronizar la germinación. El cultivo de las plantas se realizó en invernaderos con luz natural suplementada con luz blanca fría (4600lm) completando un fotoperiodo de día largo de 16h de luz manteniendo la temperatura estable entre 21°C y 23°C. Además, se cultivaron en fitotrones con luz blanca fría (4600lm) en condiciones de fotoperiodo de día largo (LD, 16h de luz y 8h de oscuridad) o de día corto (SD, 8h de luz y 16h de oscuridad) manteniendo la temperatura a 21°C. El riego se realizó por inmersión dos veces por semana, una vez con agua y otra con solución Hoagland n°1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1953).

1.1.4. Cultivo de Arabidopsis *in vitro*

Se utilizó el cultivo *in vitro* de Arabidopsis para la selección de líneas mutantes y transgénicas, así como para la obtención de material vegetal. Las semillas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se esterilizaron, en una cabina de flujo laminar, con una solución acuosa de etanol al 70% (v/v) y Tritón-X-100 al 0,005% (v/v) durante 3 minutos en agitación, se lavaron con etanol 96% (v/v) durante 1 minuto en agitación y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril. Posteriormente, las semillas esterilizadas se distribuyeron en placas de Petri, selladas con cinta *Micropore™ 3M Surgical Tape* para permitir el intercambio de gases, sobre un medio sólido (pH 5.9) compuesto por 2.2 g/L de sales MS con vitaminas (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L

MATERIALES Y MÉTODOS

MES y 6.0 g/L de agar suplementado, o no, con el correspondiente agente selectivo (Kanamicina (100 µg/ml), Sulfadiazina (100 µg/ml), Higromicina (40 µg/ml) y Timentina (150 µg/ml). Tras la siembra, las placas con semillas se llevaron a cámaras donde estuvieron de 3-5 días en oscuridad a 4°C para su estratificación y posteriormente se llevaron a cámaras de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo 16h luz a una temperatura constante de 24°C. La luz fue suministrada por tubos fluorescentes Sylvania Gro Luz 36W (luz blanca fría de 850lm).

1.1.5. Fertilización cruzada en Arabidopsis

Para la fertilización cruzada se utilizó un individuo de Arabidopsis como parental masculino (donante de polen) y otro como femenino (receptor de polen). Las manipulaciones de las flores se realizaron con la ayuda de pinzas de microcirugía y una lupa binocular. Tras emasculiar una o varias flores no fecundadas de un tallo inflorescente del parental femenino, se extirparon del masculino una o dos flores maduras con estambres con polen. Se pusieron en contacto varias anteras del donante de polen con el pistilo del parental femenino, quedando de esta forma el polen adherido a él. Una vez que las silicuas resultantes del cruzamiento estuvieron maduras y prácticamente secas, se recogieron en un tubo eppendorf rotulado adecuadamente.

1.1.6. Conservación de semillas de Arabidopsis

Las semillas maduras se recolectaron, se dispusieron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se dejaron secar durante cinco días a 37°C. Posteriormente, las semillas se almacenaron en el invernadero en una cámara oscura con condiciones controladas de humedad (25%) y temperatura (10°C).

1.1.7. Cultivo de *N. benthamiana* en invernadero

En el caso de las *N. benthamiana* el cultivo se realizó con una mezcla de 1:1 turba negra:vermiculita, en macetas de 12 cm de diámetro en fitotrones con luz blanca (4600lm) a una temperatura estable de 21-23°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.2. Material bacteriano

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas.

CEPA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Escherichia coli</i> One Shot™ TOP10	Transformación de bacterias	Thermofisher
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	(Koncz y Schell, 1986)

1.2.1. Cultivo de bacterias *in vitro*

Para el crecimiento de los cultivos bacterianos se utilizó el medio LB (Luria-Bertani medium), compuesto por: triptona 10 g/L, extracto de levadura 5.0 g/L y NaCl 1.0 g/L, pH 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo agar 15 g/L. Los cultivos líquidos de *E. coli* y *A. tumefaciens* se incubaron toda la noche a 37°C o a 28°C, respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37°C durante una noche para *E. coli*, o a 28°C durante 2 días para *A. tumefaciens*.

Para la recuperación de las *E. coli* One Shot™ TOP10 tras el choque térmico se utilizó un medio líquido SOC (medio S.O.C. de Hanahan), compuesto por triptona 2g/L, extracto de levadura 0.5g/L, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 20 mM, MgSO₄ 10mM y glucosa 20mM.

La selección de bacterias transformadas se realizó suplementando al medio los antibióticos que se detallan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Antibióticos con los que se suplementó el medio LB para la selección bacteriana.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN STOCK	SOLVENTE	CEPA BACTERIANA	CONCENTRACIÓN DE USO
Kanamicina	100 mg/mL	H ₂ O	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	50 µg/mL
Espectinomicina	100 mg/mL	H ₂ O	<i>E. coli</i>	100 µg/mL
Rifampicina	50 mg/mL	DMSO	<i>A. tumefaciens</i>	100 µg/mL
Gentamicina	100 mg/mL	H ₂ O	<i>A. tumefaciens</i>	100 µg/mL

1.2.2. Conservación de los microorganismos en glicerol

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la conservación de las cepas bacterianas a largo plazo se prepararon glicerizados. Para ello, se mezclaron dentro de tubos estériles de 2mL “Cryovial” de “Simport” 900µL del cultivo de *E. coli* de *A. tumefaciens* crecido en medio LB durante toda la noche y 700µL de glicerol al 50%; una vez homogeneizada la mezcla se introdujeron inmediatamente en nitrógeno líquido para su posterior almacenaje en cajas a -80°C.

2. MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos

2.1.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico puro de *E. coli* se utilizó el kit comercial *NZYMiniprep* (NZYTech) a partir de cultivos de 5 mL de medio LB líquido suplementado con el antibiótico requerido, inoculados con colonias frescas e incubados tal y como se describe en el apartado 1.2.1.

Para las preparaciones a mediana escala de DNA plasmídico puro de *E. coli* se utilizó el kit comercial *Plasmid Midi kit* (Qiagen) a partir de cultivos de 100 mL crecidos en condiciones similares que las utilizadas para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala.

Tanto para las preparaciones a pequeña escala como para las de mediana escala se siguieron las especificaciones suministradas por los fabricantes.

2.1.2. Extracción de ADN plasmídico de *A. tumefaciens*

Las preparaciones de DNA plasmídico de *A. tumefaciens* a pequeña escala se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989. Se partió de cultivos de 5 mL de LB suplementados con Rifampicina 100 µg/mL, Gentamicina 100 µg/mL y el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido que se quiere aislar, inoculados con colonias frescas e incubados tal y como se describe en el apartado 1.2.1. La pureza y cantidad de ADN extraído por dicho método no es alta, de ahí que se utilizara 1 µL de esta preparación de DNA para transformar *E. coli* y de uno o dos de los clones transformantes de *E. coli* se volvió a purificar el ADN plasmídico para su posterior análisis por digestión enzimática.

2.1.3. Extracción de ADN genómico de *Arabidopsis*

La extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* se realizó siguiendo el protocolo “*Quick DNA prep for PCR*” descrito por Weigel y Glazebrook, 2009 a partir de hojas jóvenes de 1cm de

MATERIALES Y MÉTODOS

longitud recolectadas en hielo. El ADN genómico resultante se resuspendió finalmente en 50 μ L de agua Mili-Q y se almacenó a -20°C .

2.1.4. Extracción de ARN total de Arabidopsis

Las extracciones de ARN total de Arabidopsis llevadas a cabo en este trabajo, se realizaron a partir de muestras recogidas e inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido; el tejido fue manualmente homogeneizado con un mortero y un pistilo hasta obtener un polvo fino que fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 mL a -80°C hasta la extracción con aproximadamente 100 mg cada uno.

Para el clonaje y los análisis de expresión de un gen por RT-qPCR se utilizó el kit "*E.Z.N.A. Plant Kit RNA kit*" (Omega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del RNA obtenido se evaluó mediante espectrofotometría utilizando un Nanodrop ND1000 (Applied) y su integridad se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El ARN total extraído se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. Tras la extracción, antes de llevar a cabo la transcripción reversa, se trataron 3 μ g de ARN total con DNasa para eliminar la contaminación de ADN genómico utilizando el kit "*TURBO DNA-free kit*" (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2. Manipulación de ácidos nucleicos

2.2.1. Síntesis de cDNA

2 μ g de ARN total de Arabidopsis extraído y tratado con DNasa según se describe en el apartado 2.1.4. se usaron como molde para la síntesis de cDNA utilizando el sistema "*SuperScript IV*" y "*Oligo dT₁₂₋₁₈*" (Thermo) y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar fragmentos de ADN con el objetivo del genotipado de líneas mutantes o de la clonación se utilizó la técnica de PCR. Se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores específicos detallados en el **Anexo, Tabla S1** y moldes de diferente naturaleza incluyendo cDNA, ADN genómico, ADN plasmídico o fragmentos de PCR, así como diferentes tipos de polimerasas de ADN.

Para los procesos de clonación se utilizó la polimerasa de alta afinidad *HF Phusion* (Thermo), mientras que para el genotipado se usó la *GoTaq* (Fermentas), siguiendo en cada caso las

MATERIALES Y MÉTODOS

instrucciones del fabricante. Las concentraciones de cada reactivo necesarias para el correcto funcionamiento de las reacciones de PCR, así como los tiempos, se detallan en las **Tablas 6 y 7**.

Tabla 6. Condiciones utilizadas para la amplificación de ADN por PCR. Se muestran las mezclas de reacción estándar.

	MIX PCR	
	<i>Phusion</i>	<i>GoTaq</i>
Tampón	1X	1X
MgCl₂	1.5mM	1.5mM
dNTPs	400μM	200μM
Cebador Directo	0.5μM	0.2μM
Cebador Reverso	0.5μM	0.2μM
H₂O	Hasta 50 μL	Hasta 25 μL
Polimerasa	0.2U/μL	0.2U/μL
ADN molde	Desde 1pg hasta 10ng	Desde 1pg hasta 10ng

Tabla 7. Condiciones generales utilizadas para la amplificación de ADN por PCR.

Paso ciclo	Ciclos	PROGRAMA			
		Temperatura		Tiempo	
		<i>Phusion</i>	<i>GoTaq</i>	<i>Phusion</i>	<i>GoTaq</i>
Desnaturalización inicial	1	98°C	95°C	1min	2min
Desnaturalización	35	98°C	95°C	10s	30s
Hibridación		-	-	30s	30s
Extensión		72°C	72°C	30s/Kb	1min/Kb
Extensión final	1	72°C	72°C	5min	5min
Almacenaje	1	4°C	15°C	∞	∞

La temperatura de hibridación se calculó para cada pareja de cebadores mediante la herramienta “*online Tm calculator Thermo*”:

<https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

2.2.3. Purificación de fragmentos de ADN

MATERIALES Y MÉTODOS

La purificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo tras su amplificación por PCR con el objetivo de generar amplicones de mayor calidad y pureza destinados a la clonación o la secuenciación. Cuando la purificación se llevó a cabo directamente sobre el producto de PCR se utilizó el sistema “*mi-PCR Purification Kit*” (Metabion). Para la purificación de una banda de gel de agarosa conteniendo el producto de interés se utilizó el sistema “*mi-Gel Extraction Kit*” (Metabion). En ambos casos, la purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Se utilizaron protocolos estándar (Maniatis *et al.*, 1982) para llevar a cabo la digestión de ADN por enzimas de restricción, utilizando el tampón y las condiciones indicadas por el fabricante. El análisis de los fragmentos de ADN resultante se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con tampón TBE 1X [Tris 44.5mM (pH 8.0), ácido bórico 44.5mM, EDTA 1.25mM]. Previamente, se simuló una digestión *in silico* para determinar el número y el tamaño de los fragmentos esperados.

2.2.5. Cuantificación de ácidos nucleicos

La pureza y la concentración del ADN y del ARN total se analizó por espectrofotometría utilizando el NanoDrop ND-1000 (Applied). La calidad de las muestras se determinó mediante las ratios 260/230 y 260/280.

2.3. Técnicas de clonación

2.3.1. Vectores plasmídicos utilizados

Para las clonaciones llevadas a cabo en este trabajo se han usado distintas reacciones de ligación dependiendo del tipo de vector y la tecnología de clonación en la que se basa. Los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo se detallan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Vectores plasmídicos utilizados.

NOMBRE	RESISTENCIA (bacteria/planta) CARACTERÍSTICAS	USO	ORÍGEN
pCR8/GW/TOP O	Espectinomicina, sitio de unión para cebadores M13 directo y reverso, GW1 y GW2.	Clonaje de productos de PCR. Vector entrada sistema Gateway.	Invitrogen
pMDC32	Kanamicina/Higromicina Promotor 2x35S.	Clonaje y transformación de	Invitrogen

MATERIALES Y MÉTODOS

		Arabidopsis. Contiene un promotor 2x35S.	
pYFC43	Kanamicina/Higromicina Mitad C' de la YFP.	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente YFP.	Alejandro Ferrando, IBMCP
pYFN43	Kanamicina/Higromicina Mitad N' de la YFP.	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP.	Alejandro Ferrando, IBMCP
pMDC43	Kanamicina/Higromicina	Clonaje y transformación de <i>Nicotiana benthamiana</i> . Contiene el promotor 35S y la proteína GFP.	Invitrogen
pHEE401	Kanamicina/Higromicina Cas9, promotor U6.	Clonaje y transformación de Arabidopsis. Obtención de líneas CRISPR.	Addgene (Wang <i>et al.</i> , 2015)

2.3.2. Construcciones plasmídicas utilizadas

Las construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Construcciones plasmídicas utilizadas.

NOMBRE	PROPÓSITO	INSERTO	ORIGEN
Vector tipo Entry			
pCR8/GW/TOPO-ANAC102	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento cDNA del gen <i>ANAC102</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR.	Este trabajo.
pCR8/GW/TOPO-MYB3	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento cDNA del gen <i>MYB3</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR.	Este trabajo.
pCR8/GW/TOPO-HAI1/PP2C	Plásmido intermediario para recombinación	Fragmento cDNA del gen <i>HAI1/PP2C</i> desde ATG a STOP	Este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

	mediante tecnología Gateway.	amplificado mediante PCR.	
pCR8/GW/TOPO-GBF3	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento cDNA del gen <i>GBF3</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR.	García, C, 2021
Vectores destino			
pMDC32-ANAC102	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>ANAC102</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión.	Obtenido mediante recombinación Gateway entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-ANAC102 y el vector pMDC32.	Este trabajo.
pMDC32-MYB3	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>MYB3</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión.	Obtenido mediante recombinación Gateway entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-MYB3 y el vector pMDC32.	Este trabajo.
pMDC32-HAI1/PP2C	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>HAI1</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión.	Obtenido mediante recombinación Gateway entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-HAI1/PP2C y el vector pMDC32.	Este trabajo.
pMDC32-GBF3	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>GBF3</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión.	Obtenido mediante recombinación Gateway entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-GBF3 y el vector pMDC32.	García, C, 2021
BiFC			
pYFC43-TFL1	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(C')YFP-TFL1 Obtenido mediante recombinación Gateway del plásmido PCR8/GW/TOPO-TFL1 con el vector pYFC43.	Méndez-Lozi, C, 2012
pYFC43-SOC1	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la	(C')YFP-SOC1 Obtenido mediante recombinación Gateway del plásmido	Méndez-Lozi, C, 2012

MATERIALES Y MÉTODOS

	proteína YFP para ensayos de BiFC.	PCR8/GW/TOPO-SOC1 con el vector pYFC43.	
pYFC43-GBF3	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(C')YFP-GBF3 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-GBF3 con el vector pYFC43.	Este trabajo.
pYFC43-TFL1	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(C')YFP-TFL1 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-TFL1 con el vector pYFC43.	Méndez-Lozi, C, 2012
pYFN43-FD	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(N')YFP-FD Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-FD con el vector pYFN43.	En el laboratorio.
pYFN43-AG	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(N')YFP-AG Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-AG con el vector pYFN43.	Balanzá <i>et al.</i> , 2014
pYFN43-GBF3	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(N')YFP-GBF3 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-GBF3 con el vector pYFN43.	Este trabajo.
pYFN43-TFL1	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayos de BiFC.	(N')YFP-TFL1 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido PCR8/GW/TOPO-	Zambrano-Rodríguez, A, 2013

MATERIALES Y MÉTODOS

		TFL1 con el vector pYFN43.	
GFP			
pMDC43-GBF3	Generación de construcciones de fusión al gen GFP.	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-GBF3 y el vector pMDC43.	Este trabajo.
pMDC43-TFL1	Generación de construcciones de fusión al gen GFP.	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO-TFL1 y el vector pMDC43.	En el laboratorio.
pMOG800		Vector que contiene el gen GFP bajo el control del promotor 35S	Carmen Hernández, IBMCP
CRISPR			
pHEE401_3sgRNA_gbf1_gbf2	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>GBF1</i> y <i>GBF2</i> .	Obtenido mediante clonaje <i>Golden Gate</i> siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015	Este trabajo.

2.3.3. Obtención de construcciones

Todas las construcciones de sobreexpresión generadas en este trabajo se obtuvieron mediante la utilización del sistema de clonación comercial basado en la tecnología *Gateway* (*Thermo*), con excepción de la construcción de sobreexpresión del gen *MYB3* para la que se utilizó la tecnología *In-Fusion* (*Takara*). En todos los casos se siguieron las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Las construcciones realizadas para la generación de mutantes CRISPR se obtuvieron mediante el sistema de clonación *Golden Gate* según el protocolo descrito por (Wang *et al.*, 2015).

2.3.3.1. Sistema de clonación basado en la tecnología *Gateway*

La tecnología *Gateway* es un método de clonación universal que aprovecha las propiedades de recombinación específicas de sitio del fago lambda (Landy, 1989) y que permite mover el gen de interés a múltiples vectores. Los vectores de clonación *Gateway* tienen sitios específicos de recombinación (*att*). En los vectores *entry*, como el vector pCR8/GW/TOPO, el inserto se

MATERIALES Y MÉTODOS

introduce entre los sitios attL. Una vez se ha generado el clon entry y, se ha verificado que el inserto se ha insertado en la orientación correcta, se lleva a cabo una reacción de recombinación usando la enzima LR Clonasa II de Gateway (Invitrogen) para transferir el gen de interés desde el clon entry a cualquier vector de destino Gateway con extremos attR (Ver **Tabla 8**; pMDC32, pMDC43, pYFN43 y pYFC43).

Esta tecnología se utilizó para generar las construcciones de sobreexpresión utilizadas en este trabajo, tanto para generar líneas de sobreexpresión de Arabidopsis, como para las de los ensayos de expresión transitoria en *N. benthamiana*.

2.3.3.2. Sistema de clonación basado en la tecnología *In-Phusion*

La tecnología de clonación *In-Phusion* está diseñada para la clonación rápida y direccional de uno o más fragmentos de DNA en cualquier vector. Se basa en la capacidad del enzima *In-Phusion* para fusionar fragmentos de ADN de manera eficiente y precisa (por ejemplo, insertos generados por PCR y vectores linearizados) mediante el reconocimiento de 15-pb solapantes en sus extremos los cuales pueden ser generados durante el diseño de los cebadores para la amplificación de las secuencias deseadas. Esta tecnología se utilizó concretamente para generar la construcción pMDC32-MYB3 para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión.

2.3.3.3. Sistema de clonación *Golden Gate*

La tecnología *Golden Gate* es un sistema de clonación molecular que permite ensamblar múltiples fragmentos de ADN de forma simultánea y direccionalmente. Se basa en el uso de enzimas de restricción del tipo IIS que cortan fuera de la región que reconocen y, por tanto, generan extremos no palindrómicos y el uso de una T4 ADN ligasa. La generación de sitios no palindrómicos fuera de la región reconocida por las enzimas de restricción permite el diseño de cebadores específicos que introduzcan el sitio de unión del enzima seguido por la región que se desea utilizar como punto de unión para el siguiente fragmento. Debido a la cantidad de combinación posibles hace que este sistema sea específico. Además, debido a que estas enzimas cortan fuera del sitio de unión hacen que este sistema sea irreversible.

El sistema de clonación *Golden Gate* se ha usado para la obtención de los pHEE401 que contienen los gRNA necesarias para la modificación genética de *GBF1* y *GBF2* por el sistema CRISPR-Cas9 siguiendo el protocolo descrito en Wang et al. (Ver **Tabla 8**, pHEE401_sgRNA; ver **Anexo, Tabla S1**, cebadores CRISPR/Cas9).

2.4. Secuenciación

MATERIALES Y MÉTODOS

La secuenciación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR para ser utilizados en el clonaje, así como en la selección de mutantes CRISPR/*Cas9*, se llevaron a cabo en el “Servicio de Secuenciación de ADN” del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (UPV-CSIC, Valencia) con el secuenciador capilar basado en la tecnología Sanger “ABI 3130 XL” (Applied). La preparación de las muestras de ADN se llevó a cabo siguiendo las indicaciones especificadas en www.ibmcp.upv.es.

Para la secuenciación se utilizaron tanto cebadores específicos de los vectores plasmídicos como de los fragmentos de ADN sometidos al análisis (ver **Anexo, Tabla S1**).

2.5. Estudios de expresión

2.5.1. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se utilizó para determinar el nivel relativo de expresión génica. Para ello se diseñaron cebadores específicos para cada gen (**Anexo, Tabla S1**) por medio del software Primer 3 Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) y Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los parámetros se ajustaron a las siguientes condiciones: amplicones de 180-300pb, temperatura de hibridación entre 58-62°C y contenido en GC entre 40-60%.

El cálculo de la eficiencia de las parejas de cebadores se realizó mediante RT-qPCR usando como molde diluciones seriadas (1, 1/5, 1/25 y 1/125) de cDNA. Se consideraron válidas aquellas parejas de cebadores cuya eficiencia de amplificación estuvo entre 90-110% y, también se tuvo en cuenta para la selección de las parejas de cebadores, que en el ensayo no se generaran dímeros de cebadores o amplicones inespecíficos. Las reacciones de PCR cuantitativa se prepararon en placas “*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*” (Applied Biosystems) en un volumen final de 10 µL, que incluía 2 µL de cDNA molde, 2µL de “*Premix PyroTaq Eva Green qPCR Mix Plus*” (GMC) (5X), y 0,4 µL de cada cebador (5µM). Las reacciones se realizaron en un termociclador “*QuantStudio™ 3 – 96-Well 0.1 mL Block*” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el amplicón del gen de interés se cuantificó durante la fase exponencial de la reacción de PCR, en función del número de ciclos necesarios para superar un umbral de fluorescencia determinado (Ct). A partir de este valor, se calcularon los niveles de expresión relativa del gen de interés en las distintas muestras respecto a la muestra control,

MATERIALES Y MÉTODOS

normalizados con el nivel de expresión del gen constitutivo *TIP41-like* (AT4G34270; Czechowski *et al.*, 2005) en esas mismas muestras, según el método “ $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct)” (Livak y Schmittgen, 2001) mediante la siguiente fórmula:

$$2^{-\left(\frac{\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra problema)}} - \frac{\text{Ct}_{\text{gen A}} - \text{Ct}_{\text{gen constitutivo}}}{\text{(muestra control)}} \right)}$$

2.6. Transformación de cepas bacterianas

El método utilizado para transformar tanto *E. coli* como *A. tumefaciens* fue la electroporación con un “*GenePulser™*” (Bio-Rad) usando células electrocompetentes y siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de estas células electrocompetentes se llevó a cabo siguiendo el protocolo “*Pulse controller, operation instructions and applications guide, accessory for bacterial and fungal electro-transformation*” (Bio-Rad Laboratories, 1992), para *E. coli* y según Wen-Jun y Forde (1989) para *A. tumefaciens*. El pulso utilizado fue de 200 Ω , 25 μ F, 1.7kV para *E. coli* y 400 Ω , 25 μ F, 1.7kV para *A. tumefaciens*.

Como sistema alternativo a la transformación de *E. coli* por electroporación, el sistema utilizado fue el de choque térmico con células de *E. coli* de la cepa One Shot™ TOP10 (Invitrogen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

2.7. Transformación genética de plantas

2.7.1. Transformación de Arabidopsis

2.7.1.1. Transformación genética mediante inmersión floral

Para generar plantas transgénicas de Arabidopsis, se utilizaron plantas del ecotipo silvestre Col-0 para obtener las líneas de sobreexpresión de los genes *HAI1/PP2C* y *MYB3*, y para la generación de los mutantes CRISPR también plantas mutantes *gbf3*. La transformación se llevó a cabo según el protocolo de inmersión floral con las construcciones detalladas en la **Tabla 9** y siguiendo el protocolo descrito por Clough y Bent, 1998.

2.7.1.2. Selección de plantas transgénicas

La selección de los transformantes primarios (T1) se realizó mediante la siembra de las semillas procedentes de las plantas infiltradas en medio sólido MS suplementado con Higromicina y Timentina en cajas Petri de 15 cm. Se dejaron 4 días a 4°C y oscuridad para su estratificación, se pusieron en cámaras de cultivo in vitro a 23°C durante 8 horas, se taparon durante 3 días para

MATERIALES Y MÉTODOS

dejarlas en oscuridad y se destaparon, dejándolas de 7 a 10 días en cultivo *in vitro*. Posteriormente las plantas T1 resistentes, verdes y con las raíces desarrolladas, se transfirieron al invernadero y se cultivaron según las condiciones indicadas en el apartado 1.1.3.

Para llevar a cabo la estimación del número de inserciones de T-DNA en las líneas transgénicas T1, se realizó una siembra de 60 semillas T2 por línea en cajas Petri de 9cm de diámetro en medio MS con Higromicina, se dejaron crecer durante 15 días y se cuantificó el porcentaje de plantas T2 resistentes al antibiótico. Se consideró como líneas portadoras de una única inserción aquellas líneas T1 cuya progenie T2 segregó de acuerdo a una ratio 3:1.

2.7.2. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

La transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana* se utilizó para los ensayos de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) y para los de localización subcelular utilizando cepas de *A. tumefaciens* con las construcciones descritas en la **Tabla 9** siguiendo el protocolo descrito por Belda-Palazón *et al.* (2012), con algunas modificaciones.

2.7.2.1. Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)

El ensayo de BiFC se utilizó para testar in planta la interacción proteína-proteína de GFB3 con TFL1. Para este ensayo, se generaron las construcciones detalladas en la **Tabla 9** que consisten en fusiones traduccionales de las secuencias codificantes de los genes de interés a una de las dos mitades de la proteína YFP. Para ello se utilizaron los plásmidos Gateway pYFC43 y pYFN43 (**Tabla 8**; Belda-Palazón *et al.*, 2012) que contienen la mitad C-terminal (pYFP^C) y N-terminal de la proteína YFP (pYFP^N). Para más información sobre los plásmidos: <https://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>. Tras obtener las construcciones se introdujeron en *A. tumefaciens* para llevar a cabo la transformación de hojas de *N. benthamiana*.

Para el ensayo de BiFC se prepararon diferentes mezclas incluyendo combinaciones de las cepas de *A. tumefaciens* con las construcciones de las fusiones traduccionales fluorescentes cuya interacción se quiere a testar, junto a células de *A. tumefaciens* expresando la proteína P19 (supresor viral del silenciamiento génico post-transcripcional; Voinet *et al.*, 2003) y células de *A. tumefaciens* que expresan un marcador viral nuclear fusionado a la proteína mRFP (Genovés *et al.*, 2009). Estas mezclas se utilizaron para infiltrar hojas de *N. benthamiana* siguiendo el protocolo descrito en Belda-Palazón *et al.*, (2012) aunque con modificaciones en la OD600 final de cada *A. tumefaciens* en las mezclas, siendo en este caso de 0.4:0.4:0.1:0.05 (fusión

MATERIALES Y MÉTODOS

pYFP^C:fusión pYFP^N:P19:mRFP). Transcurridos 3 días tras la infiltración, se tomaron secciones de las hojas transformadas y se observaron al microscopio confocal.

2.7.2.2. Ensayo de localización subcelular

El ensayo de localización subcelular se utilizó para analizar si GFB3 y TFL1 comparten la misma localización a nivel subcelular. Para ello, se utilizaron las construcciones detalladas en **Tabla 9** que contienen la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada a la región N-terminal de la región codificante de *GBF3* y de *TFL1*, expresadas bajo el control del promotor constitutivo 35S.

El protocolo de agroinfiltración en *N. benthamiana* utilizado en el ensayo de la localización subcelular se llevó a cabo tal como se describe para los ensayos de BIFC (sección 2.6.2.1) siendo la OD600 final de cada *A. tumefaciens* en las mezclas para este ensayo de 0.8:0.1:0.05 de la proteína:P19:mRFP. Transcurridos 3 días tras la infiltración, se tomaron secciones de las hojas transformadas y se observaron al microscopio confocal.

3. GENERACIÓN Y GENOTIPADO DE LÍNEAS MUTANTES *GBF1GBF2* MEDIANTE EL SISTEMA CRISPR/CAS9

Se diseñó una construcción con las guías seleccionadas con la herramienta (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) y, que se detallan en la **Tabla 10**, y se siguió el protocolo descrito por Wang *et al.* (2015) para la obtención de las construcciones a partir de los cebadores descritos en el **Anexo, Tabla S1**.

Las plantas de Arabidopsis del ecotipo silvestre Col-0 y el alo mutante *gbf3* se agroinfiltraron, tal y como se detalla en el apartado 2.6.1.1., y se seleccionaron las plantas que contenían el inserto como se detalla en el apartado 2.6.1.2. Por último, se procedió a coger muestras de hojas jóvenes, sobre las que se realizó PCRs con los cebadores descritos en **Anexo, Tabla S1** y se procedió a su secuenciación, así como su análisis bioinformático para seleccionar las plantas mutantes con la ayuda de la herramienta bioinformática ICE CRISPR Analysis Tool, Synthego: (<https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis>).

La limpieza de las PCRs, previa a la secuenciación, se realizó poniendo 15 µL de la reacción y 13.5 µL de isopropanol al 90%, se invirtió varias veces el tubo y se centrifugó a 13.800 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se hizo un lavado con 200 µL de etanol al 70% en frío. Se dejó secar durante 2 horas y se resuspendió finalmente en 10 µL de H₂O.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 10. Guías de ARN diseñadas para dirigir la Cas-9 a los loci *GBF1* y *GBF2*.

NOMBRE	SECUENCIA	GEN	REGIÓN
Guía 25	GTACCCAGCAATGTATCCCCCGG	<i>GBF1</i>	Exón 5
Guía 8	GCTTCTGGCAAGAAGTCAAAGGG	<i>GBF1</i>	Exón 6
Guía 4	GGAGACGCCACATATAAGGCGG	<i>GBF2</i>	Intrón 7

4. ENSAYOS DE SOBREENPRESIÓN EN ARABIDOPSIS

La secuencia codificante (CDS) de los genes *HAI1/PP2C* y *MYB3* se amplificó desde cDNA de plántulas de Arabidopsis de 12 días usando la polimerasa de alta fidelidad HF Phusion (Thermo) tal y como se describe en el apartado 2.2.2. Las distintas parejas de cebadores empleadas se detallan en el (**Anexo, Tabla S1**). Para la construcción de sobreexpresión de *HAI1/PP2C* el producto de PCR se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen). Como la ADN polimerasa Phusion genera extremos romos en los productos de PCR y este vector funciona con el sistema “TA” de clonación se llevó a cabo un paso previo de adición de colas A a los amplicones, tal y como se describe en la guía de uso del fabricante. Después se llevó a cabo una reacción de recombinación LR (ver 2.3.3.1) usando pMDC32 como vector destino. Para la construcción de sobreexpresión de *MYB3* el producto de PCR se clonó directamente en el vector pMDC32, previamente linearizado, mediante el uso del enzima in-Phusion (ver 2.3.3.2). Tras verificar en *E.coli* las construcciones finales de *HAI1* y de *MYB3*, se introdujeron después en *A. tumefaciens* para proceder a transformar plantas de Arabidopsis según el procedimiento de inmersión floral como se describe en el apartado 2.7.1.1. La selección de los transformantes primarios se llevó a cabo, tal y como se describe en el apartado 2.1.2 y tras ser trasplantados a tierra se procedió a su caracterización fenotípica.

5. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LAS PLANTAS MUTANTES Y LÍNEAS TRANSGÉNICAS

5.1. Fotografía a bajo aumento

Las imágenes obtenidas de los fenotipos de líneas transgénicas y mutantes se realizaron a bajo aumento con una cámara Leica V-LUX1 y de mayor aumento con una Lupa binocular (Olympus SZ60) con un Software de análisis de imagen *Leica Application Suite* (Leica).

5.2. Técnicas de microscopía

5.2.1. Microscopía confocal

MATERIALES Y MÉTODOS

Las imágenes de microscopía confocal se realizaron en el Servicio de Microscopía del IBMCP (Valencia) donde se utilizó un Microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) con 7 líneas de láser (405, 458, 488, 514, 561, 594 y 633) acoplado a un microscopio óptico invertido con contraste de fases (Nikon Diaphot-TMD). Se utilizaron muestras frescas de hojas de *N. benthamiana* tres días tras la infiltración puestas sobre un portaobjetos de vidrio y cubiertas con un cubreobjetos usando como medio de montaje y de inclusión agua destilada. Las imágenes se montaron y analizaron usando el software Zen (Zeiss) e Fiji (<https://fiji.sc/>).

5.3. Caracterización del tiempo de floración

En este trabajo el tiempo de floración en los experimentos llevados a cabo bajo condiciones de fotoperiodo de día largo (LD) y de día corto (SD) se determinó como el número total de hojas producidas por la inflorescencia principal (Koornneef *et al.*, 1991).

6. TRATAMIENTOS CON ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA)

El tratamiento con ABA se realizó en condiciones de día corto pulverizando a las plantas una vez por semanas tras la aparición de los 2 primeros pares de hojas verdaderas con una solución de ABA al 10 μM en 10 mM de MES a pH 5,7 y 0,02% Silwet. A la tercera semana la concentración de ABA se subió a 25 μM hasta el momento en el que las plantas hicieron el “bolting” cuando se procedió al conteo del número de hojas y se finalizó el tratamiento. Para el Mock se pulverizó una vez por semana con una disolución sin ABA que contenía 10 mM de MES pH 5,7 y 0,02% de Silwet. Se sembraron como mínimo 24 plantas por genotipo (*anac102* y *myb3*) y por condición (ABA y Mock) y se utilizó el parental silvestre Col-0 como referencia. El control Col-0 fue el mismo para ambos experimentos.

7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

7.1. Análisis de secuencias obtenidas por secuenciación Sanger

El análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger se llevó a cabo a través de varias páginas web. En la **Tabla 11** se describen las páginas web y los programas usados rutinariamente para el análisis de secuencias durante la realización de este trabajo.

Tabla 11. Programas utilizados para el análisis de secuencias obtenidas por Sanger.

MATERIALES Y MÉTODOS

WEB	ORGANIZACIÓN	PROGRAMA	FINALIDAD
www.ebi.ac.uk	European Bioinformatics Institute (EMBL)	Clustal Omega	Alineamiento de secuencias
www.ncbi.nlm.nih.gov	National Center for Biotechnology Information (NCBI)	BLAST	Búsqueda de homologías
www.bioinformatics.org	Bioinformatic Organization, Inc	Reverse complement	Generar secuencias reversas y complementarias
		Restriction map	Generar mapa con los sitios de corte de las endonucleasas de restricción
www.benchling.com	Benchling	Mapa de la secuencia	Visualización de sitios de corte por endonucleasas.
		Digestión virtual	Visualización de los fragmentos de restricción obtenidos tras una digestión enzimática.
		Traducción	Generación de la secuencia proteica codificada por una secuencia.
		Alineamiento	Alineamiento de secuencias.

7.2. Análisis de las secuencias de la comparación de los ChIP-seq

Tabla 12. Programas utilizados para el análisis de las secuencias obtenidas de los ChIP-seq.

MATERIALES Y MÉTODOS

WEB	ORGANIZACIÓN	PROGRAMA	FINALIDAD
bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/	Centro Nacional de Biotecnología - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC)	Venny 2.1.0	Comparación de listas para obtener genes comunes y no comunes.
string-db.org	Consorcio STRING	STRING	Anotación de genes.
geneontology.org	National Human Genome Research Institute (NHGRI)	GO Enrichment Analysis	Análisis del enriquecimiento de términos de Ontología Genética de un listado de genes.
cytoscape.org	National Resource for Network Biology (NRNB)	Cytoscape - BiNGO	Obtención del mapa de Ontología Genética.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de significancia en los diferentes experimentos se realizaron utilizando la plataforma virtual Astatsa (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/) y el módulo *solver* de Excel (Microsoft).

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 (ANAC102)*

1.1. Análisis del patrón de expresión de *ANAC102*

Para llevar a cabo la caracterización del gen *ANAC102* procedimos en primer lugar a analizar su patrón de expresión. Para ello, inicialmente recurrimos a la información disponible en las bases de datos públicas y, posteriormente, se analizó su patrón de expresión mediante RT-qPCR, utilizando muestras del genotipo silvestre Col-0, así como de líneas con niveles de expresión de *TFL1* alterados, mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión.

1.1.1. Análisis del patrón de expresión de *ANAC102* en bases de datos de transcriptoma

En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de *ANAC102* utilizando las bases de datos públicas disponibles. Pudimos observar cómo *ANAC102* se expresa con mayor intensidad en sépalos, hojas senescentes y sobre todo en el peciolo de éstas. Además, al igual que *TFL1*, se expresa en semilla, en los entrenudos del ápice de inflorescencia, raíz y hojas de roseta (**Figuras 9 y 10**).

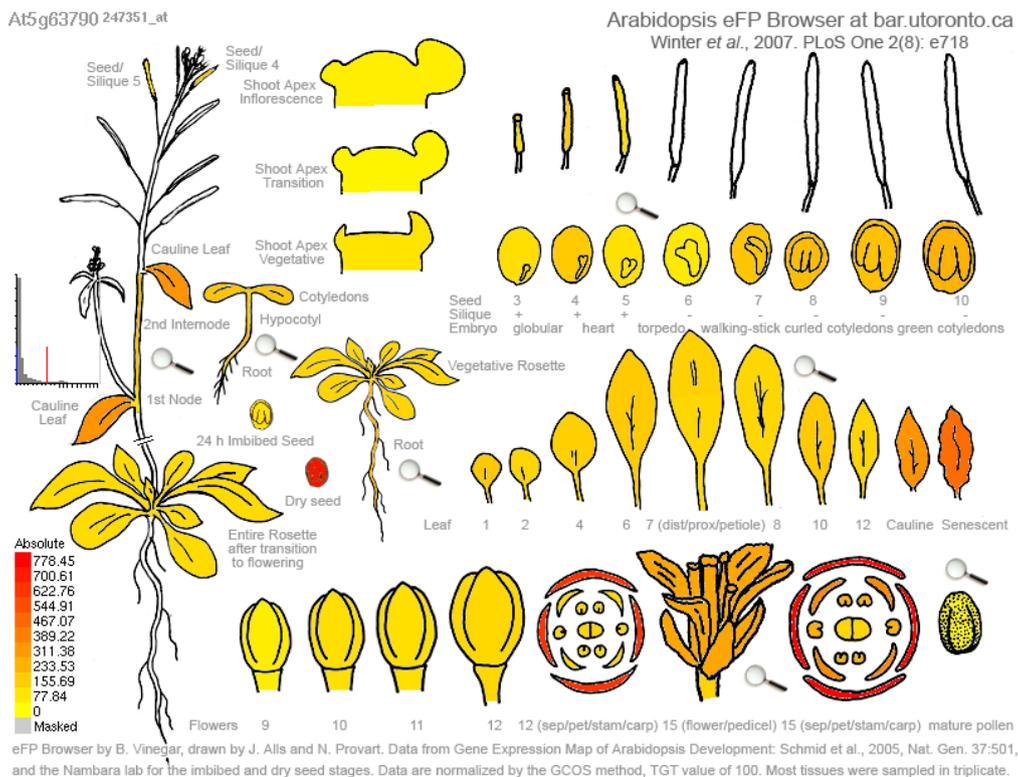


Figura 9. Patrón de expresión de *ANAC102* en *Arabidopsis*. Figura tomada del *Bio-Analytic Resource (BAR)* www.bar.utoronto.ca; resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *ANAC102* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.

RESULTADOS

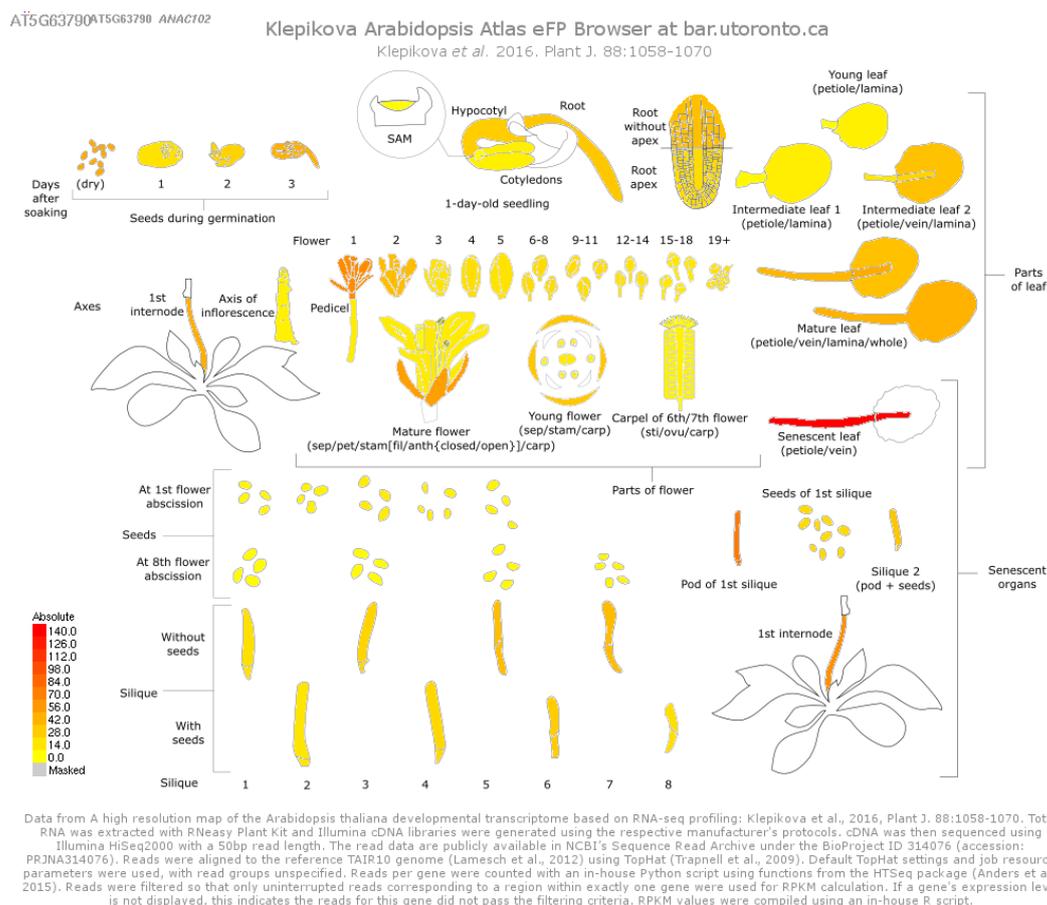


Figura 10. Patrón de expresión de ANAC102 en Arabidopsis. Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca. Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

1.1.2. Análisis del patrón de expresión de ANAC102 mediante RT-qPCR

Para profundizar en el estudio del patrón de expresión de ANAC102 se analizó, mediante RT-qPCR, cómo varía su expresión en relación con cambios en los niveles de *TFL1*, y para ello se llevaron a cabo dos experimentos. Por un lado, se analizaron los niveles de expresión de ANAC102 en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo y, por otro, se analizaron los niveles de expresión en el ápice del tallo en diferentes fases del desarrollo.

1.1.2.1. Patrón de expresión de ANAC102 en diferentes tejidos

El estudio del nivel de expresión de ANAC102 en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo se llevó a cabo sobre muestras de plántulas recogidas a los 7 días tras la germinación; muestras de tallo, sin hoja caulinar ni yemas axilares; hojas de roseta recogidas a los 12 días tras la germinación y muestras de raíces recogidas a los 21 días tras la germinación. Las muestras

RESULTADOS

provenían de plantas cultivadas *in vitro* de diferentes líneas: una línea de pérdida de función, el mutante *tfl1-1*, una línea de sobreexpresión 35S::*TFL1* y el genotipo silvestre Col-0, que se utilizó como control.

En Col-0, se observó una expresión de *ANAC102* más elevada en raíz, seguida de hoja, plántula y en menor medida en tallo. En los fondos genéticos *tfl1-1* y 35S::*TFL1* este patrón se mantuvo para hoja, tallo y plántula, sin embargo se observó un notable descenso en el nivel de expresión en raíz en ambos genotipos (**Figura 11**).

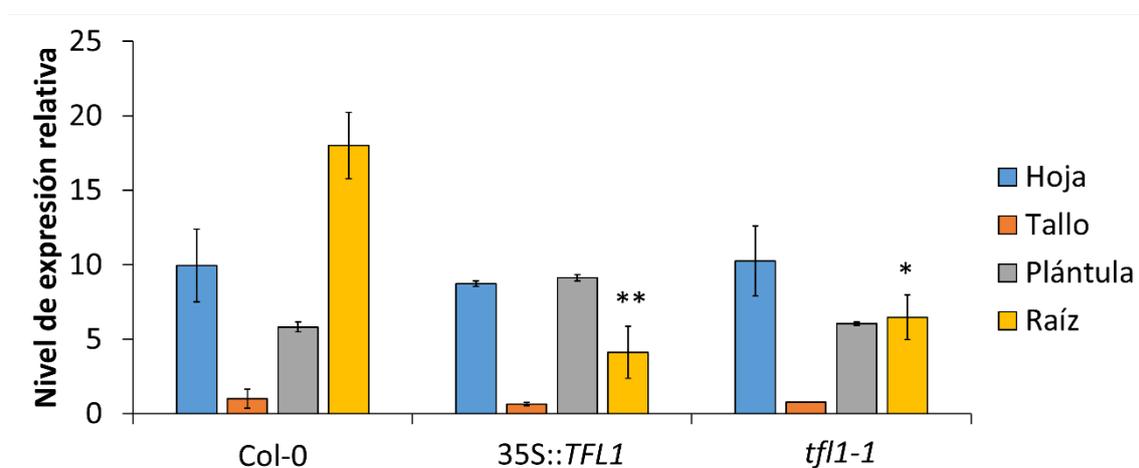


Figura 11. Expresión relativa de *ANAC102* en diferentes tejidos. Las muestras fueron recogidas de plantas crecidas en cultivo *in vitro* en condiciones de día largo. Se analizó el nivel de expresión de *ANAC102* por RT-qPCR en las muestras de los distintos tejidos de cada genotipo. El gen *TIP41* fue utilizado como gen de referencia y la muestra de tallo de Col-0 fue utilizado como muestra de referencia. Se analizaron 3 réplicas biológicas por tejido y genotipo, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. La representación gráfica se obtuvo a partir del cálculo de la media de expresión de cada muestra, y la desviación estándar se representa con las barras de error. Significancia estadística de t-student * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

1.1.2.2. Patrón de expresión de *ANAC102* en el ápice del tallo durante distintas fases del desarrollo

El nivel de expresión de *TFL1* en el SAM es débil en el meristemo vegetativo, pero éste aumenta considerablemente en el meristemo inflorescente con la transición floral. Se decidió analizar el nivel de expresión de *ANAC102* en el ápice del tallo de plantas mutantes *tfl1-1* y de plantas del genotipo silvestre durante distintas fases del desarrollo. Para ello, se sembraron las semillas en tierra y se mantuvieron durante 3 días a 4°C para que tuviera lugar la estratificación.

RESULTADOS

Posteriormente, tras ser cultivadas durante 3 semanas bajo condiciones de día corto, se transfirieron a día largo, para inducir la floración, la cual ocurre de 4 a 7 días en LD (Silvestre, M, 2020). Se tomó como tiempo cero, T0, el momento en el que fueron pasadas a LD y se recolectaron los ápices del tallo a 0, 4, 6, 8 y 10 días.

El nivel de expresión de *ANAC102* en ápices de Col-0 parece exhibir una cierta tendencia a disminuir una vez tiene lugar la transición floral mientras que en fondo *tf1-1* ocurre lo contrario, sube el nivel de expresión conforme se alcanza la fase reproductiva (**Figura 12**).

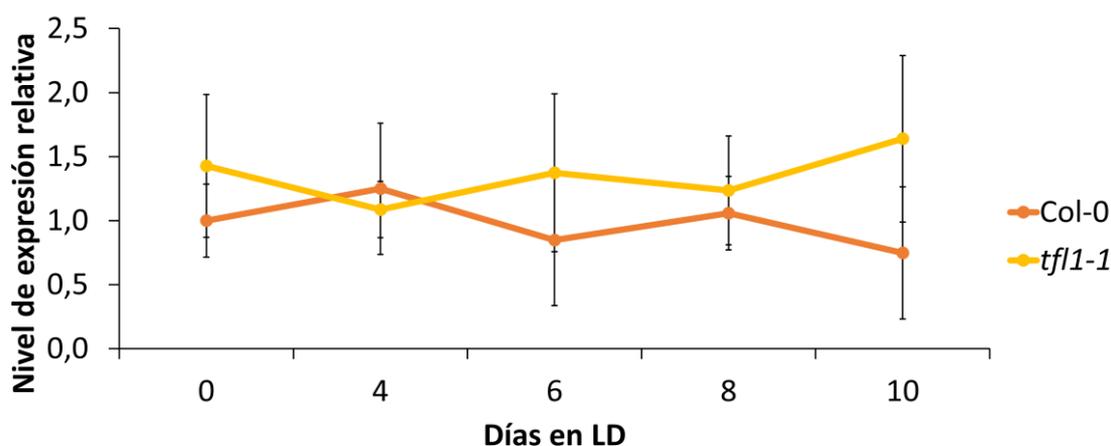


Figura 12. Expresión relativa de *ANAC102* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante *tf1-1*. Las muestras de ápices fueron recogidas de plantas crecidas en tierra durante 3 semanas en condiciones no inductivas de día corto y transferidas posteriormente a día largo, T0, momento en el que se recogieron las muestras durante un periodo de 10 días. Se analizó el nivel de expresión de *ANAC102* por RT-qPCR en las muestras recogidas a los distintos tiempos (T0, T4, T6, T8 y T10) para cada genotipo. El gen *TIP41* fue utilizado como gen de referencia y la muestra de ápices a T0 de Col-0 fue utilizada como muestra de referencia. Se analizaron 3 réplicas biológicas por genotipo y tiempo de recogida, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. La representación gráfica se obtuvo a partir del cálculo de la media de expresión de cada muestra, y la desviación estándar se representa con las barras de error.

1.2. Identificación y caracterización fenotípica del mutante *anac102*

Se llevó a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función de *ANAC102* para poder inferir en su función y su posible participación en la regulación del desarrollo y la arquitectura de Arabidopsis.

Para ello, a partir de colecciones públicas se identificaron y obtuvieron semillas de la línea de inserción de T-DNA SALK_030702C, a la cual denominamos *anac102*, con una inserción de T-DNA en el segundo exón de *ANAC102* (**Figura 13**). Plantas de la línea mutante se cultivaron en

RESULTADOS

condiciones de día largo para posteriormente analizar la presencia del T-DNA mediante PCR, usando cebadores específicos para el T-DNA y el gen (**Anexo 1, Tabla S1**). De esta forma, se seleccionaron plantas que presentaban la inserción de T-DNA en homocigosis.

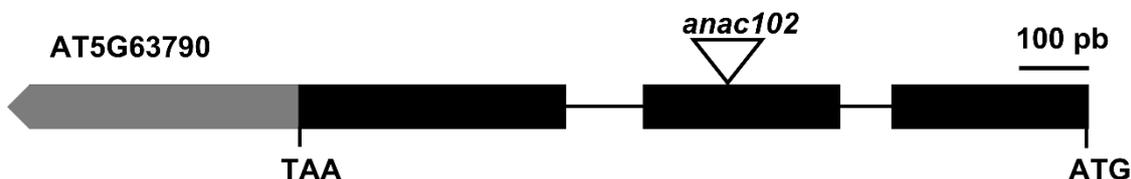


Figura 13. Esquema del gen *ANAC102* mostrando la posición del T-DNA en la línea *SALK_030702C*. Los rectángulos negros representan los exones, los rectángulos grises representan las regiones 3' y 5' UTR y, los intrones están representados por las líneas negras. El triángulo blanco representa la posición de la inserción de T-DNA. Se indica el codón ATG de inicio y el codón TAA de parada de la traducción. La barra de escala representa 100 pb.

Para llevar a cabo la caracterización fenotípica del mutante se cultivaron un mínimo de 40 plantas de cada genotipo (Col-0 como parental silvestre y el mutante homocigoto *anac102*) en condiciones de día largo y en condiciones de día corto y se determinó el tiempo de floración como el número de hojas de roseta y hojas caulinares que genera el ápice principal hasta que tiene lugar la formación de la primera flor. También se analizó la arquitectura de la planta, así como la inflorescencia, en búsqueda de alteraciones fenotípicas.

Se pudo observar la existencia de diferencias significativas en el tiempo de floración bajo condiciones de LD, mostrando el mutante *anac102* un fenotipo de floración temprana respecto al parental silvestre (**Figura 14, A y C**); sin embargo, no se observaron alteraciones en la arquitectura de la planta ni en la inflorescencia. Además, no se pudo observar diferencias fenotípicas con respecto al parental silvestre Col-0 bajo condiciones de SD. (**Figura 14, B**).

1.2.1. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante *anac102*

Para testar si la aplicación exógena de ABA intensifica las diferencias observadas en el tiempo de floración del mutante *anac102* con respecto al parental silvestre, se procedió a sembrar un mínimo de 24 plantas por genotipo y condición las cuales se cultivaron bajo condiciones de día corto y se trataron con ácido abscísico (ABA) o Mock. El tiempo de floración se contabilizó como el número total de hojas producidas por el tallo principal. Se observó como la aplicación exógena del ABA produjo un adelanto en el tiempo de floración en el caso de Col-0 pero no se observaron diferencias significativas en el caso del mutante *anac102*, indicando que no

RESULTADOS

responde al tratamiento de ABA al producir el mismo número de hojas que con el tratamiento Mock (Figura 15, A y B).

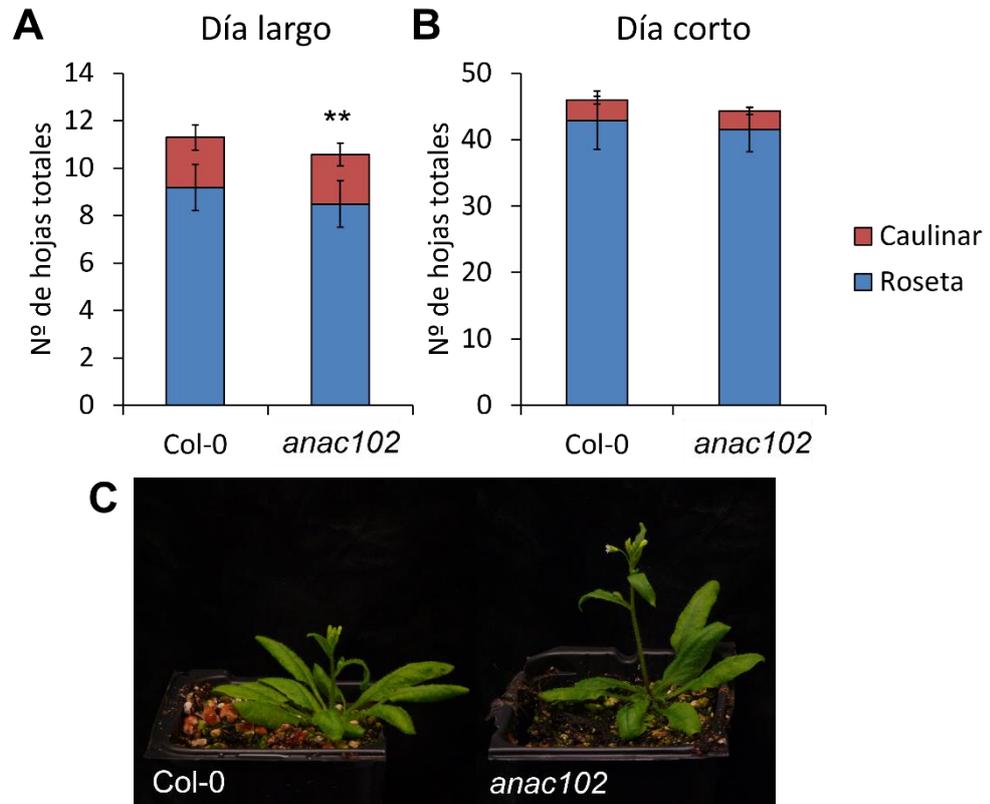
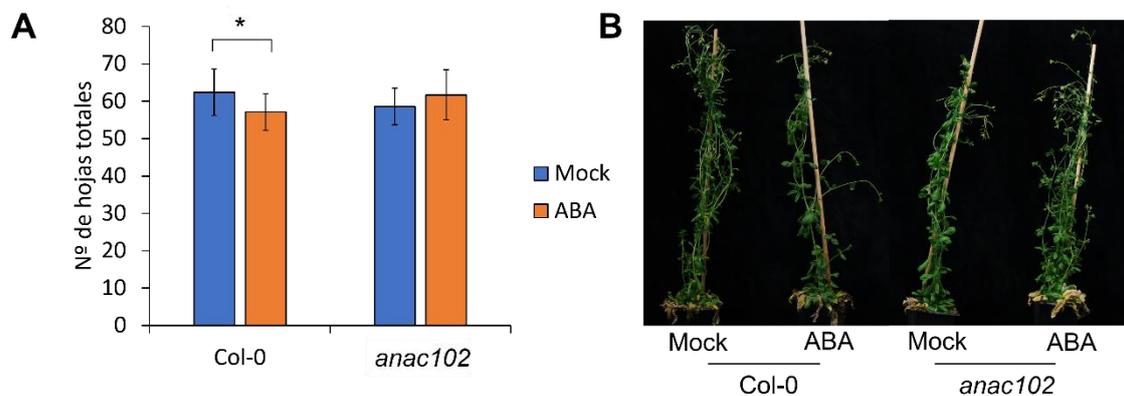


Figura 14. Fenotipo asociado al mutante *anac102*. (A y B) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en condiciones de día largo y día corto, respectivamente. Representación de la media aritmética de hojas de roseta y hojas caulinares ($n \geq 40$). Las barras de error representan la desviación estándar. (C) Plantas del parental silvestre Col-0 y del mutante *anac102* tras 3 semanas creciendo en condiciones de día largo. Significancia estadística de t-student $**p < 0.01$.



RESULTADOS

Figura 15. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante *anac102*. (A) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal de las distintas plantas cultivadas en condiciones día corto a las que se les aplicó un tratamiento con ABA o Mock. Representación de la media aritmética del número de hojas totales ($n \geq 20$). Las barras de error representan la desviación estándar. (B) Plantas del parental silvestre Col-0 y del mutante *anac102* tras 14 semanas creciendo en condiciones de día corto a las que se les ha aplicado ABA o Mock. Significancia estadística de t-student * $p < 0.05$.

2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *HIGHLY ABA-INDUCED1 (HAI1)*

2.1. Análisis del patrón de expresión de *HAI1*

Para llevar a cabo la caracterización del gen *HAI1* procedimos, en primer lugar, a analizar su patrón de expresión. Para ello recurrimos inicialmente a la información disponible en las bases de datos públicas y, posteriormente, se analizó su patrón de expresión mediante RT-qPCR utilizando muestras del genotipo Col-0, así como, de líneas con niveles alterados de expresión de *TFL1*, mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión.

2.1.1. Análisis del patrón de expresión de *HAI1* en bases de datos de transcriptoma

Para empezar, analizamos el patrón de expresión de *HAI1* utilizando las bases de datos disponibles. Pudimos observar cómo *HAI1* se expresa con mayor intensidad en semilla, silicua, hoja senescente y en los sépalos de flores maduras. Además, al igual que *TFL1*, su expresión en el SAM aumenta con la transición floral, al adquirir éste la identidad de meristemo inflorescente, aunque el nivel de expresión que se alcanza en el meristemo inflorescente es menor que el de *TFL1* (**Figura 16**). También coincide con *TFL1* en su expresión en semilla y silicua (**Figura 17**).

2.1.2. Análisis del patrón de expresión de *HAI1* mediante RT-qPCR

Para profundizar en el estudio del patrón de expresión de *HAI1* se analizó, mediante RT-qPCR, cómo varía su expresión en función de cambios en los niveles de *TFL1* y, para ello, se llevaron a cabo dos experimentos. Por un lado, se analizaron los niveles de expresión en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo y, por otra se analizaron los niveles de expresión en el ápice del tallo en diferentes fases del desarrollo.

2.1.2.1. Patrón de expresión de *HAI1* en diferentes tejidos

El estudio del nivel de expresión de *HAI1* en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo se llevó a cabo sobre muestras de plántula recogidas a los 7 días tras la germinación, muestras de tallo sin hoja caulinar ni yemas axilares, hojas de roseta recogidas a los 12 días tras la

RESULTADOS

germinación y muestras de raíces recogidas a los 21 días las tras la germinación. Las muestras provenían plantas de diferentes líneas cultivadas *in vitro*: una línea de pérdida de función, mutante *tfl1-1*, una línea de sobreexpresión, 35S::*TFL1*, y el genotipo silvestre Col-0, que se utilizó como control.

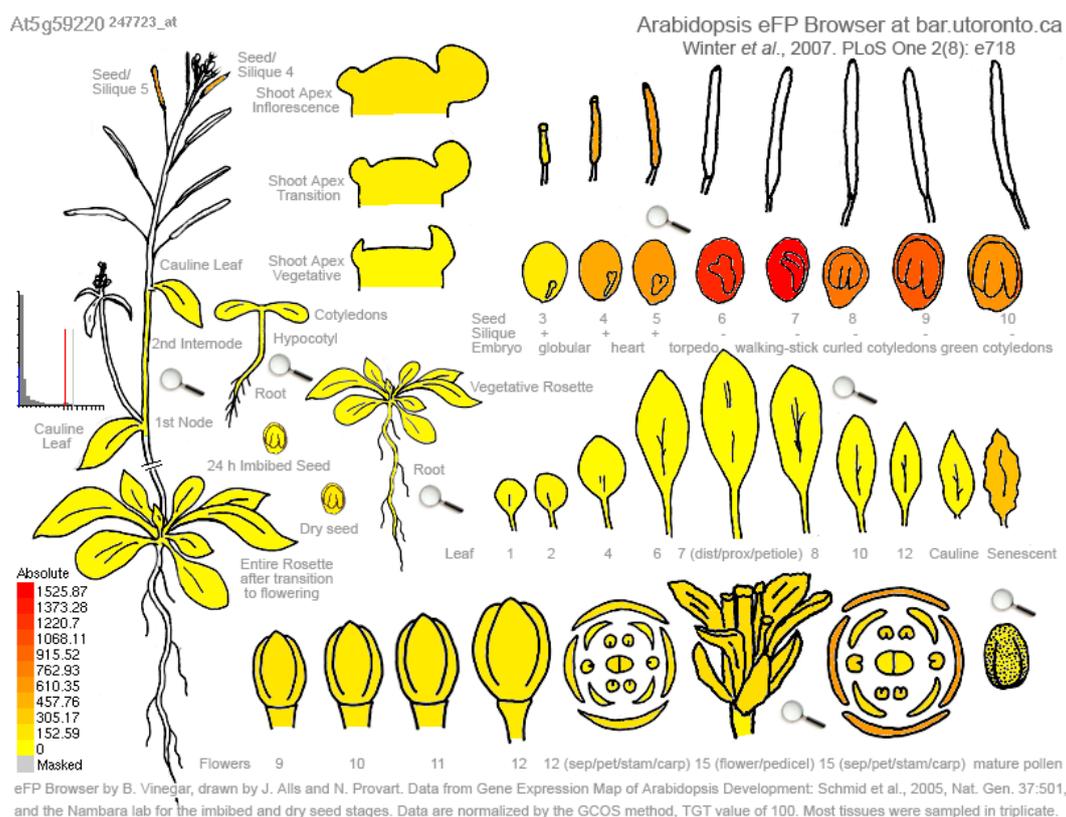


Figura 16. Patrón de expresión de *HAI1* en *Arabidopsis*. Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca; resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *HAI1* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.

La expresión de *HAI1* fue más elevada en raíz y en la plántula, siendo más baja en hoja y en tallo. Este patrón se mantenía en los diferentes fondos genéticos analizados, sin observarse diferencias significativas en los diferentes fondos genéticos (**Figura 18**).

2.1.2.2. Patrón de expresión de *HAI1* en el ápice del tallo durante distintas fases del desarrollo

El nivel de expresión de *TFL1* en el SAM es débil durante la etapa vegetativa, pero aumenta considerablemente en el meristemo inflorescente con la transición floral. Se decidió analizar el nivel de expresión de *HAI1* en el ápice del tallo de plantas mutantes *tfl1-1* y de plantas del

RESULTADOS

genotipo silvestre durante distintas fases del desarrollo. Para ello, se sembraron las semillas en tierra y se mantuvieron durante 3 días a 4°C para que tuviera lugar la estratificación. Posteriormente, tras ser cultivadas durante 3 semanas bajo condiciones de día corto se transfirieron a día largo, para inducir la floración, que tiene lugar de 4 a 7 días en LD (Silvestre, 2020). Se tomó como tiempo cero, T0, el momento en el que se pasaron a LD y se recolectaron los ápices del tallo a 0, 4, 6, 8 y 10 días.

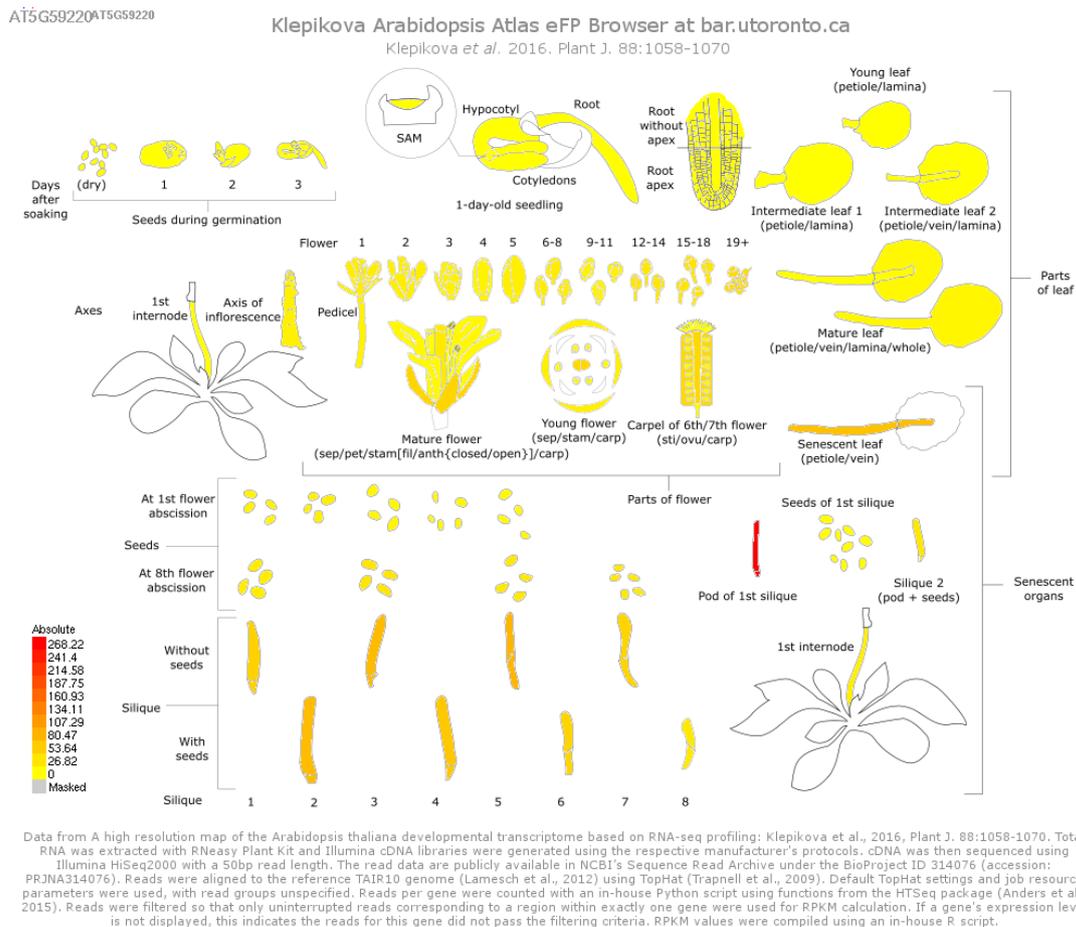


Figura 17. Patrón de expresión de *HAI1* en *Arabidopsis*. Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca. Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

Se observó que el nivel de expresión de *HAI1* en el fondo mutante *tf1-1* parece mostrar cierta tendencia opuesta con respecto al que se observa en fondo silvestre Col-0. En fondo Col-0, el nivel de expresión en la fase vegetativa es más bajo que en *tf1-1*, pero a T6, coincidiendo con la transición floral, se incrementa ligeramente para luego disminuir una vez alcanzada la fase

RESULTADOS

reproductiva. Por el contrario, la expresión de *HAI1* en el mutante *tf1-1* parece disminuir notablemente coincidiendo con la transición floral para incrementarse una vez alcanzada la fase reproductiva. (Figura 19)

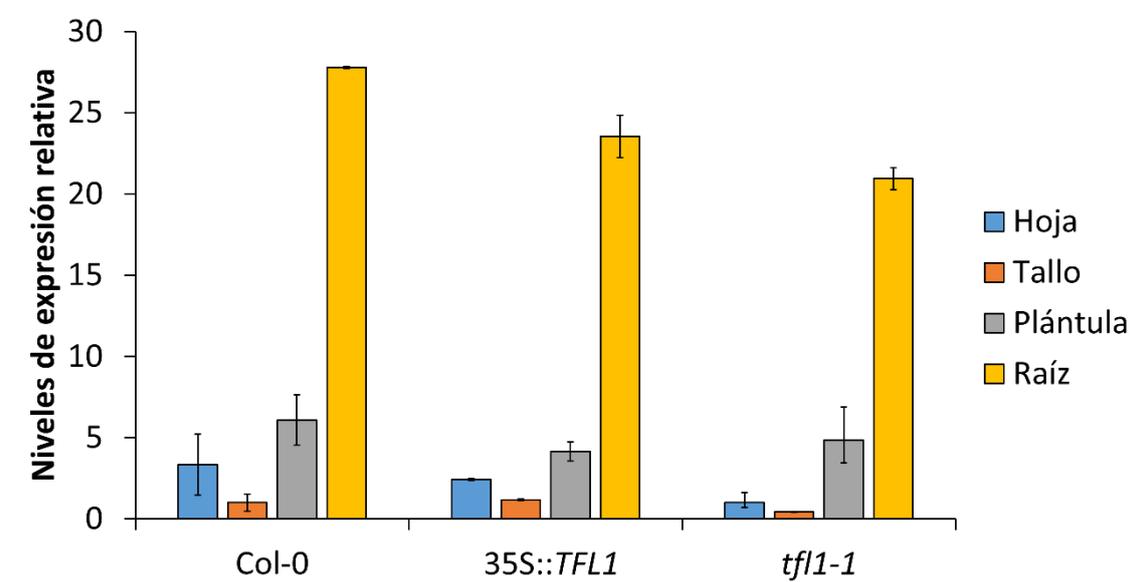
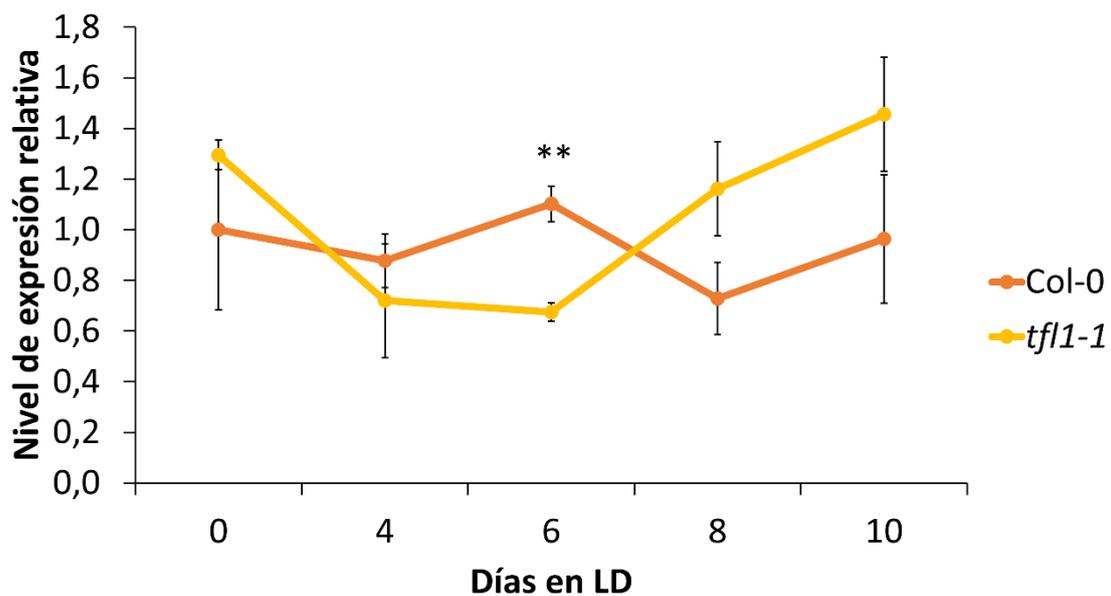


Figura 18. Expresión relativa de *HAI1* en diferentes tejidos. Las muestras fueron recogidas de plantas crecidas en cultivo *in vitro* en condiciones de día largo. Se analizó el valor de expresión relativa de *HAI1* por RT-qPCR en las muestras de los distintos tejidos de cada genotipo. El gen *TIP41* fue utilizado como gen de referencia y la muestra de tallo de Col-0 fue utilizado como muestra de referencia. Se analizaron 2 réplicas biológicas por tejido y genotipo, así como, 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. La representación gráfica se obtuvo a partir del cálculo de la media de expresión de cada muestra, y la desviación estándar se representa con las barras de error.



RESULTADOS

Figura 19. Expresión relativa de *HAI1* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante *tf1-1*. Las muestras de ápices fueron recogidas de plantas cultivadas en tierra durante 3 semanas en condiciones no inductivas de día corto y, transferidas posteriormente a día largo, T0, momento en el que se recogieron las muestras durante un periodo de 10 días. Se analizó el nivel de expresión de *HAI1* por RT-qPCR en las muestras recogidas a los distintos tiempos (T0, T4, T6, T8 y T10) para cada genotipo. El gen *TIP41* fue utilizado como gen de referencia y la muestra de ápices a T0 de Col-0 fue utilizada como muestra de referencia. Se analizaron 3 réplicas biológicas por genotipo y tiempo de recogida, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. La representación gráfica se obtuvo a partir del cálculo de la media de expresión de cada muestra, y la desviación estándar se representa con las barras de error. Significancia estadística de t-student $**p < 0.01$.

2.2. Identificación y caracterización fenotípica de los mutantes *hai1-1*, *hai1-2* y el triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1*

Para poder inferir sobre la función de *HAI1* y sobre su posible participación en la regulación del desarrollo y la arquitectura de Arabidopsis se llevó a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función de *HAI1* y de otros genes homólogos, *HAI3* y *AIP1*. Las semillas de las líneas mutantes *hai1-1* (SALK_142672), *hai1-2* (SALK_108282) (**Figura 20, A**) y del triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1* (**Figura 20, A, B y C**) que presentaban las inserciones de T-DNA en homocigosis fueron cedidos por el Dr. José León (IBMCP).

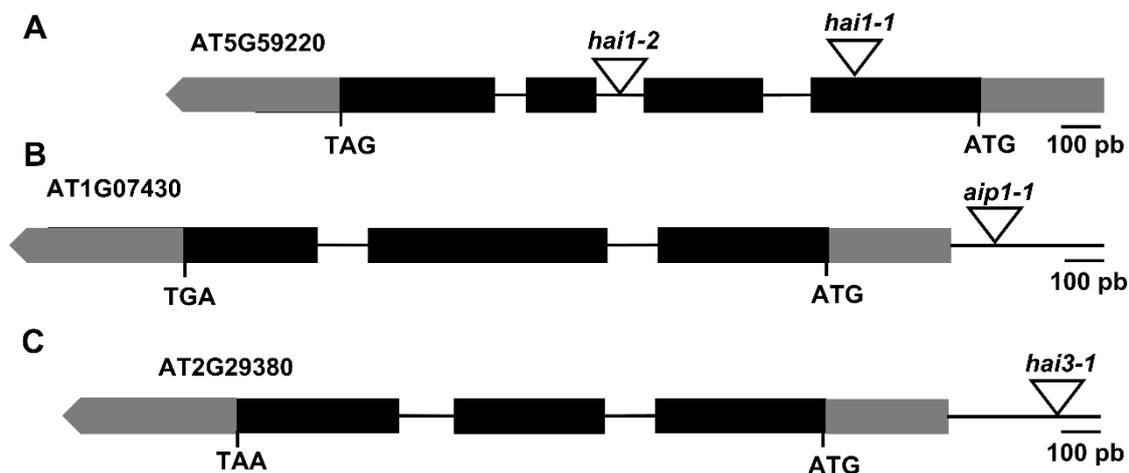
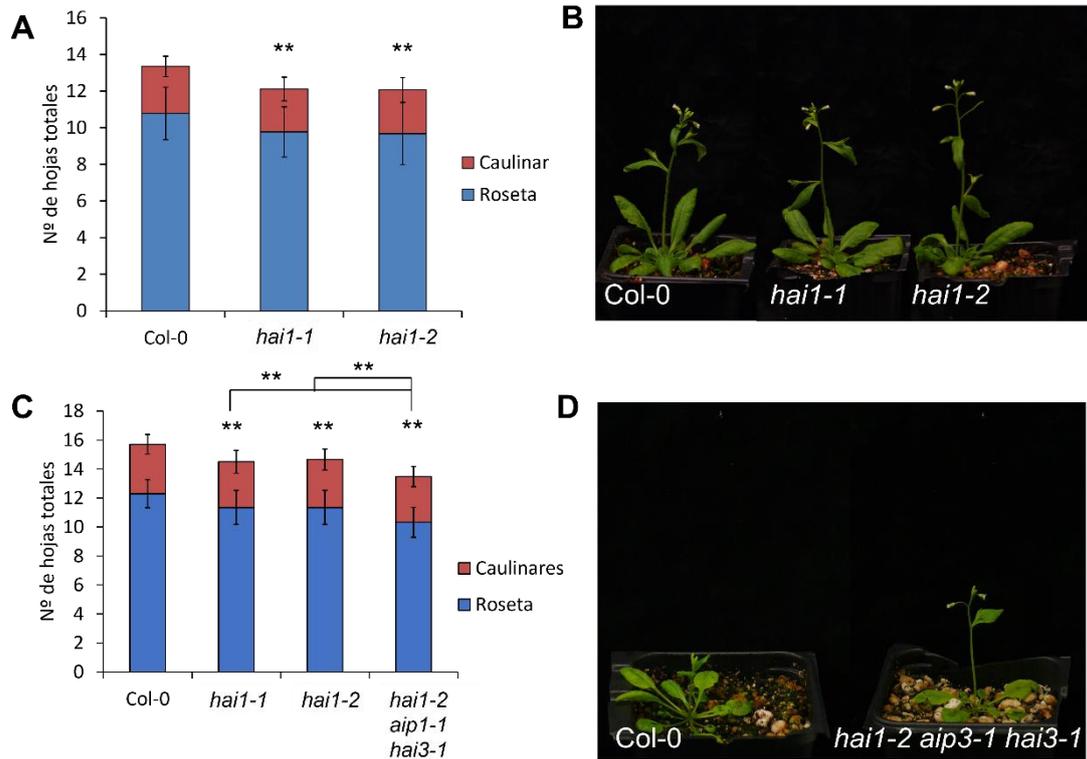


Figura 20. Esquema del gen *HAI1*, *AIP1*, *HAI3* mostrando la posición del T-DNA. (A) Esquema del gen *HAI1* con las inserciones de T-DNA en la línea SALK_108282 (*hai1-2*) y SALK_142672 (*hai1-1*). (B y C) Esquema del gen *AIP1* y *HAI3* con las inserciones de T-DNA de los alelos presentes en el triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1*. Los rectángulos negros representan los exones, los rectángulos grises representan las regiones 3' y 5' UTR y los intrones están representados por las líneas negras. Los triángulos blancos representan la posición de las inserciones de T-DNA. Se indica el codón ATG de inicio y los codones TAG, TGA y TAA de para de la traducción. La barra de escala representa 100 pb.

RESULTADOS

La caracterización fenotípica del mutante se llevó a cabo sembrando un mínimo de 40 plantas por cada genotipo en condiciones de día largo y en condiciones de día corto. Se realizó un experimento en condiciones de día largo con los mutantes simple *hai1-1*, *hai1-2* y *hai1-2aip1-1 hai3-1*. Por otro lado, se realizó otro experimento independiente con los mutantes *hai1-1* y *hai1-2*. Se midió el tiempo de floración como el número de hojas de roseta y hojas caulinares que genera el tallo principal hasta que tiene lugar la formación de la primera flor. También se analizó la arquitectura de la planta, así como la inflorescencia, en búsqueda de alteraciones fenotípicas.

Los mutantes *hai1-1* y *hai1-2* no presentaron diferencias fenotípicas con respecto al parental silvestre Col-0 cuando se crecieron bajo condiciones de SD (**Figura 21, E**). Sin embargo, ambos mutantes mostraron un fenotipo de floración temprana cuando se crecieron en condiciones de LD (**Figura 21, A, B, C**). Además, el triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1* mostró un fenotipo de adelanto del tiempo de floración más acusado que el de los mutantes simples (**Figura 21, C, D**).



RESULTADOS

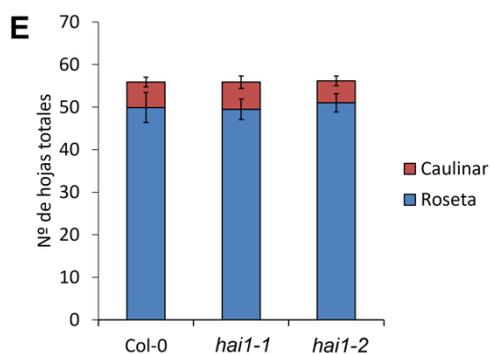


Figura 21. Fenotipo asociado a los mutantes *hai1-1*, *hai1-2* y *hai1-2aip1-1hai3-1*. (A y C) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en condiciones de día largo en dos experimentos independientes. (B) Plantas cultivadas 3 semanas en día largo. (D) Plantas cultivadas 2 semanas en día largo. (E) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en condiciones de día corto. Representación de la media aritmética de hojas de roseta y hojas caulinares ($n \geq 40$). Las barras de error representan la desviación estándar. Significancia estadística de t-student $**p < 0.01$.

2.3. Generación de líneas de sobreexpresión de *HAI1* en *Arabidopsis*

La sobreexpresión de un gen es una herramienta que permite estudiar su función, basándonos en los fenotipos asociados a la ganancia de su función, y complementa la información de datos fenotípicos obtenidos de los mutantes de pérdida de función.

Se procedió, por tanto, a la generación de una construcción 35S::*HAI1* donde la región codificante del gen *HAI1* se clonó en el vector de expresión en plantas pMDC32 bajo el control del promotor 2x35S y, posteriormente, se procedió a su transformación por infiltración en plantas del genotipo silvestre Col-0. Como resultado de la transformación de Col-0 con la construcción 35S::*HAI1* se obtuvieron 47 plantas T1 independientes capaces de crecer en medio de selección con Higromicina que se transplantaron a tierra y se cultivaron bajo condiciones de LD. Se realizó un primer análisis en esta población de plantas transgénicas T1 en busca de fenotipos relacionados con el tiempo de floración y/o la arquitectura de la planta. Esta caracterización fenotípica permitió identificar dos líneas, la #16 y la #17, que mostraron floración tardía en comparación con el parental silvestre Col-0 (**Figura 22, A y B**), aunque no mostraron alteraciones en la arquitectura de la planta ni en la inflorescencia. Para poder continuar con el proceso de caracterización se recogieron sus semillas, así como la de otras líneas transgénicas T1 que no mostraron diferencias fenotípicas significativas con respecto al parental silvestre Col-0 para posteriores estudios.

RESULTADOS

Con el fin de determinar el número de *loci* en los que se había producido la inserción del T-DNA, se realizó el análisis de segregación de las dos líneas transgénicas con floración tardía mediante la siembra de su progenie T2 en medio de selección con Higromicina. De las dos líneas T1 35S::*HAI1* con fenotipo de floración tardía, sólo la #16 presentó una única inserción del transgén mientras que la otra mostró una segregación que correspondía a la esperada para dos o más inserciones.

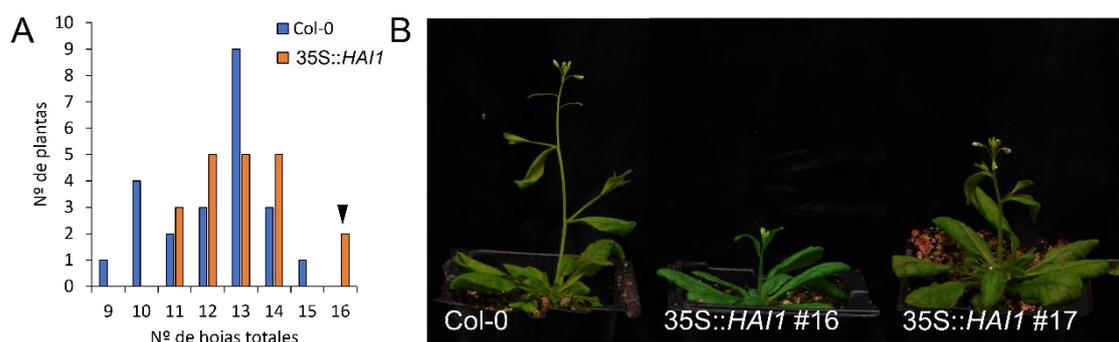


Figura 22. Fenotipo asociado a la sobreexpresión de *HAI1*. (A) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en la población de líneas transgénicas T1 35S::*HAI1* y en el parental silvestre Col-0 crecidas en condiciones de día largo. Se marca con una flecha negra las dos plantas con retraso en la floración. (B) Imágenes de plantas Col y T1 35S::*HAI1* (#16 y #17 con floración tardía) tras 3 semanas creciendo en condiciones de día largo.

3. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *MYB DOMAIN PROTEIN 3 (MYB3)*

3.1. Análisis del patrón de expresión de *MYB3*

Para analizar el patrón de expresión de *MYB3* recurrimos, en primer lugar, a la información disponible en las bases de datos públicas y, posteriormente, se analizó su patrón de expresión mediante RT-qPCR utilizando muestras del genotipo Col-0, así como de líneas con niveles alterados de *TFL1*, mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión.

3.1.1. Análisis del patrón de expresión de *MYB3* en bases de datos de transcriptoma

En primer lugar, analizamos el patrón de expresión de *MYB3* utilizando las bases de datos públicas disponibles. Pudimos observar cómo éste se expresa en la flor madura, en todos los órganos florales, principalmente en pétalos y estambres. Además, al igual que *TFL1*, se expresa en semilla. (Figuras 23 y 24).

RESULTADOS

3.1.2. Análisis del patrón de expresión de *MYB3* mediante RT-qPCR

Para profundizar en el estudio del patrón de expresión de *MYB3* se analizó, mediante RT-qPCR, cómo varía su expresión en función de cambios en los niveles de *TFL1* y para ello se llevaron a cabo dos experimentos. Por un lado, se analizaron los niveles de expresión en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo y, por otra se analizaron los niveles de expresión en el ápice del tallo en diferentes fases del desarrollo.

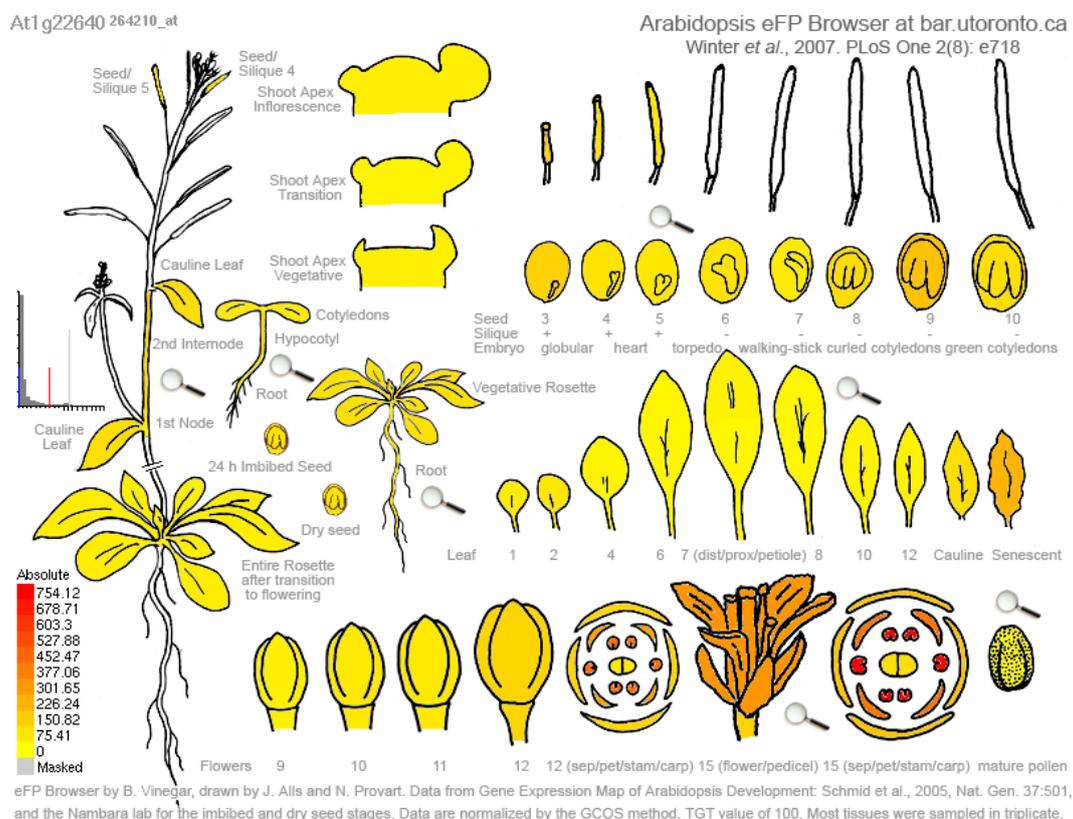


Figura 23. Patrón de expresión de *MYB3* en *Arabidopsis*. Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca; resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *MYB3* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.

3.1.2.1. Patrón de expresión de *MYB3* en diferentes tejidos

El estudio del nivel de expresión de *MYB3* en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo se llevó a cabo con muestras de plántula recogidas a los 7 días tras la germinación, muestras de tallo sin hoja caulinar ni yemas axilares, de hojas de roseta recogidas a los 12 días tras la germinación, y muestras de raíces recogidas a los 21 días tras la germinación. Las muestras

RESULTADOS

provenían de plantas cultivadas *in vitro* de diferentes líneas: una línea de pérdida de función de *TFL1*, mutante *tf1-1*, una línea de sobreexpresión, 35S::*TFL1* y el genotipo silvestre Col-0, que se utilizó como control.

En la RT-qPCR, se detectó una elevada variabilidad entre resultados de las réplicas biológicas para cada tejido y genotipo probablemente debido a una amplificación inespecífica de los cebadores en los distintos tejidos utilizados, variabilidad que no fue detectada durante el análisis previo de la eficiencia de los cebadores que se realizó sobre muestras de ápice del tallo, donde no se observó esa amplificación inespecífica. Esta alta variabilidad no nos permitió extraer conclusiones sobre el nivel de expresión de *MYB3* en distintos tejidos.

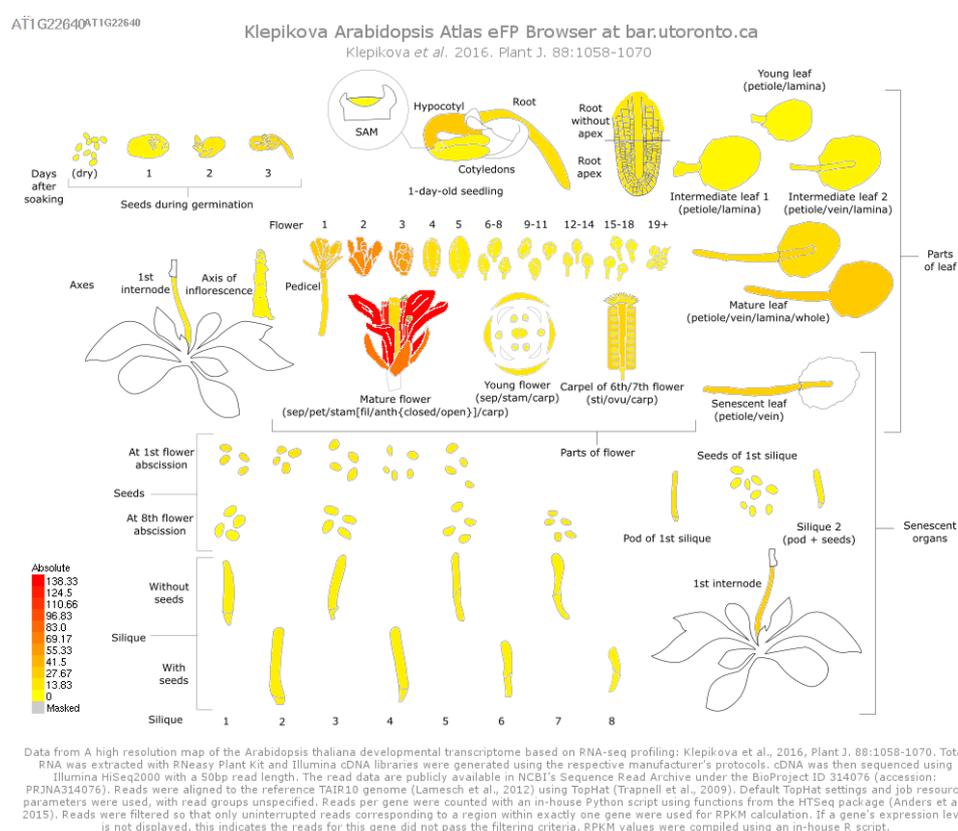


Figura 24. Patrón de expresión de *MYB3* en Arabidopsis. Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) www.bar.utoronto.ca. Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

RESULTADOS

3.1.2.2. Patrón de expresión de *MYB3* en el ápice del tallo durante distintas fases del desarrollo

Se analizó el nivel de expresión de *MYB3* en el ápice del tallo de plantas mutantes *tfl1-1* y de plantas de genotipo silvestre durante distintas fases del desarrollo. Para ello, se sembraron las semillas en tierra y se mantuvieron durante 3 días a 4°C para que tuviera lugar la estratificación. Posteriormente, tras ser cultivadas durante 3 semanas bajo condiciones de día corto, se transfirieron a día largo, para inducir la floración, que tiene lugar de 4 a 7 días en LD (Silvestre, 2020). Se tomó como tiempo cero, T0, el momento en el fueron pasadas a LD y se recolectaron los ápices del tallo a 0, 4, 6, 8 y 10 días.

Pudimos observar que en el fondo silvestre Col-0 el nivel de expresión de *MYB3* aumenta con la transición floral hasta alcanzar su máximo a T6 y luego va decreciendo paulatinamente hasta estabilizarse en niveles similares a los de su expresión durante la fase vegetativa. Sin embargo, en *tfl1-1* los niveles de expresión de *MYB3* variaron poco y fueron inferiores a los observados en fondo Col-0, tanto a lo largo de la fase de desarrollo vegetativa como en la reproductiva (**Figura 25**).

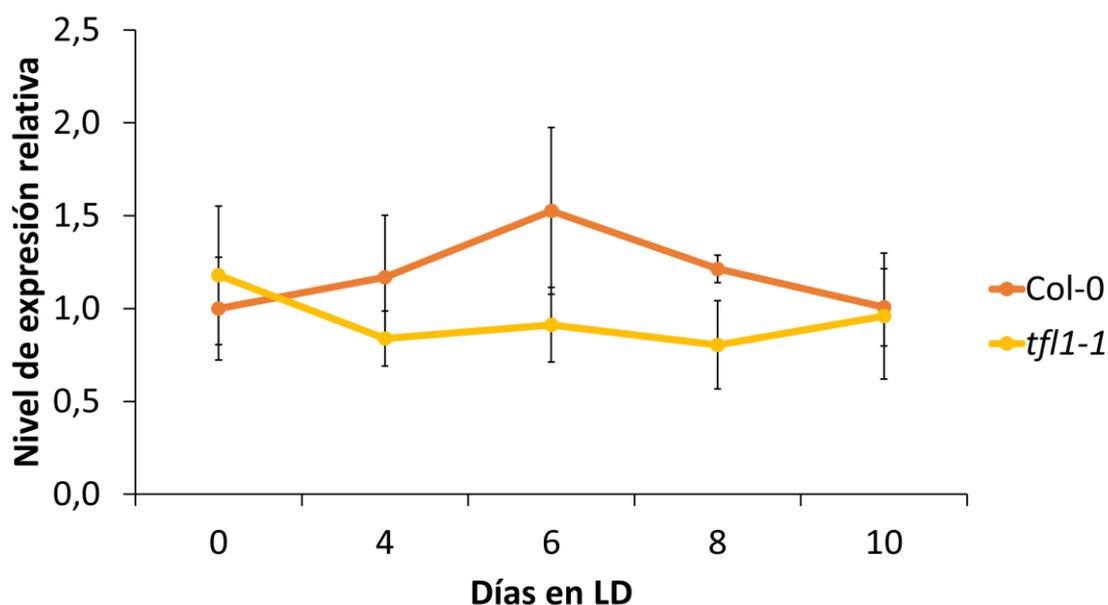


Figura 25. Expresión relativa de *MYB3* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo en Col-0 y mutante *tfl1-1*. Las muestras de ápices fueron recogidas de plantas cultivadas en tierra durante 3 semanas en condiciones no inductivas de día corto y transferidas posteriormente a día largo, T0, momento en el que se recogieron las muestras durante un periodo de 10 días. Se analizó el nivel de expresión de *MYB3* por RT-qPCR en las muestras recogidas a los distintos tiempos (T0, T4, T6, T8 y T10) para cada genotipo. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia y la muestra de ápices a T0 de Col-0 se utilizó como muestra de referencia. Se analizaron 3 réplicas biológicas por genotipo y

RESULTADOS

tiempo de recogida, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. La representación gráfica se obtuvo a partir del cálculo de la media de expresión de cada muestra, y la desviación estándar se representa con las barras de error.

3.2. Identificación y caracterización fenotípica del mutante *myb3*

Se llevó a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función de *MYB3* para poder inferir su función y su posible participación en el control del desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*.

Para ello, a partir de colecciones públicas se seleccionó y se obtuvieron semillas de la línea de inserción de T-DNA GK-815G05, a la cual denominamos *myb3* (Figura 26). Plantas de la línea mutante se cultivaron en condiciones de día largo para posteriormente analizar la presencia del T-DNA, mediante PCR con cebadores específicos para el gen (Anexo I, Tabla S1). De esta forma, se seleccionaron las plantas que presentaban la inserción de T-DNA en homocigosis.

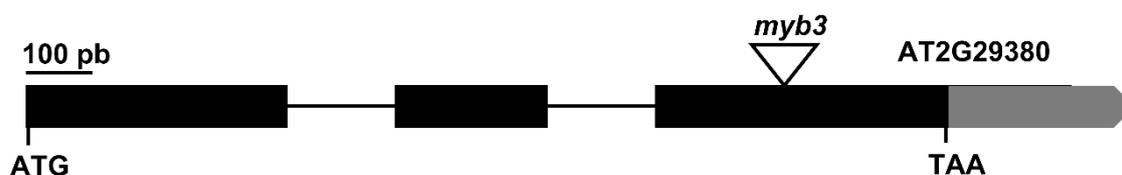


Figura 26. Esquema del gen *MYB3* mostrando la posición del T-DNA en la línea GK-815G05. Los rectángulos negros representan los exones, los rectángulos grises representan las regiones 3' y 5' UTR y los intrones están representados por las líneas negras. El triángulo blanco representa la posición de la inserción de T-DNA. Se indica el codón ATG de inicio y el codón TAA de parada de la traducción. La barra de escala representa 100 pb.

Para la caracterización fenotípica del mutante, se sembraron un mínimo de 40 plantas por cada genotipo (Col-0 como parental silvestre y mutante *myb3*), que se cultivaron en condiciones de día largo, y en condiciones de día corto, y se cuantificó el tiempo de floración como el número de hojas, de roseta y caulinares, que genera el ápice principal hasta que tiene lugar la formación de la primera flor. También se analizó la arquitectura de la planta, así como la inflorescencia, en búsqueda de alteraciones fenotípicas.

Se pudo observar la existencia de diferencias significativas en relación al tiempo de floración, tanto bajo condiciones de LD (Figura 27, A y B) como de SD (Figura 27, C y D), mostrando en ambos casos el mutante *myb3* un retraso en la floración respecto al parental silvestre; sin

RESULTADOS

embargo, no se observaron alteraciones en la arquitectura de la planta ni de la inflorescencia en ninguna de las condiciones estudiadas.

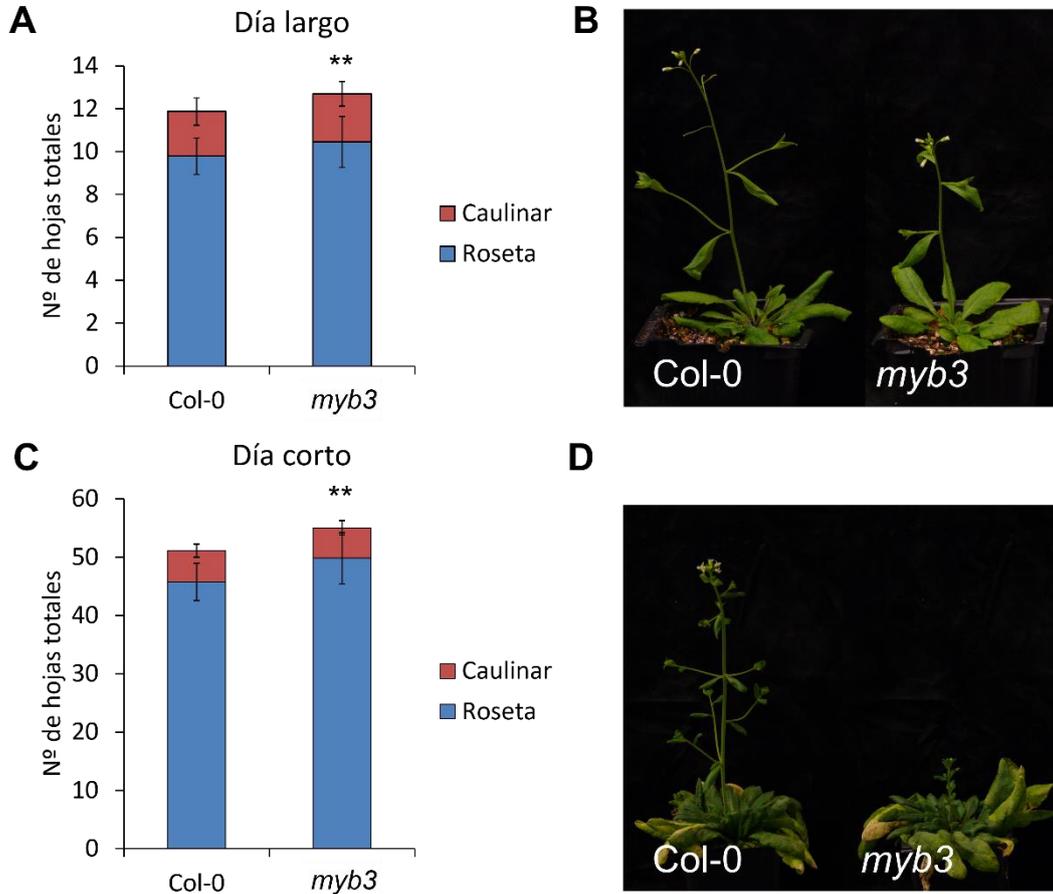


Figura 27. Fenotipo asociado al mutante *myb3*. (A y C) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en condiciones de día largo y día corto, respectivamente. (B) Plantas crecidas 3 semanas en día largo. (D) Plantas crecidas 5 semanas en día corto. Representación de la media aritmética de hojas de roseta y hojas caulinares ($n \geq 40$). Las barras de error representan la desviación estándar. Significancia estadística de t-student $**p < 0.01$.

3.2.1. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante *myb3*

Para testar si la aplicación exógena de ABA intensificaba las diferencias observadas en el tiempo de floración del mutante *myb3* con respecto al parental silvestre se procedió a sembrar un mínimo de 24 plantas por genotipo y condición, que se cultivaron bajo condiciones de día corto y se trataron con ABA o Mock. El tiempo de floración se contabilizó como el número total de hojas producidas por el ápice principal.

RESULTADOS

La aplicación exógena del ABA promueve un pequeño adelanto del tiempo de floración sobre el parental silvestre, sin embargo, el mutante *myb3* no responde al tratamiento con ABA, floreciendo tras producir un número equivalente de hojas que con el tratamiento Mock (**Figura 28**).

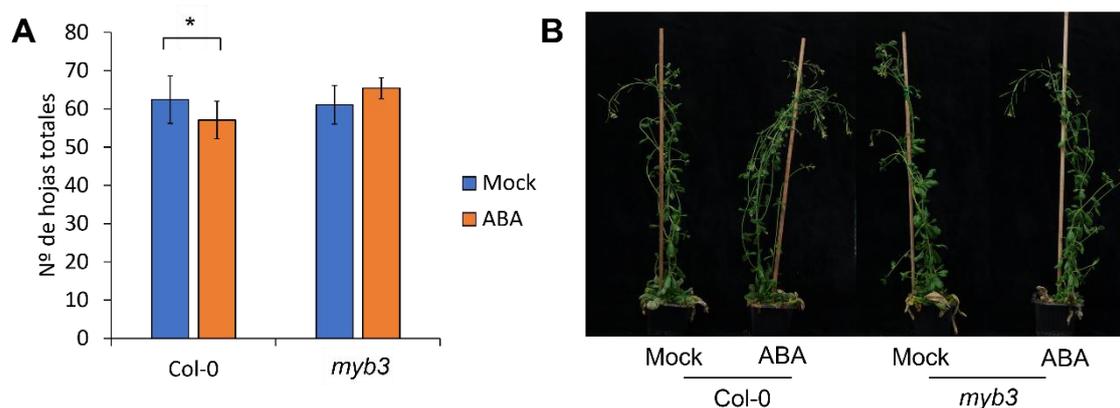


Figura 28. Efecto de la aplicación exógena de ABA sobre el mutante *myb3*. (A) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal de las distintas plantas, que se cultivaron en condiciones día corto y a las que se les aplicó un tratamiento con ABA o Mock. Representación de la media aritmética del número de hojas totales ($n \geq 20$). Las barras de errores representan la desviación estándar. (B) Plantas de Col-0 y *myb3* tras 14 semanas creciendo en condiciones de día corto a las que se les ha aplicado ABA o Mock. Significancia estadística de t-student * $p < 0.05$.

3.3. Generación de líneas de sobreexpresión de MYB3 en Arabidopsis

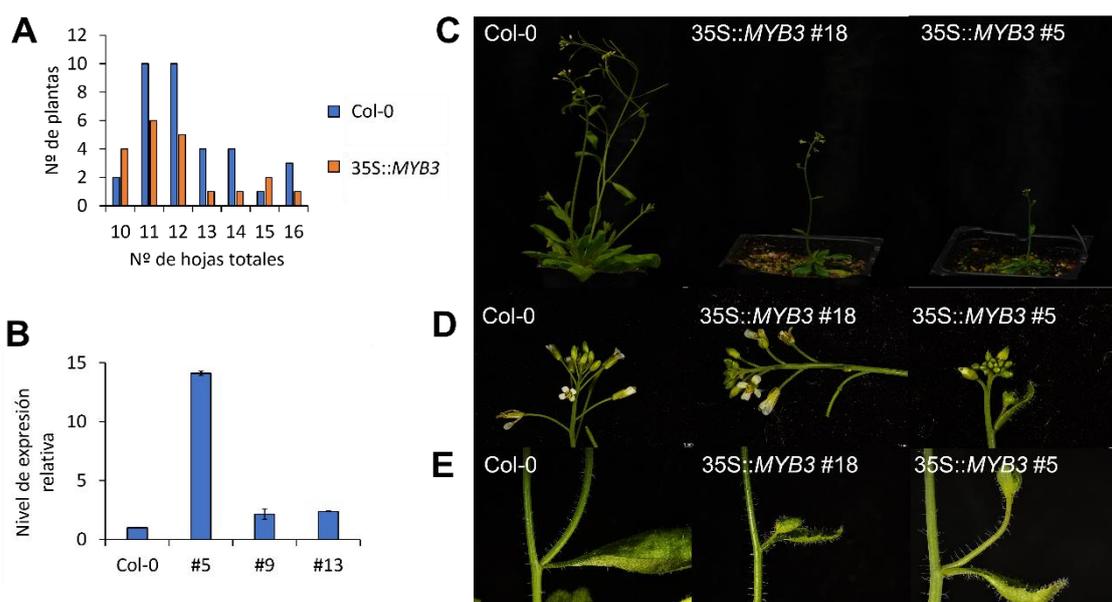
Para generar líneas de sobreexpresión de MYB3 en Arabidopsis procedimos, en primer lugar, a la generación de una construcción 35S::MYB3 donde la región codificante del gen MYB3 se clonó en el vector de expresión en plantas pMDC32 bajo el control del promotor 2x35S. Posteriormente, se procedió transformar esa construcción, por infiltración, en plantas del genotipo silvestre Col-0. Como resultado de la transformación con la construcción 35S::MYB3 se obtuvieron 36 plantas transgénicas T1 independientes, capaces de crecer en medio de selección con Higromicina, que se transplantaron a tierra y se cultivaron bajo condiciones de LD. Se realizó un primer análisis en esta población de plantas transgénicas T1 en busca de fenotipos relacionados con el tiempo de floración y/o la arquitectura de la planta. Esta caracterización fenotípica permitió identificar cinco plantas transgénicas T1 que mostraron alteraciones morfológicas evidentes respecto del parental silvestre, tales como, un crecimiento ralentizado

RESULTADOS

de la planta y una menor envergadura (**Figura 29, C**), así como, la presencia de hojas de roseta y caulinares curvadas hacia arriba (**Figura 29, E**), y un ápice principal de menor tamaño (**Figura 29, D**). Sin embargo, estas plantas no mostraron diferencias significativas con el parental silvestre Col-0 en relación al tiempo de floración (**Figura 29, A**).

Con el fin de determinar el número de *loci* en los que se había producido la inserción del T-DNA en las distintas transgénicas, se realizó el análisis de segregación de las cinco líneas T1 que mostraron las alteraciones morfológicas descritas en el párrafo anterior mediante la siembra de su progenie T2 en medio de selección con Higromicina. De las cinco líneas T1 sólo la #5 y la #18 presentaron una única inserción del transgén, mientras que las otras tres mostraron una segregación que se correspondía a la esperada para dos o más inserciones.

Puesto que la línea #5 tenía una sola copia y fue la que mostró un fenotipo más severo decidimos cuantificar por qRT-PCR los niveles de expresión de *MYB3* en plántulas de la progenie T2 de esta línea y del parental silvestre Col-0 recogidas tras 20 días desde su siembra en placas Petri con MS. Se analizó también el nivel de expresión de *MYB3* en el parental Col-0 y en la progenie T2 de dos líneas 35S::*MYB3*, la #9 y la #13, que no mostraron diferencias con las plantas control crecidas en las mismas condiciones. El análisis mostró que el nivel de expresión de *MYB3* en la línea #5, que exhibía las alteraciones morfológicas más severas, es de unas catorce veces la expresión endógena de *MYB3* detectada en el parental silvestre (**Figura 29, B**). El nivel de expresión en las líneas transgénicas que no mostraron fenotipo duplicaban el del parental silvestre Col-0, indicando que estas líneas también sobreexpresaban el transgén (**Figura 29, B**).



RESULTADOS

Figura 29. Fenotipo asociado a la sobreexpresión de *MYB3*. (A) Tiempo de floración medido como el número de hojas totales producidas por el tallo principal en la población de líneas transgénicas T1 35S::*MYB3* y en el parental silvestre Col-0 cultivadas en condiciones día largo. (B) Niveles de expresión de *MYB3* de líneas T2 35S::*MYB3* con una sola copia del transgén. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia y la muestra de Col-0 se utilizó como muestra de referencia. Se analizó 1 réplica biológica por línea, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. (C) Imágenes de plantas Col y T1 35S::*MYB3* tras 4 semanas en condiciones de día largo. (D) Detalle del ápice principal (E) Detalle de hojas caulinares. La barra representa 1 mm.

RESULTADOS

4. ESTUDIO DE GBF3 COMO MEDIADOR DE LA FUNCIÓN DE TFL1

TFL1 pertenece a la familia de las PEBPs, actuando como un regulador transcripcional por medio de interacciones con el factor de transcripción FD, de tipo bZIP (Goretti *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Resultados previos de nuestro grupo identificaron a *GBF3* como diana transcripcional directa de TFL1 (Goretti *et al.*, 2020). El mutante *gbf3* y las plantas que sobreexpresan *GBF3* y muestran defectos en el tiempo de floración, floración temprana y tardía, respectivamente, que recuerdan al efecto causado por la mutación y la sobreexpresión de *TFL1* (García, C, 2021). Asimismo, el patrón de expresión espacio-temporal de *GBF3* es similar en algunos aspectos al de *TFL1*, por ejemplo su expresión en semillas y el aumento de expresión en el ápice de inflorescencia durante la transición floral (García-García; 2021). Estos datos sugieren a *GBF3* como un buen candidato de ser un mediador de la función de TFL1.

Para profundizar en el estudio de esta posible función, en primer lugar, se procedió a generar el triple mutante *gbf1gbf2gbf3*, se continuó analizando los genes dianas compartidos por TFL1 y GBF3, se estudió la localización subcelular de ambas proteínas y se testó la posible interacción entre las proteínas TFL1 y GBF3. Finalmente, se estudió el posible papel de TFL1 y GBF3 en el control de la floración, para ello se obtuvieron los dobles mutantes *tfl1-1 gbf3* y se sobreexpresó *GBF3* en el fondo genético Col-0 y *tfl1-1*.

4.1. Obtención de mutantes triples *gbf1gbf2gbf3* por CRISPR-Cas9

GBF3 forma parte de la superfamilia de factores de transcripción de tipo bZIP de la que se han identificado 78 miembros en *A. thaliana* que se clasifican en 13 grupos, A-S (Jakoby *et al.*, 2002). *GBF3* pertenece al grupo G, distinto al grupo que incluye a FD, el grupo A. El grupo G también incluye a *GBF1* y *GBF2* con los que comparte una mayor homología, y otros dos bZIPs más (Figura 30). Ya que el fenotipo del adelanto de floración del mutante simple *gbf3* era poco severo, y pensando en una posible redundancia genética entre *GBF1*, *GBF2* y *GBF3*, nos propusimos generar un triple mutante *gbf1gbf2gbf3*.

RESULTADOS

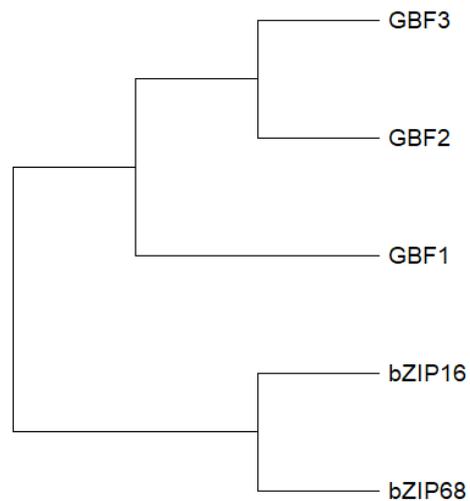


Figura 30. Árbol filogenético de bZIPs que componen el grupo G. Obtenido a partir de un alineamiento y árbol filogenético consenso generado por el método de unión de vecinos utilizando el programa MEGA: <https://www.megasoftware.net/>

En primer lugar, identificamos líneas de inserción de T-DNA para *GBF1* y *GBF2* disponibles en las colecciones públicas SALK y Gabi-KAT, sin embargo no conseguimos corroborar su genotipo. Por ello, se procedió a generar nuevos alelos mutantes utilizando para ello la tecnología de edición genética CRISPR-Cas9, según el protocolo de Wang *et al.* (2005). Se diseñaron 3 guías de gRNA, dos para *GBF1* y una para *GBF2* que se encontraban antes del dominio bZIP. Estas guías se subclonaron según el sistema de tres guías en el plásmido pHEE401, que contiene un promotor U6 específico de la célula huevo, y que contiene, además, las secuencias necesarias para expresar la proteína Cas9. Al utilizar dos guías para *GBF1* se esperaba encontrar una delección de 196 pb y para *GBF2* se esperaba la aparición de mutaciones puntuales (**Figura 31**).

RESULTADOS

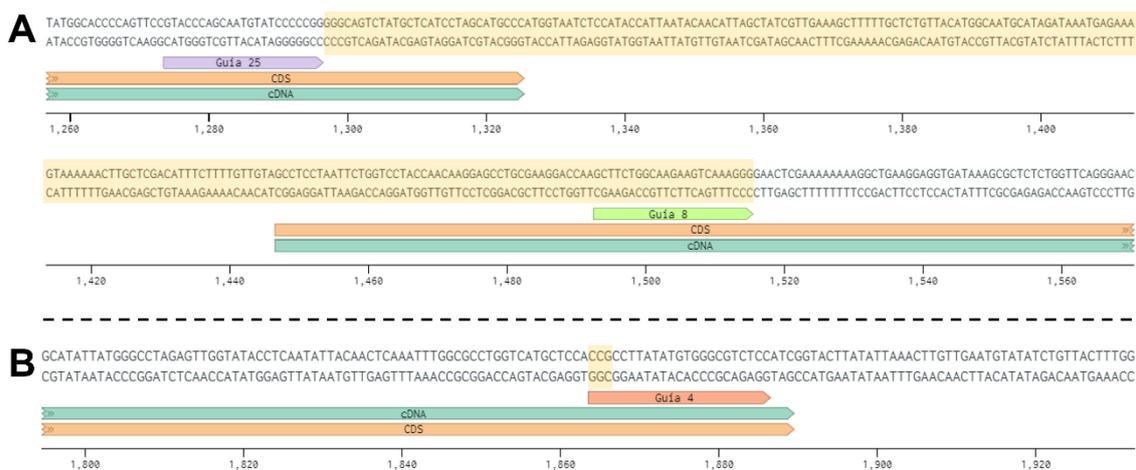


Figura 31. Esquema de las guías de sgRNA diseñadas para CRISPR-Cas9. Se muestran las sgRNA diseñadas, así como la CDS y el cDNA. El cuadro naranja marca la delección esperada. (A) Secuencia de *GBF1* y (B) secuencia de *GBF2*.

Estas construcciones se infiltraron en plantas Col-0 y *gbf3* y se seleccionaron plantas transformantes creciéndolas con el agente selectivo Higromicina. Se realizó una amplificación de *GBF1* y *GBF2* en estas plantas T1 utilizando cebadores específicos con el fin de comprobar si habían sufrido una delección de 196 pb sobre *GBF1*, pero no se encontró en ningún caso y, por ello, se procedió a la secuenciación de los fragmentos de PCR obtenidos de los genes *GBF1* y *GBF2*. Se seleccionando las líneas en fondo Col-0 que presentaban inserciones o delecciones que tuvieran un cambio en la pauta de lectura y que produjeran un codón de STOP prematuro lo que se detallan a continuación. La línea #1 homocigota con una delección de 2 nucleótidos para *GBF1* y quimera para *GBF2* con una inserción de un nucleótido, una delección de un nucleótido y un alelo silvestre, aunque los porcentajes sugieren que realmente pudiera ser heterocigota con una inserción de un nucleótido (**Figura 32, A**); la línea #7 es bialélica para *GBF1* con un alelo con una inserción de un nucleótido, y el otro con una delección de dos nucleótidos y es silvestre para *GBF2* (**Figura 32, B**); la línea #14 es bialélica para *GBF1* con un alelo con una inserción de un nucleótido y el otro alelo con una delección de dos nucleótidos y homocigota para *GBF2* con una delección de un nucleótido (**Figura 32, C**); la línea #28 es homocigota para *GBF1* con una inserción de dos nucleótidos y heterocigota para *GBF2* con una inserción de un nucleótido (**Figura 32, D**).

En el caso del fondo genético *gbf3* se seleccionó la línea #12 que presenta una delección de 3 nucleótidos para *GBF1* pero que no cambia la pauta de lectura y es bialélica para *GBF2* con una inserción y una delección (**Figura 33**).

RESULTADOS

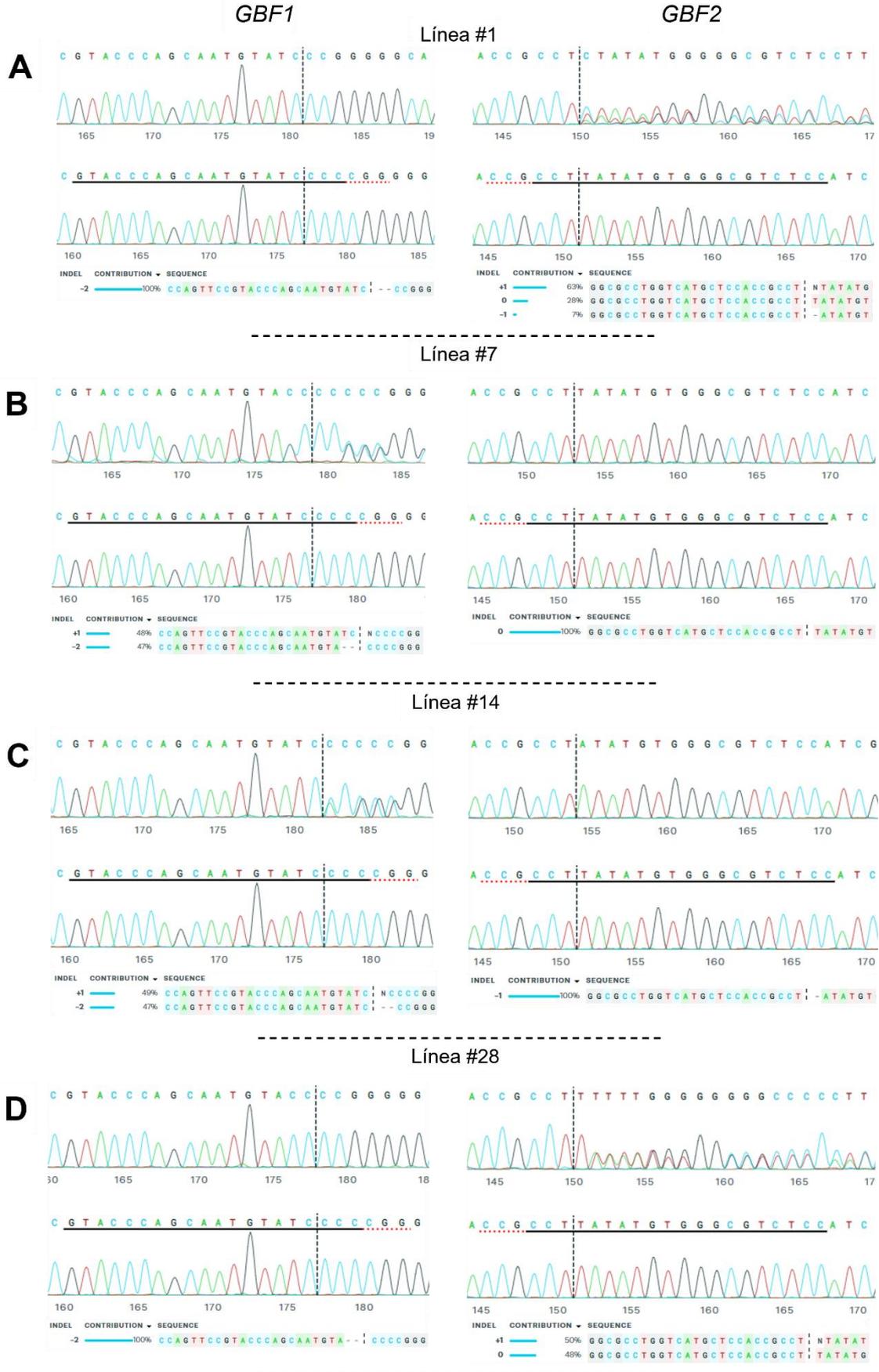
Se han seleccionado estas líneas del fondo genético Col-0 y *gbf3*, se han recogido las semillas y se ha sembrado la T2 en tierra con el objetivo de volver a secuenciar para *GBF1* y *GBF2* y comprobar que se mantiene el genotipo.

4.2. Genes diana de TFL1 y GBF3

Debido a que TFL1 no es un factor de transcripción y no puede unirse directamente a DNA, su función como represor transcripcional la ejerce actuando en un complejo con el factor de transcripción FD, de tipo bZIP (Goretti *et al.*, 2020; Hanano y Goto, 2011; Ratcliffe *et al.*, 1999). Para testar si TFL1 podría estar formando complejos con otros bZIPs como GBF3 comparamos el los resultados del análisis CHIP-seq de TFL1 (Goretti *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020a) con los del CHIP-seq de GBF3 (Song *et al.*, 2016). En el CHIP-Seq de TFL1 se identificaron 3698 genes diana, y en el de *GBF3* se encontraron 8996 genes diana. Al analizar los genes a los que se unen TFL1 y GBF3 se determinó un total de 2409 comunes, correspondiendo estos al 26,8% de los genes diana de GBF3 y al 65,1% de los genes diana de TFL1 (**Figura 34, A**). Ese número tan elevado de dianas comunes sugiere la posibilidad de que TFL1 y GBF3 puedan unirse a una parte de sus genes dianas formando un complejo transcripcional para regular su expresión.

Se procedió, por tanto, al análisis de Ontología Genética (GO, por sus siglas en inglés) de los genes diana comunes de TFL1 y GBF3 (**Figura 34-B**). Tal y como se pudo observar, hay un enriquecimiento de términos relacionados con la regulación biológica tales como: regulación de la expresión génica, regulación de factores de transcripción, regulación de procesos metabólicos, así como la biosíntesis de trehalosa, azúcar que participa en la regulación de la floración (Wahl *et al.*, 2013). Por otro lado, a nivel de respuesta a estímulos aparece un enriquecimiento de términos relacionados con respuesta a estrés, entre ellos el osmótico y el frío, estímulos abióticos, como luz y radiación, y respuesta a señales endógenas, tales como el ácido abscísico. Finalmente, se observa un enriquecimiento en términos relacionados con procesos del desarrollo como son: desarrollo de órganos, entre ellos órganos post-embrionarios, como son las flores y los frutos, así como en el desarrollo apical del tallo.

RESULTADOS



RESULTADOS

Figura 32. Resultados del genotipado de las plantas T1 modificadas por CRISPR-Cas9 en fondo silvestre Col-0. Imágenes del análisis de las secuencias utilizando la herramienta online Synthego, que se utiliza para analizar las mutaciones realizadas por CRISPR, para *GBF1* y *GBF2* de las plantas T1 obtenidas de plantas transformadas con las construcciones de CRISPR-Cas9. Se resalta en línea continua sobre el electroferograma la guía utilizada y en discontinua roja la secuencia PAM; la línea discontinua vertical muestra la posición en la que ha habido una edición; se representa también el INDEL (Contracción de inserción y deleción), el porcentaje de contribución y la secuencia de cada alelo. Para cada línea el electroferograma de la parte superior corresponde a los cambios detectados en la misma y, el de la parte inferior al del parental silvestre Col-0.

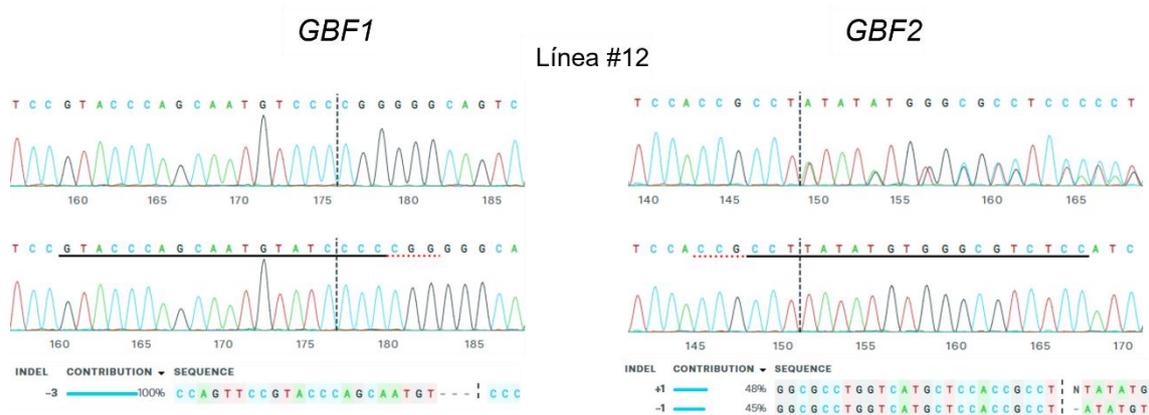
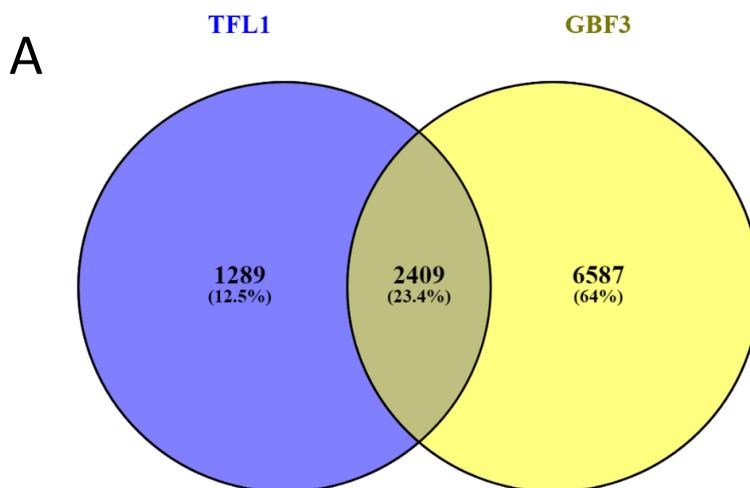


Figura 33. Resultados del genotipado de las plantas T1 modificadas por CRISPR-Cas9 en fondo mutante *gbf3*. Imágenes del análisis de las secuencias utilizando la herramienta online Synthego, que se utiliza para analizar las mutaciones realizadas por CRISPR, para *GBF1* y *GBF2* de las plantas T1 obtenidas de plantas transformadas con las construcciones de CRISPR-Cas9. Se resalta en línea continua sobre el electroferograma la guía utilizada y en discontinua roja la secuencia PAM; la línea discontinua vertical muestra la posición en la que ha habido una edición; se representa también el INDEL (Contracción de inserción y deleción), el porcentaje de contribución y la secuencia de cada alelo. El electroferograma de la parte superior corresponde a los cambios detectados en la línea #12 y, el de la parte inferior al del parental silvestre Col-0.



RESULTADOS

4.3. Análisis de la localización subcelular de GBF3 y TFL1

Se ha descrito que la proteína TFL1 se localiza tanto en citoplasma como en núcleo (Hanano y Goto, 2011). Por otra parte, aunque generalmente los factores de transcripción se encuentran en el núcleo, dónde se unen a sus genes diana, se ha descrito que algunos bZIP se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma (Silvestre, M, 2021). Con el objetivo de testar si las proteínas GBF3 y TFL1 co-localizan, decidimos estudiar la localización subcelular de estas proteínas expresión transitoria de las mismas en hojas de *N. benthamiana*. Para ello, se generaron construcciones para ambos genes utilizando la tecnología Gateway, a partir de plásmidos derivados del vector pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) que contenían las regiones codificantes de *GBF3* y *TFL1*, respectivamente, que se transfirieron al vector pMDC43 (Curtis y Grossniklaus, 2003), el cual permite fusionar la proteína GFP al extremo N-terminal de la proteína de interés, obteniendo finalmente las construcciones 35S:*GFP-TFL1* y 35S:*GFP-GBF3* (Figura 35). Estas construcciones fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* utilizando cuatro plantas para cada construcción, con el objetivo de analizar la localización subcelular de estas proteínas de fusión *in planta*.

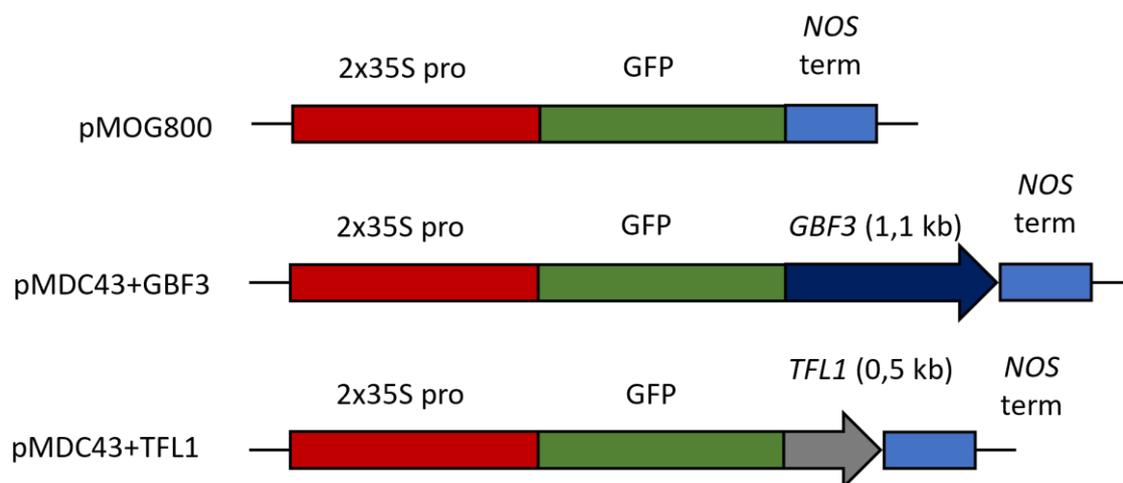


Figura 35. Esquema de las construcciones para ensayo de localización subcelular en *N. benthamiana*. Estructura de las construcciones realizadas para el ensayo de localización subcelular, se incluye el promotor 2x35, la región codificante de la GFP, las CDS de *AG*, *FD*, *GBF3*, *TFL1* y *SOC1*, y el terminador NOS.

Utilizando el microscopio confocal para visualizar el tejido epidérmico de las hojas de las plantas agroinfiltradas, fuimos capaces de detectar la proteína de fusión GFP-TFL1 en citoplasma, en núcleo y también en nucléolo, observándose a veces su presencia en “speckles” nucleares, que

RESULTADOS

se visualizan como puntos de mayor intensidad más brillantes. Por otra parte, la proteína de fusión GFP-GBF3 se localizó en núcleo, nucléolo y también algo en citoplasma, pudiendo detectarse formando "speckles" nucleares (**Figura 36**). Nuestros datos sugieren que las proteínas TFL1 y GBF3 comparten la misma localización subcelular principalmente en núcleo y nucléolo y en menor medida en citoplasma.

4.4. Ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) entre TFL1 y GBF3.

El alto número de genes diana comunes entre TFL1 y GBF3, y que ambas proteínas co-localicen a nivel subcelular en núcleo, nucleolo y citoplasma, sugiere que las proteínas TFL1 y GBF3 podrían interactuar para actuar. Para analizar la posible interacción *en planta* de las proteínas TFL1 y GBF3 llevamos a cabo un ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Este ensayo se basa en dividir la proteína YFC en dos mitades que deben interactuar para que se reconstituya la proteína y pueda emitirse fluorescencia. La interacción de ambas partes no tiene lugar de forma espontánea, sino que para que pueda tener lugar la complementación es necesario que estén fusionadas a proteínas que interactúan entre sí. Por tanto, se procedió a fusionar a las proteínas TFL1 y GBF3 los extremos C y N terminal de la proteína YFP. Las distintas construcciones se realizaron utilizando la tecnología Gateway a partir de un plásmido pCR8 que contenía la región codificante de *GBF3* o de *TFL1*, y que posteriormente se subclonaron en los plásmidos pYFC43 o pYFN43 (Belda-Palazón *et al.*, 2012): YFP^N-TFL1, YFP^C-TFL1, YFP^C-GBF3 y YFP^N-TFL1 (**Figura 37**). Estas construcciones se infiltraron en hojas de *N. benthamiana* y a los tres días tras la infiltración se procedió a analizar la fluorescencia en un microscopio confocal observando las células de la epidermis.

Se incluyó como control negativo de la interacción AGAMOUS (AG) y SUPRESOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), pareja de factores de transcripción tipo MADS cuya interacción se ha probado que no ocurre "*in vivo*" (Balanzá *et al.*, 2014). También se infiltraron como control las construcciones YFP^N-GBF3 y YFP^N-TFL1 con el fin de comprobar si estas construcciones por sí solas eran capaces de emitir autofluorescencia ya que contienen la región de mayor tamaño de la YFP. Finalmente, como control positivo, se incluyó también la pareja de proteínas TFL1 y FD, siendo este último factor de transcripción también de tipo bZIP, cuya interacción, en el núcleo, ha sido descrita en trabajos previos (**Figura 37**; Hanano y Goto, 2011).

RESULTADOS

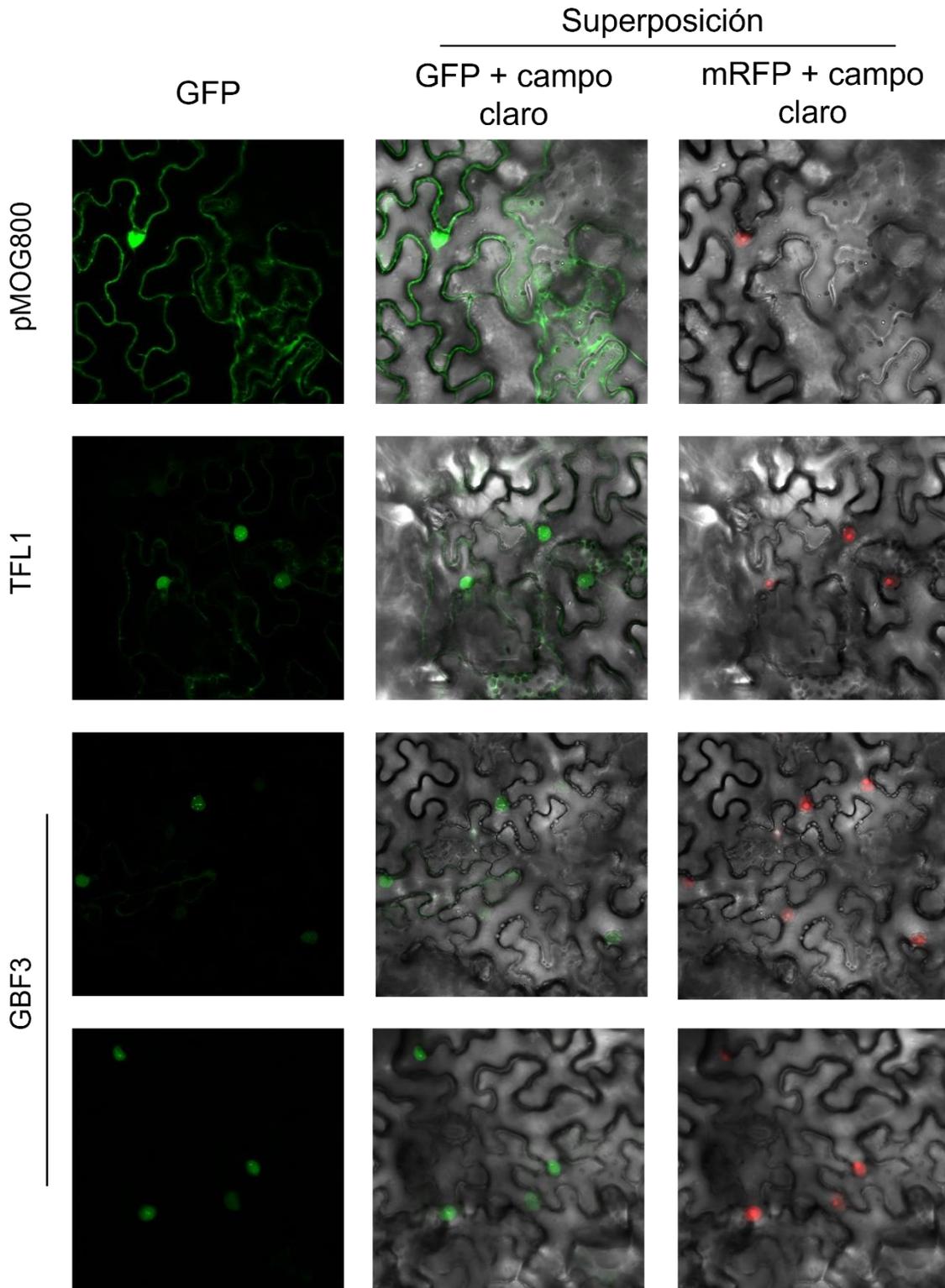


Figura 36. Localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-TFL1 y GFP-GBF3. Imágenes de microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones 35S:GFP, 35S:GFP-TFL1 y 35S:GFP-GBF3. Se muestra de izquierda a derecha la YFP, la superposición YFP + Campo claro y la superposición de RFP + Campo claro. La construcción pMOG800 (35S:GFP) se usó como control positivo. Se utilizó la fusión SV40-mRFP como marcador de localización nuclear nuclear.

RESULTADOS

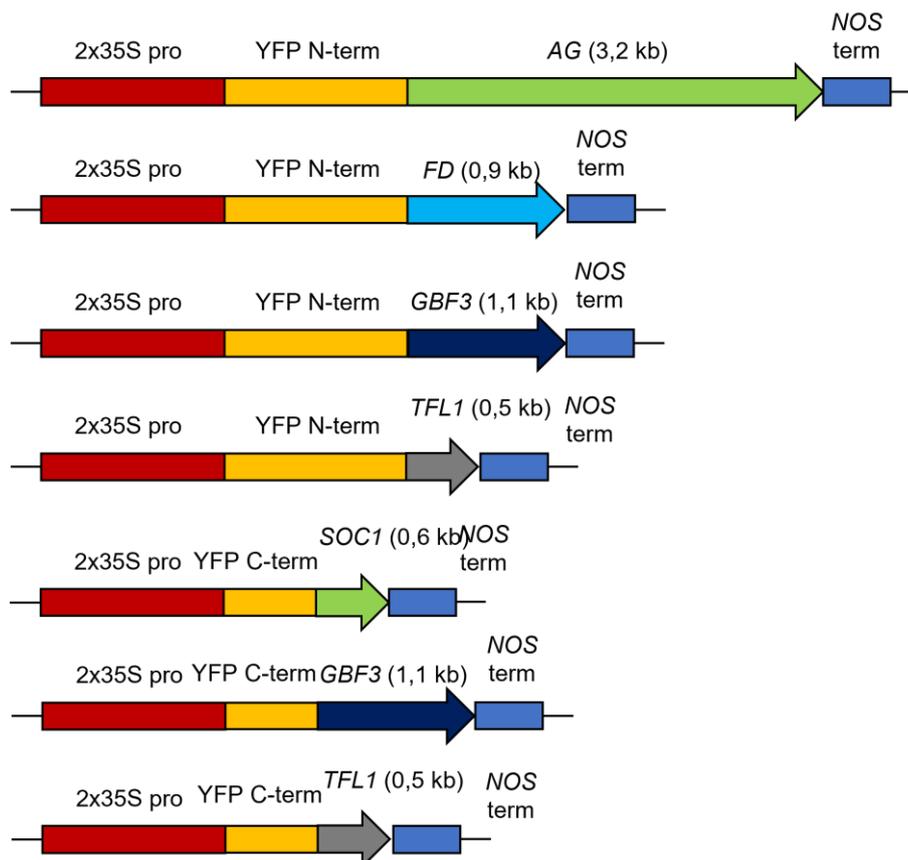
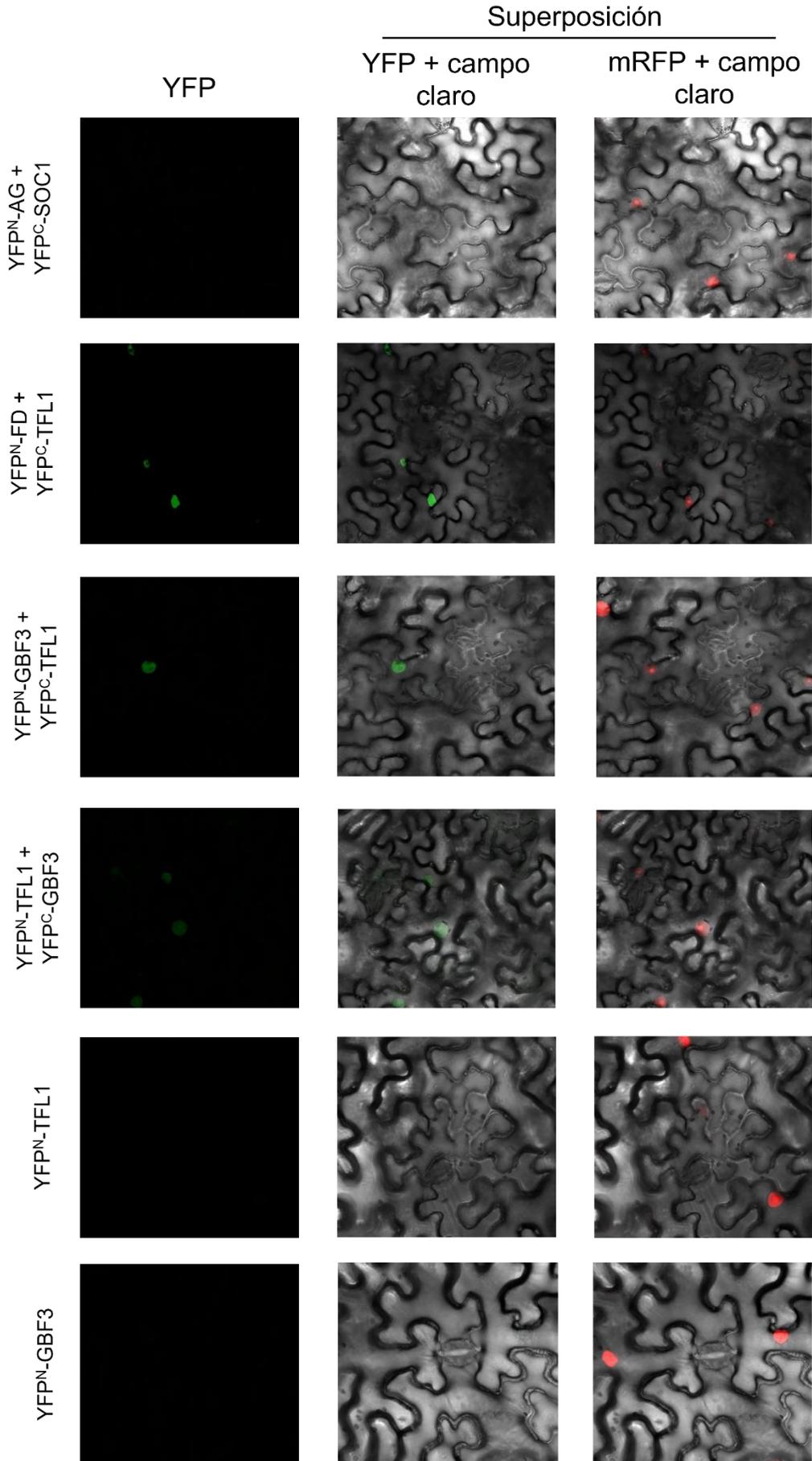


Figura 37. Esquema de las construcciones para ensayo de BiFC en *N. benthamiana*. Estructura de las construcciones realizadas para el ensayo de BiFC, se incluye el promotor 2x35S, la región codificante del fragmento N o C terminal de la YFP, las CDS de AG, FD, GBF3, TFL1 y SOC1, y el terminador NOS.

Como cabría esperar no se observó fluorescencia cuando se agroinfiltró con las construcciones individuales, YFP^N-GBF3 o YFP^N-TFL1, y tampoco con la combinación YFP^N-AG + YFP^C-SOC1. Por el contrario, se detectó fluorescencia en el núcleo cuando se infiltró la combinación YFP^N-FD + YFP^C-TFL1, utilizada en este ensayo como control positivo. Por tanto, el comportamiento de los controles positivo y negativos fue el esperado. Por último, cuando se infiltraron las combinaciones YFP^N-GBF3 + YFP^C-TFL1 y YFP^N-TFL1 + YFP^C-GBF3 se observó fluorescencia únicamente en el núcleo, indicando que las proteínas TFL1 y GBF3 son capaces de interactuar *in planta*. Además, observamos que mientras que la proteína TFL1 se localiza en núcleo y citoplasma, su interacción con GBF3 ocurre únicamente en el núcleo, tal y como ocurre en la interacción de TFL1 con FD (**Figura 38**).

RESULTADOS



RESULTADOS

Figura 38. Análisis de interacción proteína-proteína entre TFL1 y GBF3 mediante ensayos de BiFC. Imágenes de microscopio confocal de células de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones señaladas a la izquierda. Se muestra de izquierda a derecha la YFP, YFP + Campo claro y mRFP + Campo claro. Se utilizó la fusión SV40-mRFP como marcador de localización nuclear nuclear.

4.5. Análisis de la interacción genética entre TFL1 y GBF3 mediante la caracterización del doble mutante *gbf3 tf1*

Con el fin de profundizar más en el posible papel conjunto de TFL1 y GBF3, y teniendo en cuenta la interacción *in planta* de las proteínas entre TFL1 y GBF3, testada en el experimento de BiFC mediante expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, se procedió a analizar la interacción genética mediante la generación del doble mutante *gbf3tf1-1*.

Para ello, se realizó el cruce, en ambos sentidos, de los mutantes simples *gbf3* y *tf1-1*. Las 8 plantas F1 resultantes de los cruces mostraron un fenotipo idéntico al del parental silvestre Col-0. Se recogieron individualmente las progenies F2 de cada una de las plantas F1 y posteriormente se cultivaron bajo condiciones de día largo 24 plantas F2 procedentes de las plantas F1 #6 y #8, que fueron las que produjeron más semillas. De estas poblaciones T2 se seleccionaron las plantas #6.8 y #8.6 que mostraron un fenotipo similar al del mutante *tf1-1* y que eran genotípicamente homocigotas para la mutación *gbf3*, a la espera de poder ser genotipadas para *tf1-1*.

Estas dos plantas dobles mutantes, mostraron un fenotipo más extremo que el del mutante simple *tf1-1*. En comparación con el parental silvestre Col-0, el mutante *tf1-1* presenta floración temprana (**Figura 39, A**). Además, a diferencia del parental silvestre Col-0, donde todas las estructuras inflorescentes tienen un crecimiento indeterminado, la inflorescencia principal del mutante *tf1-1*, tras producir una o dos hojas caulinares que sustentan o una flor axilar o una inflorescencia determinada de arquitectura muy simple, forma unas 4 flores antes de que el meristemo apical se determine formando una estructura terminal (**Figura 39, B**). Sin embargo, los presuntos dobles mutantes *tf1-1gbf3* solo producían 1 o 2 flores antes de la estructura terminal (**Figura 39, B**). Por cuestiones de tiempo analizamos en estas poblaciones F2 el tiempo de floración en comparación con los parentales silvestre Col-0 y mutante *tf1-1*.

RESULTADOS

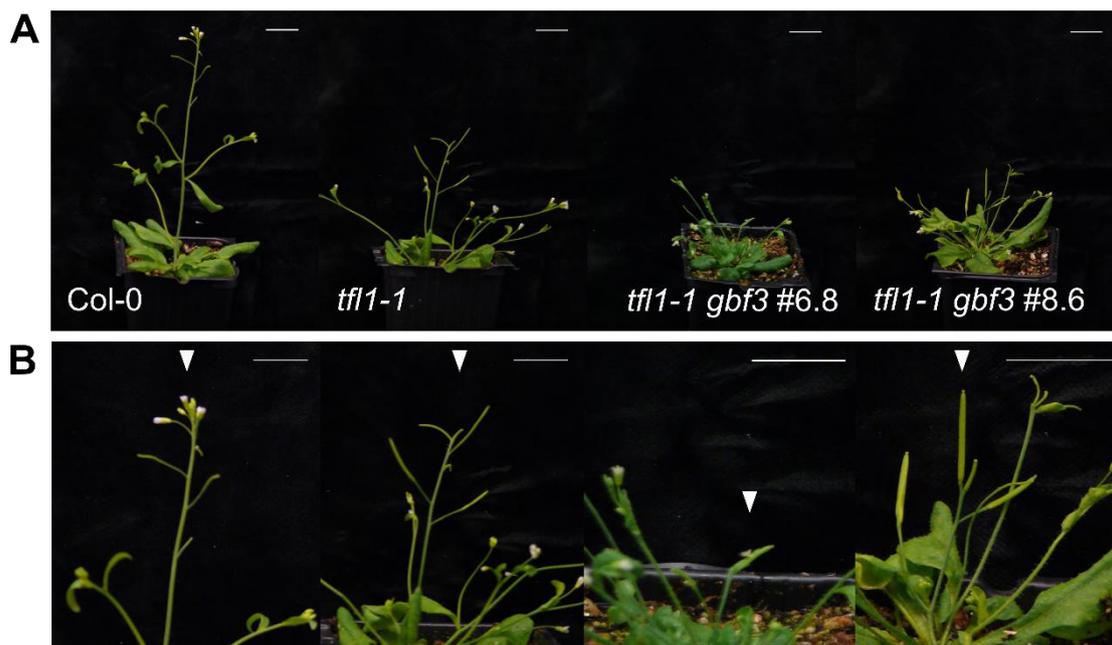


Figura 39. Fenotipo asociado a los presuntos dobles mutantes *tf1-1gbf3*. (A) Imágenes de las plantas silvestre Col-0, mutante *tf1-1* y de los presuntos dobles mutantes *tf1-1gbf3* #6.8 y #8.6 crecidas en condiciones de día largo. (B) Detalle de ápice de la inflorescencia principal de cada uno de los genotipos, marcado con puntas de flecha. Escala de 2 cm.

4.6. Efecto de la mutación *tf1-1* sobre la actividad de *GBF3* en el tiempo de floración

Para poder dilucidar cómo afecta la mutación *tf1-1* a la actividad de *GBF3* en la floración procedimos a comparar los fenotipos resultantes de la sobreexpresión de *GBF3* en un fondo silvestre Col-0 y en fondo *tf1-1*. Tras infiltrar la construcción 35S::*GBF3*, generada previamente en el laboratorio (García, C, 2021) en plantas de los genotipos Col-0 y *tf1-1*, se recogieron las semillas y se sembraron en placas con MS suplementadas con Higromicina para identificar los transformantes primarios. Posteriormente se pasaron a tierra y se midió el tiempo de floración como el número total de hojas que genera el ápice principal hasta que tiene lugar la formación de la primera flor. El número de plantas analizadas fue como mínimo de 20 plantas para cada genotipo, menos en las T1 *tf1-1* 35S::*GBF3* que fue de 11. Teniendo en cuenta que sabemos por resultados previos en el laboratorio (García, C, 2021) que la sobreexpresión de *GBF3* produce retraso en el tiempo de floración, procedimos a comparar los porcentajes de plantas con floración tardía entre la población de plantas T1 35S::*GBF3* en fondo Col-0 y en fondo *tf1-1*. Observamos que éste era del 30% en fondo Col-0 mientras que en fondo *tf1-1* fue del 27% (Figura 40, A y B). Además, la diferencia entre el número de hojas de las plantas que mostraron

RESULTADOS

retraso del tiempo de floración y las que se encontraban dentro de la distribución del plantas T1 Col-0 35S::*GBF3* o T1 *tfl1-1* 35S::*GBF3* fue de 12 y 4 hojas, respectivamente (**Tabla 13** y **Figura 40**).

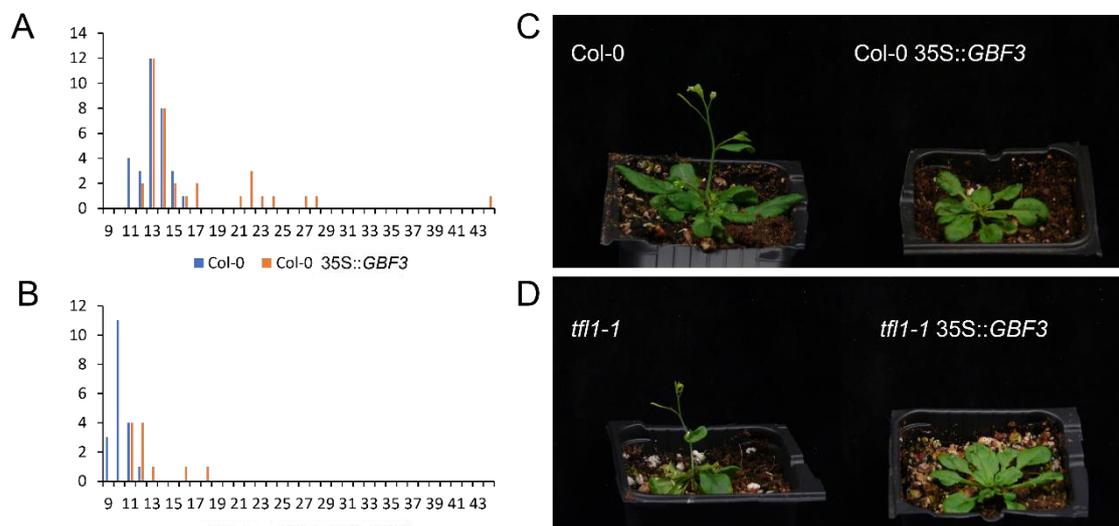


Figura 40. Fenotipos asociados a la sobreexpresión de *GBF3* en fondo Col-0 y *tfl1-1*. (A) Distribución del número de plantas en fondo Col-0 según el número de hojas totales que genera el tallo hasta la formación de la primera flor. (B) Distribución del número de plantas en fondo *tfl1-1* según el número de hojas totales que genera el tallo hasta la formación de la primera flor. (C) Imágenes de plantas Col-0 y plantas transgénicas T1 35S::*GBF3* en fondo Col-0 cultivadas en condiciones de LD. (D) Imágenes del mutante *tfl1-1* y plantas transgénicas T1 35S:GBF3 en fondo mutante *tfl1-1* cultivadas en condiciones de LD.

Tabla 13. Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal en plantas T1 Col-0 35S::*GBF3* o plantas T1 *tfl1-1* 35S::*GBF3*, con y sin fenotipo de floración tardía.

	Col-0 35S:: <i>GBF3</i>		<i>tfl1-1</i> 35S:: <i>GBF3</i>	
	Con fenotipo	Sin fenotipo	Con fenotipo	Sin fenotipo
Media	25,9	13,5	15,7	11,0
SD	7,4	0,9	2,5	0,5

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos intentado analizar cómo la ruta de señalización de ABA media la actividad de TFL1 mediante la caracterización de los genes *ANAC102*, *HAI1* y *MYB3*. Para ello se han analizado los patrones de expresión de estos genes, así como el fenotipo de los mutantes de pérdida y ganancia de función, observando en la mayoría de los casos fenotipos relacionados con el tiempo de floración y/o alteraciones en la arquitectura de la planta. Con respecto a *GBF3* se ha estudiado la posible interacción con TFL1 y se ha analizado el papel conjunto que tienen estos dos genes en la floración por medio de la obtención de dobles mutantes *tfl1-1gbf3* y sobrexpresiones de *GBF3* en fondo Col-0 y *tfl1-1*.

1. NAC DOMAIN CONTAINING PROTEIN 102 (ANAC102)

ANAC102 presenta un patrón de expresión relativamente similar al que presenta *TFL1*. Los niveles de expresión de *ANAC102* son elevados en semilla, donde se ha mostrado recientemente que *TFL1* juega un papel importante en el desarrollo del endospermo regulando la celularización a través de interacciones con un factor de transcripción de tipo bZIP de la ruta de señalización por ABA, ABI5 (Cheng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Tal y como se observa en la información de las bases de datos públicas, el nivel de expresión de *ANAC102* y de *TFL1* en raíz es elevada, lo que concuerda con los datos obtenidos de los experimentos de RT-qPCR en tejido. Esos datos sugieren que TFL1 podría estar regulando de manera positiva la expresión de *ANAC102* en raíz, al observarse una reducción en su expresión en un fondo *tfl1-1*. Se ha visto que *ANAC102* parece no tener un papel importante en el crecimiento de la raíz ya que no se han visto diferencias fenotípicas en las raíces de los mutantes *anac102* ni en líneas de sobreexpresión 35S::*ANAC102*, aunque sí se expresa en el córtex y en los extremos de la raíz (Christianson *et al.*, 2009). TFL1 sí parece tener un papel como represor del crecimiento radicular (Lachowiec *et al.*, 2015).

Por otro lado los datos de expresión *ANAC102* en el ápice del tallo por RT-PCR en distintas fases del desarrollo muestran que el patrón de expresión de *ANAC102* en fondo Col-0 y *tfl1-1* parecen exhibir una tendencia opuesta una vez tiene lugar la transición floral, produciéndose una disminución o un incremento del nivel de expresión de *ANAC102* en fondo Col-0 o *tfl1-1*, respectivamente. Esto sugiere que TFL1 reprime la expresión de *ANAC102* durante la transición floral lo que concuerda con las observaciones del experimento de ChIP-seq (Goretti *et al.*, 2020). No obstante, nos hemos enfrentado a una gran variabilidad entre las muestras biológicas atribuible a las propias condiciones de cultivo y a la recogida de los ápices a determinados tiempos donde la heterogeneidad de la muestra es elevada.

DISCUSIÓN

Finalmente, los fenotipos obtenidos en el mutante *anac102* en relación al tiempo de floración sugieren que ANAC102 puede estar regulando negativamente la transición floral en condiciones de día largo al presentar un fenotipo de floración temprana, pero que este podría ser dependiente del fotoperiodo al no observarse estas diferencias en condiciones de día corto. La falta de alteraciones fenotípicas más acusadas podría atribuirse a una posible redundancia genética con genes homólogos.

Por otro lado, estudios previos han mostrado que el mutante *anac102* es insensible a ABA en la germinación de la semilla (Christianson *et al.*, 2009). Los resultados de los experimentos de aplicación exógena de ABA para testar si se intensificaban los fenotipos relacionados con la floración muestran que el mutante *anac102* también parece ser insensible a ABA en cuanto al proceso de floración, al no observarse diferencias significativas tras la aplicación exógena de ABA en comparación con el tratamiento con la solución Mock, mientras que este mismo tratamiento fue capaz de provocar adelanto de la floración en el parental silvestre Col-0.

Este adelanto en la floración a causa de la aplicación exógena de ABA puede ser algo contradictorio a lo visto en estudios previos. Aplicaciones exógenas ABA por pulverización sobre las hojas parece provocar un retraso en la floración mientras que la aplicación de ABA en el riego favorece la floración debido a que se asemeja más al ABA endógeno (Riboni *et al.*, 2016). Nuestros datos pueden haberse visto afectados por el tipo de condiciones en las que se han crecido las plantas, así como el tipo de ABA utilizado, que pueda asemejarse en mayor medida al ABA endógeno, a las concentraciones siendo las nuestras de 10-25 μM mientras que en otros trabajos se han utilizado hasta 100 μM y a la solución en la que se disuelve ABA que en nuestro caso es en MES mientras que en otros es sobre EtOH (Wang *et al.*, 2013). Por tanto, habría que rediseñar el experimento testando otras condiciones de crecimiento y tratamiento con el fin de comprobar los resultados.

Durante este trabajo también se ha generado la construcción pMDC32-ANAC102 y en trabajos próximos se procederá a su infiltración en plantas de *Arabidopsis* del parental silvestre para analizar el efecto de la sobreexpresión del gen *ANAC102* en el tiempo de floración, así como en la arquitectura de la inflorescencia

DISCUSIÓN

2. **HIGHLY ABA-INDUCED1 (HAI1)**

De los datos obtenidos del análisis del patrón de expresión de *HAI1* observamos una elevada expresión en raíz, la cual también se ha documentado previamente para *TFL1* (Lachowiec *et al.*, 2015). Además, el nivel de expresión de *HAI* en los distintos genotipos no muestra variaciones, lo que sugiere que *TFL1* no es necesario para la correcta expresión de *HAI1* en los tejidos que hemos analizado. Como hemos dicho observamos una elevada expresión de *HAI1* en raíz. Se ha descrito que mutantes dobles *hai1-2aip1-1* y *hai1-2hai3-1* así como triples *hai1-2aip1-1hai3-1* presenta fenotipos de menor elongación radicular, lo que sugiere que pueden actuar como reguladores positivos del crecimiento de la raíz (Bhaskara *et al.*, 2012) ejerciendo un papel contrario al de *TFL1*, para el que se ha sugerido un papel represor del crecimiento radicular (Lachowiec *et al.*, 2015). Cabría estudiar en más detalle la función de ambos genes a nivel radicular, por ejemplo, realizando un mutante *cuádruple mutante* *tfl1-1hai1-2aip1-1hai3-1* y viendo el fenotipo radicular asociado para ver si actúan sobre la misma ruta.

Por otro lado, en el ápice del tallo vemos una caída de la expresión de *HAI1* durante las primeras etapas de la transición floral en el fondo *tfl1-1*, lo que puede indicar que *TFL1* esté regulando positivamente su expresión en las primeras etapas pero, conforme avanza el desarrollo, los niveles de expresión de *HAI1* son mayores en el fondo *tfl1-1* que en el Col-0, donde *TFL1* podría estar funcionando como un represor de la expresión. En experimentos de RNA-seq de *TFL1-GR* + DEXA, se ha visto que *TFL1* es capaz de activar la expresión de *HAI1* (Silvestre, M. 2021), pero en nuestro caso vemos lo contrario. Puede ser debido a que en nuestro experimento no llevamos a cabo la inducción de *TFL1* sino que trabajamos con el endógeno, lo que puede mostrar diferencias si realizamos una inducción de la expresión.

La caracterización fenotípica de los dos mutantes alélicos *hai1-1* y *hai1-2* se observó que estos mutantes florecían temprano en comparación al parental silvestre bajo condiciones de LD y que este adelanto de la floración era más acusado en el triple mutante *hai1-2aip1-1hai3-1*, lo que sugiere un posible papel de *HAI1* como represor de la floración, al igual *TFL1* (Bradley *et al.*, 1997.). Estos resultados también sugieren la existencia de redundancia genética de *HAI1* con *AIP1* y *HAI3*. Cabría profundizar en ello estudiando el tiempo de floración en los mutantes simples *aip1-1* y *hai3-1*, con el fin de comprobar si también presentan fenotipos relacionados con el tiempo de floración y, en el caso de presentar adelanto, determinar cuál podría estar contribuyendo más al fenotipo del triple mutante. Por otra parte, la sobreexpresión de *HAI1* en plantas de *Arabidopsis* provoca retraso en el tiempo de floración, similar al que muestran las plantas 35S::*TFL1* (Ratcliffe *et al.*, 1998) lo que también apoya la hipótesis de un posible papel

DISCUSIÓN

de *HAI1* como represor floral. Además, puesto que TFL1 induce de manera directa la expresión de *HAI1* (Goretti *et al.*, 2020), nuestros resultados apoyarían que este gen podría estar mediando la acción de TFL1 para reprimir la floración.

3. **MYB DOMAIN PROTEIN 3 (MYB3)**

En el caso de *MYB3* observamos un alto nivel de expresión en semilla, lo que coincide con lo mencionado con anterioridad para TFL1 en este órgano de la planta (Cheng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Del estudio de expresión llevado a cabo en diferentes tejidos, aunque se observó una relativa disminución en los niveles de expresión de *MYB3* en fondo *tf1-1* con respecto a Col-0, lo cual podría sugerir un posible papel de TFL1 como regulador positivo de *MYB3*, la variabilidad de los datos fue muy elevada, quizás atribuible a insuficiente especificidad de los cebadores de *MYB3* en tejido, donde aparecía una segunda Tm posiblemente correspondiente a algún otro gen, segunda Tm que no se observó en ápice, donde se originalmente se analizó la eficiencia de los cebadores. Por tanto, habría que diseñar nuevos cebadores de RT-qPCR más específicos para *MYB3*.

Por otro lado, el análisis del nivel de expresión de *MYB3* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mostró niveles inferiores de *MYB3* en fondo *tf1-1* con respecto al fondo silvestre Col-0, indicando por tanto un posible papel como activador transcripcional de TFL1 sobre *MYB3* (Goretti *et al.*, 2020).

Los fenotipos de los mutantes *myb3* parecen indicar un papel de *MYB3* como promotor de la transición floral al presentar un retraso en la floración tanto en condiciones de día largo como de día corto y tendría, por tanto, un papel opuesto al que lleva a cabo *TFL1*. La aplicación exógena de ABA al mutante *myb3* bajo condiciones de día corto no causó ninguna alteración fenotípica con respecto al parental silvestre lo que sugiere que este mutante pueda ser insensible a ABA.

Por otra parte, la sobreexpresión de *MYB3* no causó diferencias significativas en el tiempo de floración con respecto al parental silvestre, pero sí que se observaron cambios en la arquitectura de la planta, tales como un menor crecimiento, una ralentización de desarrollo global de la planta y un fenotipo de hojas curvadas tanto a nivel de roseta como de hojas caulinares.

Se ha descrito que la sobreexpresión en plantas de *A. thaliana* del gen de maíz *MYB31*, perteneciente al subgrupo 4, al igual que *AtMYB3*, afecta al contenido total de lignina y regula a

DISCUSIÓN

la baja la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis de monolignol. El tamaño de las plantas de *Arabidopsis* que expresan constitutivamente *ZmMYB31* es de solo un tercio del tamaño de las plantas control, mostrando además reducción del tamaño de la hoja, del tallo y de la flor y también muestran retraso en el tiempo de floración. Además las plantas 35S::*ZmMYB31* muestran lesiones blancas en las hojas maduras que se curvan hacia arriba siendo más evidente en las hojas más viejas (Fornalé *et al.*, 2010).

Por otra parte, la sobreexpresión de *MdMYB3* en tabaco, un gen homólogo a *MYB3* en manzano, mostró fenotipos relacionados con la arquitectura de la flor como un mayor tamaño de las mismas presentando pistilos que sobresalían por encima de las anteras, así como un cambio en los patrones de expresión de genes relacionados con la ruta de los flavonoides y fenilpropanoides (Vimolmangkang *et al.*, 2013). Sin embargo, en la sobreexpresión de *ZmMYB31*, del mismo subgrupo, se observó una reducción en el tamaño de la flor (Fornalé *et al.*, 2010). Todo esto pone de manifiesto un posible papel de *MYB3* en la arquitectura de la flor y, por tanto, podría ser interesante estudiar más en detalle posibles cambios en el desarrollo de la flor de *Arabidopsis*, aunque a simple vista no se hayan observado defectos. Respecto a la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides la participación de *MYB3* en la misma también ha sido propuesta en *Arabidopsis* (Zhou *et al.*, 2017).

4. ESTUDIO DE *GBF3* COMO MEDIADOR DE LA FUNCIÓN DE *TFL1*

GBF3 parece tener un papel en la floración apoyado por los datos de su patrón de expresión similar al de *TFL1*, así como los fenotipos de adelanto y retraso de la floración mostrados por los mutantes simples *gbf3* y las líneas de sobreexpresión 35S::*GBF3*, respectivamente. Además de participar en el control del tiempo de floración, la sobreexpresión de *GBF3* afecta también a otros aspectos del desarrollo como la arquitectura de la inflorescencia y el desarrollo de la semilla, que son procesos en los que también participa *TFL1*, lo que sustenta la idea de que *TFL1* actúe a través de *GBF3* (García, C, 2021).

En este trabajo hemos podido profundizar en el papel de *GBF3* como mediador de la acción de *TFL1*, mediante la comparación de los datos del análisis de ChIP-seq de *GBF3* y *TFL1*, así como el desarrollo de los ensayos, de localización subcelular y de BiFC (interacción proteína-proteína), utilizando expresión transitoria en *N. benthamiana*. En cuanto al ChIP-seq han aparecido genes relacionados con la floración, como por ejemplo la síntesis de trehalosa, un azúcar involucrado en la inducción de la floración (Wahl *et al.*, 2013), así como con la señalización del ácido

DISCUSIÓN

abscísico, lo que puede indicar un posible nexo entre TFL1, floración y ABA. En cuanto a la interacción proteína-proteína, los resultados de estos análisis sugieren que GBF3 y TFL1 podrían actuar formando un complejo transcripcional en el núcleo, quizás junto a otros bZIPs con los que GBF3 también interacciona, como son GBF1 y GBF2 (Goretti *et al.*, 2020; Schindler *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2020)

Podría ser interesante profundizar en el estudio de GBF1 y GBF2 y su posible función en el proceso de floración a través de TFL1, así como testar sus posibles interacciones con TFL1. TFL1 parece tener cierta tendencia a formar heterodímeros con otros bZIPs como FD, FDP, bZIP30 y bZIP52, participando en procesos de desarrollo como son la formación de la semilla y la hoja (Wigge *et al.*, 2005; Abe *et al.*, 2005; Silvestre, M, 2021).

Finalmente, la caracterización fenotípica del doble mutante *gbf3tfl1-1*, así como el análisis de los fenotipos resultantes de la sobreexpresión de *GBF3* en fondo Col-0 y *tfl1-1* nos ha permitido comprobar cómo, aunque TFL1 y GBF3 parecen regular la floración actuando como represores florales en la misma ruta, la función de GBF3 no sería totalmente dependiente de la activación por TFL1. La caracterización del fenotipo de las semillas de las plantas T1 35S::*GBF3* en un fondo *tfl1-1* también nos permitirá conocer mejor implicación de GBF3 y TFL1 a nivel del desarrollo de la semilla.

Sería interesante comparar la severidad del efecto en el tiempo de floración y en la arquitectura de la planta mostrado por líneas transgénicas T1 de Col-0 35S::*TFL1* y 35S::*GBF3*, así como con plantas doble heterocigotas 35S::*TFL1* 35S::*GBF3* con el fin de analizar la implicación de GBF3 en el proceso de floración. La sobreexpresión de ambos genes permitiría estudiar si existe algún fenotipo sinérgico en la floración a causa de la sobreexpresión del complejo TFL1-GBF3, corroborando así la interacción de ambas proteínas y su papel en la floración.

También podría ser interesante comparar los efectos fenotípicos de la sobreexpresión de *TFL1* en un fondo silvestre Col-0 con respecto a la sobreexpresión en un fondo mutante *gbf3* para analizar en qué medida GBF3 se requiere para la actividad de TFL1.

En este trabajo se ha estudiado la relación entre *TFL1* y los genes de respuesta a ABA, *ANAC102*, *HAI1* y *MYB3*. Se han encontrado que estos genes comparten patrones de expresión parcialmente solapantes con *TFL1* y se han identificado fenotipos relacionados con el tiempo de floración tanto en mutantes de pérdida de función como en líneas de sobreexpresión de estos

DISCUSIÓN

genes. Además, se ha profundizado en la posible interacción de GBF3 con TFL1, encontrando que posiblemente siendo TFL1 sea un activador de *GBF3*, y la posibilidad de que ambos formen un complejo proteína-proteína.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Por una parte, el análisis del patrón de expresión de *ANAC102* y *MYB3*, que solapan parcialmente con el de *TFL1*, los resultados de los experimentos de RT-qPCR en tejidos y ápices del tallo, y, por otra, con los datos de unión *in vivo* de TFL1 a sus regiones promotoras indican un posible papel de TFL1 como represor de *ANAC102* y activador de *MYB3*. En el caso de *HAI1* no se han podido obtener conclusiones sobre si TFL1 funciona como un activador o como un represor.
2. Los fenotipos observados en los mutantes de *ANAC102* y *HAI1*, así como en líneas de sobreexpresión de los mismos sugieren que estos genes participan en la transición floral de forma similar a *TFL1*, observándose un adelanto de la floración en los mutantes, similar a *tf1-1*, y un retraso en las líneas de sobreexpresión, similar al de *35S::TFL1*. Por tanto, estos genes podrían mediar la regulación de la floración por TFL1. Sin embargo, esto no se ve de forma tan clara para *MYB3*, donde los mutantes muestran retraso de floración y no se observó efecto en el tiempo de floración como consecuencia de su sobreexpresión.
3. El análisis de los datos de CHIP-seq de GBF3 y de TFL1, así como los resultados de los análisis de localización subcelular y de interacción entre las proteínas GBF3 y TFL1, mediante BiFC, sugieren que estas dos proteínas formen un complejo transcripcional que juegue un papel en la regulación de la floración. Sin embargo, la función de GBF3 en dicho proceso no parece que sea totalmente dependiente de TFL1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe, M. (2005).** FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. *Science*, 309(5737), 1052–1056.
<https://doi.org/10.1126/science.1115983>
- Ahn, J. H., Miller, D., Winter, V. J., Banfield, M. J., Lee, J. H., Yoo, S. Y., Henz, S. R., Brady, R. L., y Weigel, D. (2006).** A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *The EMBO Journal*, 25(3), 605–614.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600950>
- Alvarez, J., Guli, C. L., Yu, X.-H., y Smyth, D. R. (1992).** terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2(1), 103–116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1992.00103.x>
- Amasino, R. (2010).** Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant Journal*, 61(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04148.x>
- Andrés, F., y Coupland, G. (2012).** The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 627–639.
<https://doi.org/10.1038/nrg3291>
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., y 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>
- Baumann, K., Venail, J., Berbel, A., Domenech, M. J., Money, T., Conti, L., Hanzawa, Y., Madueno, F., y Bradley, D. (2015).** Changing the spatial pattern of TFL1 expression reveals its key role in the shoot meristem in controlling *Arabidopsis* flowering architecture. *Journal of Experimental Botany*,

BIBLIOGRAFÍA

- 66(15), 4769–4780. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv247>
- Bäurle, I., y Dean, C.** (2006). The Timing of Developmental Transitions in Plants. *Cell*, 125(4), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.005>
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., y Ferrando, A.** (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, 7(10), e46907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A., y Madueno, F.** (2007). Floral Initiation and Inflorescence Architecture: A Comparative View. *Annals of Botany*, 100(3), 659–676. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm146>
- Bhaskara, G. B., Nguyen, T. T., y Verslues, P. E.** (2012). Unique Drought Resistance Functions of the Highly ABA-Induced Clade A Protein Phosphatase 2Cs. *PLANT PHYSIOLOGY*, 160(1), 379–395. <https://doi.org/10.1104/pp.112.202408>
- Bouché, F., Lobet, G., Tocquin, P., y Périlleux, C.** (2015). FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1167–D1171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1054>
- Bowman, J.** (1994). *Arabidopsis*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2598-0>
- Cheng, J.-Z., Zhou, Y.-P., Lv, T.-X., Xie, C.-P., y Tian, C.-E.** (2017). Research progress on the autonomous flowering time pathway in *Arabidopsis*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0458-3>
- Cheng, Z. J., Zhao, X. Y., Shao, X. X., Wang, F., Zhou, C., Liu, Y. G., Zhang, Y., y Zhang, X.**

BIBLIOGRAFÍA

- S. (2014). Abscisic Acid Regulates Early Seed Development in Arabidopsis by ABI5-Mediated Transcription of SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1. *The Plant Cell*, 26(3), 1053–1068. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121566>
- Christianson, J. A., Wilson, I. W., Llewellyn, D. J., y Dennis, E. S.** (2009). The Low-Oxygen-Induced NAC Domain Transcription Factor ANAC102 Affects Viability of Arabidopsis Seeds following Low-Oxygen Treatment. *Plant Physiology*, 149(4), 1724–1738. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131912>
- Clough, S. J., y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 16(6), 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
- Coen, E. S., y Nugent, J. M.** (1994). Evolution of flowers and inflorescences. *Development*.
- Conti, L.** (2017). Hormonal control of the floral transition: Can one catch them all? *Developmental Biology*, 430(2), 288–301. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.03.024>
- Conti, L.** (2019). The A-B-A of Floral Transition: The to Do List for Perfect Escape. *Molecular Plant*, 12(3), 289–291. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.02.002>
- Conti, L., y Bradley, D.** (2007). TERMINAL FLOWER1 Is a Mobile Signal Controlling Arabidopsis Architecture. *The Plant Cell*, 19(3), 767–778. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049767>
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., y Coupland, G.** (2007). FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of Arabidopsis.

BIBLIOGRAFÍA

- Science*, 316(5827), 1030–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1141752>
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., y Abrams, S. R.** (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., y Scheible, W.-R.** (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139(1), 5–17. <https://doi.org/10.1104/pp.105.063743>
- D’Alessandro, S., Ksas, B., y Havaux, M.** (2018). Decoding β -Cyclocitral-Mediated Retrograde Signaling Reveals the Role of a Detoxification Response in Plant Tolerance to Photooxidative Stress. *The Plant Cell*, 30(10), 2495–2511. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00578>
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Colcombet, J., y Hirt, H.** (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances*, 32(1), 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.006>
- Davis, S. J.** (2009). Integrating hormones into the floral-transition pathway of Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell y Environment*, 32(9), 1201–1210. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01968.x>
- Domagalska, M. A., Sarnowska, E., Nagy, F., y Davis, S. J.** (2010). Genetic Analyses of Interactions among Gibberellin, Abscisic Acid, and Brassinosteroids in the Control of Flowering Time in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE*, 5(11), e14012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014012>
- El-Antably, H. M. M., y Wareing, P. F.** (1966). Stimulation of Flowering in Certain Short-

BIBLIOGRAFÍA

- day Plants by Abscisin. *Nature*, 210(5033), 328–329.
<https://doi.org/10.1038/210328a0>
- Engler, C., y Marillonnet, S.** (2013). Golden Gate Cloning. *DNA Cloning and Assembly Methods*, 119–131. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-764-8_9
- Focko Weberling, y Pankhurst, R. J.** (1989). *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge New York Cambridge University Press.
- Fornalé, S., Shi, X., Chai, C., Encina, A., Irar, S., Capellades, M., Fuguet, E., Torres, J.-L., Rovira, P., Puigdomènech, P., Rigau, J., Grotewold, E., Gray, J., y Caparrós-Ruiz, D.** (2010). ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *The Plant Journal*, 64(4), 633–644.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2010.04363.x>
- Fornara, F., y Coupland, G.** (2009). Plant Phase Transitions Make a SPLash. *Cell*, 138(4), 625–627. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.011>
- Fouracre, J. P., y Poethig, R. S.** (2019). Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(20), 10168–10177.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1817853116>
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Nakasone, S., Yamada, K., Ito, T., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2009). Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 50(12), 2123–2132. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp147>

BIBLIOGRAFÍA

- García, C.** (2021). *Análisis de la conexión entre la formación de las flores y el estrés abiótico (ABA) a través de TERMINAL FLOWER 1.*
- Genovés, A., Navarro, J. A., y Pallás, V.** (2009). A self-interacting carmovirus movement protein plays a role in binding of viral RNA during the cell-to-cell movement and shows an actin cytoskeleton dependent location in cell periphery. *Virology*, 395(1), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.042>
- Goretti, D., Silvestre, M., Collani, S., Langenecker, T., Méndez, C., Madueño, F., y Schmid, M.** (2020). TERMINAL FLOWER1 Functions as a Mobile Transcriptional Cofactor in the Shoot Apical Meristem. *Plant Physiology*, 182(4), 2081–2095. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00867>
- Gregory, F. G., y Hussey, G. G.** (1953). PHOTOPERIODIC RESPONSES OF ARABIDOPSIS THALIANA. *Proceedings of the Linnean Society of London*, 164(2), 137–139. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1953.tb00676.x>
- Hanano, S., y Goto, K.** (2011). Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 Is Involved in the Regulation of Flowering Time and Inflorescence Development through Transcriptional Repression. *The Plant Cell*, 23(9), 3172–3184. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088641>
- Hanzawa, Y., Money, T., y Bradley, D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7748–7753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500932102>
- Hewitt, E. J.** (1953). Sand and Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. *Soil Science*, 75(1), 84. <https://doi.org/10.1097/00010694-195301000-00019>
- Ho, W. W. H., y Weigel, D.** (2014). Structural Features Determining Flower-Promoting

BIBLIOGRAFÍA

- Activity of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T. *The Plant Cell*, 26(2), 552–564.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.115220>
- Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J.-Y., y Ahn, J. H.** (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Molecular Plant*, 12(4), 489–505. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.002>
- Irish, V. F.** (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, 61(6), 1014–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.04065.x>
- Iyer-Pascuzzi, Anjali S., Jackson, T., Cui, H., Petricka, Jalean J., Busch, W., Tsukagoshi, H., y Benfey, Philip N.** (2011). Cell Identity Regulators Link Development and Stress Responses in the Arabidopsis Root. *Developmental Cell*, 21(4), 770–782.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.009>
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., y Weigel, D.** (1999). Activation Tagging of the Floral Inducer FT. *Science*, 286(5446), 1962–1965. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1962>
- Karlgren, A., Gyllenstrand, N., Källman, T., Sundström, J. F., Moore, D., Lascoux, M., y Lagercrantz, U.** (2011). Evolution of the PEBP Gene Family in Plants: Functional Diversification in Seed Plant Evolution. *Plant Physiology*, 156(4), 1967–1977.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.176206>
- Kazan, K., y Lyons, R.** (2015). The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 47–60.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erv441>
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., y Penin, A. A.**

BIBLIOGRAFÍA

- (2016). A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88(6), 1058–1070. <https://doi.org/10.1111/tpj.13312>
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., y Araki, T.** (1999). A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science*, 286(5446), 1960–1962. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1960>
- Koncz, C., y Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 204(3), 383–396. <https://doi.org/10.1007/bf00331014>
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., y van der Veen, J. H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG*, 229(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/bf00264213>
- Lachowiec, J., Shen, X., Queitsch, C., y Carlborg, Ö.** (2015). A Genome-Wide Association Analysis Reveals Epistatic Cancellation of Additive Genetic Variance for Root Length in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics*, 11(9), e1005541. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005541>
- Landy, A.** (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 913–941. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004405>
- Laux, T., Würschum, T., y Breuninger, H.** (2004). Genetic Regulation of Embryonic Pattern Formation. *The Plant Cell*, 16(suppl 1), S190–S202. <https://doi.org/10.1105/tpc.016014>

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, L., Zhu, Y., Shen, L., y Yu, H.** (2013). Emerging insights into florigen transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(5), 607–613.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.06.001>
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., y Grill, E.** (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- Martignago, D., Siemiatkowska, B., Lombardi, A., y Conti, L.** (2020). Abscisic Acid and Flowering Regulation: Many Targets, Different Places. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9700. <https://doi.org/10.3390/ijms21249700>
- Méndez-Lozi, C.** (2012). *Identificación de nuevos interactores de TFL1 y VOZ1*. [PhD thesis].
- Meyerowitz, E. M., y Somerville, C. R.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Park, S.-Y. ., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. . F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J.-K. ., Schroeder, J. I., y Volkman, B. F.** (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Pin, P. A., y Nilsson, O.** (2012). The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant

BIBLIOGRAFÍA

- development. *Plant, Cell y Environment*, 35(10), 1742–1755.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02558.x>
- Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S., y Bradley, D. J. (1998).** A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, 125(9), 1609–1615.
<https://doi.org/10.1242/dev.125.9.1609>
- Ratcliffe, O. J., Bradley, D. J., y Coen, E. S. (1999).** Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development*, 126(6), 1109–1120.
<https://doi.org/10.1242/dev.126.6.1109>
- Reinhardt, D., y Kuhlemeier, C. (2002).** Plant architecture. *EMBO Reports*, 3(9), 846–851. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf177>
- Riboni, M., Robustelli Test, A., Galbiati, M., Tonelli, C., y Conti, L. (2016).** ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6309–6322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw384>
- Romera-Branchat, M., Severing, E., Pocard, C., Ohr, H., Vincent, C., Née, G., Martinez-Gallegos, R., Jang, S., Andrés, F., Madrigal, P., y Coupland, G. (2020).** Functional Divergence of the Arabidopsis Florigen-Interacting bZIP Transcription Factors FD and FDP. *Cell Reports*, 31(9), 107717.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107717>
- Schindler, U., Menkens, A. E., Beckmann, H., Ecker, J. R., y Cashmore, A. R. (1992).** Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed Arabidopsis GBF bZIP proteins. *The EMBO Journal*, 11(4), 1261–1273.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05170.x>

Serrano-Mislata, A. (2010). *Análisis de la regulación transcripcional del gen TERMINAL FLOWER 1 de Arabidopsis*. [PhD Thesis].

Serrano-Mislata, A., Fernández-Nohales, P., Doménech, M. J., Hanzawa, Y., Bradley, D., y Madueño, F. (2016). Separate elements of the TERMINAL FLOWER 1 cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.135269>

Shannon, S., y Meeks-Wagner, D. R. (1991). A Mutation in the Arabidopsis TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *The Plant Cell*, 877–892. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.9.877>

Shu, K., Chen, Q., Wu, Y., Liu, R., Zhang, H., Wang, S., Tang, S., Yang, W., y Xie, Q. (2016). ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting Arabidopsis FLOWERING LOCUS C transcription. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 195–205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv459>

Shu, K., Luo, X., Meng, Y., y Yang, W. (2018). Toward a Molecular Understanding of Abscisic Acid Actions in Floral Transition. *Plant and Cell Physiology*, 59(2), 215–221. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy007>

Silvestre, M. (2020). *Identificación de dianas e interactores de TFL1, un regulador clave en la floración y la arquitectura de la planta*. [PhD thesis].

Sohn, E. J., Rojas-Pierce, M., Pan, S., Carter, C., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Rojo, E., Surpin, M., y Raikhel, N. V. (2007). The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18801–18806.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.1073/pnas.0708236104>

Song, J., Angel, A., Howard, M., y Dean, C. (2012). Vernalization - a cold-induced epigenetic switch. *Journal of Cell Science*, 125(16), 3723–3731.

<https://doi.org/10.1242/jcs.084764>

Song, L., Huang, S. C., Wise, A., Castanon, R., Nery, J. R., Chen, H., Watanabe, M., Thomas, J., Bar-Joseph, Z., y Ecker, J. R. (2016). A transcription factor hierarchy defines an environmental stress response network. *Science*, 354(6312).

<https://doi.org/10.1126/science.aag1550>

Srikanth, A., y Schmid, M. (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(12), 2013–2037.

<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant and Cell Physiology*, 51(11), 1821–1839. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq156>

Vimolmangkang, S., Han, Y., Wei, G., y Korban, S. S. (2013). An apple MYB transcription factor, MdMYB3, is involved in regulation of anthocyanin biosynthesis and flower development. *BMC Plant Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-176>

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., y Sharma, S. (2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Frontiers in Plant Science*, 08.

BIBLIOGRAFÍA

<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., y Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, *33*(5), 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2003.01676.x>

Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J. E., Stitt, M., y Schmid, M. (2013). Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *339*(6120), 704–707. <https://doi.org/10.1126/science.1230406>

Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X., y Wu, Y. (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *64*(2), 675–684. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers361>

Wang, Z.-P., Xing, H.-L., Dong, L., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Wang, X.-C., y Chen, Q.-J. (2015). Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biology*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0715-0>

Weigel, D., y Glazebrook, J. (2009). Quick Miniprep for Plant DNA Isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2009*(3), pdb.prot5179–pdb.prot5179. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5179>

Weigel, D., y Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, *415*(6873), 751–754. <https://doi.org/10.1038/415751a>

Wen-jun, S., y Forde, B. G. (1989). Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by

BIBLIOGRAFÍA

- high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17(20), 8385–8385.
<https://doi.org/10.1093/nar/17.20.8385>
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., y Weigel, D.** (2005). Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in Arabidopsis. *Science*, 309(5737), 1056–1059.
<https://doi.org/10.1126/science.1114358>
- Wolpert, Beddington, R., Jessell, J., Lawrence, P., y Meyerowitz, E. M.** (1998). *Principles of development*. Oxford University Press.
- Wong, M. M., Bhaskara, G. B., Wen, T.-N., Lin, W.-D., Nguyen, T. T., Chong, G. L., y Verslues, P. E.** (2019). Phosphoproteomics of Arabidopsis Highly ABA-Induced 1 identifies AT-Hook-Like 10 phosphorylation required for stress growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(6), 2354–2363.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1819971116>
- Wood, E.** (1983). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Biochemical Education*, 11(2), 82. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(83\)90068-7](https://doi.org/10.1016/0307-4412(83)90068-7)
- Xin, K., Pan, T., Gao, S., y Yan, S.** (2021). A Transcription Factor Regulates Gene Expression in Chloroplasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6769. <https://doi.org/10.3390/ijms22136769>
- Yoshida, T.** (2006). ABA-Hypersensitive Germination 3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *PLANT PHYSIOLOGY*, 140(1), 115–126. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070128>
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., y**

BIBLIOGRAFÍA

- Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2014). Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell y Environment*, 38(1), 35–49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>
- Zambrano-Rodriguez, A.** (2013). *Caracterización funcional del gen VOZ1, su papel en el control de la arquitectura de la inflorescencia a través de la regulación TFL1*. [PhD Thesis].
- Zhang, B., Li, C., Li, Y., y Yu, H.** (2020). Mobile TERMINAL FLOWER1 determines seed size in Arabidopsis. *Nature Plants*, 6(9), 1146–1157. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0749-5>
- Zhang, Y., Sun, Q., Zhang, C., Hao, G., Wang, C., Dirk, L. M. A., Downie, A. B., y Zhao, T.** (2019). Maize VIVIPAROUS1 Interacts with ABA INSENSITIVE5 to Regulate GALACTINOL SYNTHASE2 Expression Controlling Seed Raffinose Accumulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(15), 4214–4223. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00322>
- Zhou, M., Zhang, K., Sun, Z., Yan, M., Chen, C., Zhang, X., Tang, Y., y Wu, Y.** (2017). LNK1 and LNK2 Corepressors Interact with the MYB3 Transcription Factor in Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Physiology*, 174(3), 1348–1358. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00160>
- Zhu, Y., Klasfeld, S., Jeong, C. W., Jin, R., Goto, K., Yamaguchi, N., y Wagner, D.** (2020a). Florigen family chromatin recruitment, competition and target genes. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.02.04.934026>
- Zhu, Y., Klasfeld, S., Jeong, C. W., Jin, R., Goto, K., Yamaguchi, N., y Wagner, D.** (2020b).

BIBLIOGRAFÍA

TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nature Communications*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18782-1>

Zhu, Y., Klasfeld, S., y Wagner, D. (2021). Molecular regulation of plant developmental transitions and plant architecture via PEPB family proteins: an update on mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*, 72(7), 2301–2311.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eraa598>

ANEXO

Tabla S1. Lista de cebadores utilizados en este TFM.

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	USO
Cebadores para clonación Gateway		
IP10-ANAC102-ATG	ATGGACTTTGCTCTCTTCTCCTC	Primer directo para amplificar el CDS de ANAC102.
IP11-ANAC102-STOP	TTA TTA CCC TTG AGG AGC AAA ATT C	Primer reverso para amplificar el CDS de ANAC102.
IP14-MYB3-ATG	ATG GGA AGA TCA CCA TGC T	Primer directo para amplificar el CDS de MYB3.
IP15-MYB3-STOP	TTA CTA ATG AGT TCT AAC ATC AGA A	Primer reverso para amplificar el CDS de MYB3.
IP17-HAI1/PP2C-ATG	ATG GCT GAG ATT TGT TAC GAG AAC G	Primer directo para amplificar el CDS de HAI1/PP2C.
IP18-HAI1/PP2C-STOP	TTA CTA CGT GTC TCG TCG	Primer reverso para amplificar el CDS de HAI1/PP2C.
Genotipado		
LbB1.3		Primer directo para genotipar alelos mutantes de líneas Salk con inserción de T-DNA.
Secuenciación en plásmidos		
M13 directo	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	Primer directo para la secuenciación de las inserciones en pCR8/GW/TOPO y pMDC32.
M13 reverso	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Primer reverso para la secuenciación de las inserciones en pCR8/GW/TOPO y pMDC32.
IP12-ANAC102-Mid	GCA CTC GTC TTC TAC GCA GG	Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de ANAC102 en

ANEXO

IP16-MYB3-Mid	CCG GTG CGT GAA GAG ATT GG	pCR8/GW/TOPO y pMDC32. Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de <i>MYB3</i> en pCR8/GW/TOPO y pMDC32.
IP20-HAI1/PP2C-Mid	GTG TCT GTC CTT ACG CCG GAG	Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de <i>HAI1/PP2C</i> en pCR8/GW/TOPO y pMDC32.
CGG19_GBF3int.rev	TAGATTTAGTAGGAGTGTCGATG	Primer reverso para la secuenciación de las inserciones de <i>GBF3</i> en pCR8/GW/TOPO, pYFC43 y pYFN43.

CRISPR/Cas9

IP24_DT1-BsF_GBF1	ATATATGGTCTCGATTGTACCCAGCAATGTATCCCC GTT	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology
IP25_DT1-F0_GBF1	TGTACCCAGCAATGTATCCCCGTTTTAGAGCTAGA AATAGC	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology
IP26_DT0-BsR2	ATATTATTGGTCTCAATCTCTTAGTCGACTCTACCA AT	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo

ANEXO

IP27_DT2- BsF2_GBF1	ATATTATTGGTCTCAAGATTGCTTCTGGCAAGAAG TCAAAGTT	descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology
IP28_DT2-F0_GBF1	TGCTTCTGGCAAGAAGTCAAAGTTTTAGAGCTAGA AATAGC	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology
IP29_DT3-R0_GBF2	AACCCCTTATATGTGGGCGTCTCCAATCACTACTTCG TCTCTAACCAT	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology
IP30_DT3-BsR_GBF2	ATTATTGGTCTCGAAACCCCTTATATGTGGGCGTCTC C	Primer para realizar las construcciones de CRISPR siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> , 2015 Genome Biology

Cebadores qRT-PCR

qAtTIP41.Fw1	ATCAGGGTAGGGTGGATTGG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de TIP41 mediante RT-qPCR.
qAtTIP41.Rv1	GGTTTGGCTTTGGGTCGTT	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de

ANEXO

IP-qAT-ANAC102-Fw1	TTA ACG TTC CGG TTA TCG CAG AG	TIP41 mediante RT-qPCR. Primer directo para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-ANAC102-Rv1	CGT ACA ACG CCA TTT CTG GAA GC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-ANAC102-Fw2	GTT CCG GTT ATC GCA GAG ATT GAC	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-ANAC102-Rv2	CGT ACA ACG CCA TTT CTG GAA GC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-ANAC102-Fw3	ATT AAC GTT CCG GTT ATC GCA GAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-ANAC102-Rv3	CGT ACA ACG CCA TTT CTG GAA GC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de ANAC102 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Fw1	AGT GAT GCG GTG TGT TTG TG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de TIP41 mediante RT-qPCR.

ANEXO

IP-qAT-MYB3-Rv1	AAA CCC GAC AAT TCC GAC AC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Fw2	TGC GGT GTG TTT GTG TTG TC	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Rv2	CAT CAG AAA CCC GAC AAT TCC G	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Fw3	AGT CGA CTC GGA AAG TGA GTG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Rv3	ACA CAA ACA CAC CGC ATC AC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Fw4	TCG ACT CGG AAA GTG AGT GTT G	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-MYB3-Rv4	TCC GAC AAC ACA AAC ACA CC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de MYB3 mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI1-Fw1	ATG GCC ATG GCT GTT CCC ATG TAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.

ANEXO

IP-qAT-HAI-Rv1	TCC CAG TCA GCA TCA GCT TCA AAC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI1-Fw2	TCC TCC GAT CAT AAG CCA GAC C	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI-Rv2	GCT CGT GAC ATT GCA AGT ACT CC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI1-Fw3	TCC TCC GAT CAT AAG CCA GAC C	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI-Rv3	GGC CAT CCC AGT AGA TAA CAC GAC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI1-Fw4	TCC TCC GAT CAT AAG CCA GAC C	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.
IP-qAT-HAI-Rv4	GTG GGC CAT CCC AGT AGA TAA CAC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de HAI1/PP2C mediante RT-qPCR.