



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

**Departamento de Biotecnología**

**Papel de *TERMINAL FLOWER 1* en el control de la arquitectura vegetal. Análisis de los genes que regulan su expresión**

**Memoria presentada por  
PEDRO FERNÁNDEZ NOHALES  
para optar al grado de DOCTOR por la Universitat  
Politècnica de València.**

**Director: Francisco Madueño Albi**

**Valencia, Septiembre 2011**



Don **Francisco Madueño Albi**, Doctor en Ciencias Biológicas y Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas) de Valencia,

INFORMA que,

Don **Pedro Fernández Nohales**, Licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que con el título “Papel de *TERMINAL FLOWER 1* en el control de la arquitectura vegetal. Análisis de los genes que regulan su expresión” presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia a 1 de Julio de 2010.

Fdo. Dr. Francisco Madueño Albi



**RESÚMENES**



During the floral transition, the shoot apical meristem (SAM) changes its identity from vegetative, when it produces leaves and shoots, to inflorescence, when it produces flowers. According to the behaviour of the SAM, the inflorescences can be classified as indeterminate, where the inflorescence SAM grows continuously, or determinate, where the SAM forms a terminal flower. In Arabidopsis, the expression of the *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* gene in the centre of the SAM prevents its conversion into a flower and, therefore, the determination of the inflorescence. Thus, *TFL1* plays a key role in the control of plant architecture, a function that is related to its particular expression pattern.

The main aim of this work has been the identification of genes that regulate the expression of *TFL1*. A first step toward that aim has been to perform an EMS mutagenesis of a reporter line containing a *TFL1*pro::GUS transgene in which the regulatory regions of *TFL1* direct the expression of the *GUS* gene. Because of the role of *TFL1* in the control of plant architecture, we screened for plants that showed defects both in the pattern of *TFL1*pro::GUS expression and in inflorescence architecture. Among the selected mutants, the line 63.1, that we named *moss*, shows increased levels of *TFL1*pro::GUS expression, which is also ectopic in flowers, and a dramatic alteration in inflorescence architecture. The positional cloning of the corresponding gene showed that the *moss* phenotype is caused by a hypomorphic mutation in the *ARGONAUTE1 (AGO1)* gene. Our results suggest that *TFL1* expression is regulated by small RNAs through *AGO1*.

In order to identify the promoter regions that are critical for the expression of *TFL1*, we have also analyzed the *TFL1* promoter by phylogenetic footprinting, and have combined these results with those from a deletion analysis previously carried out in our lab. One of the identified regulatory regions has been used in a screening with the yeast one-hybrid system. This screening resulted in the identification of *TCP7*, a transcription factor for which no function has been reported so far, as a protein able to bind to the *TFL1* promoter. The characterization of lines where *TCP7* is over-expressed or silenced showed that they have phenotypes related to the architecture of the inflorescence. Moreover, our data indicate that *TCP7* represses *TFL1*. Our results support the idea that *TCP7* controls plant architecture through the regulation of *TFL1*.





Durante la transición floral, el meristemo apical del tallo (SAM) cambia su identidad de vegetativo, fase en la que produce hojas y ramas, a inflorescente, fase en que produce flores. Las inflorescencias se clasifican, según la identidad del SAM, en indeterminadas, en las que el SAM crece continuamente durante toda la vida de la planta, y determinadas, en las que el SAM da lugar a una flor terminal. En *Arabidopsis*, la expresión del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* en el centro del SAM impide su conversión en flor y, por lo tanto, la determinación de la inflorescencia. Así pues, *TFL1* mantiene la identidad inflorescente del SAM, teniendo, por tanto, un papel clave en el control de la arquitectura de la planta. Esta función de *TFL1* está íntimamente relacionada con su particular patrón de expresión.

El objetivo principal de este trabajo ha sido la identificación de genes que regulan la expresión de *TFL1*. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la mutagénesis con EMS de una línea delatora que contiene un transgén, *TFL1pro::GUS*, en la que la expresión del gen *GUS* se encuentra dirigida por las regiones reguladoras de *TFL1*. Dado al papel de *TFL1* en el control de la arquitectura de la planta, el escrutinio se realizó buscando plantas que tuvieran un patrón de expresión de *TFL1pro::GUS* alterado y, a su vez, presentaran defectos en la arquitectura de su parte aérea. Entre los mutantes seleccionados, la línea 63.1, a la que denominamos *moss*, resultó ser un mutante hipomorfo del gen *ARGONAUTE 1 (AGO1)*. El mutante *moss* muestra un aumento de la expresión de *TFL1pro::GUS* en el SAM, y expresión ectópica en las flores, así como una dramática alteración de la arquitectura de su inflorescencia que parece estar relacionada con el aumento de la expresión de *TFL1*. Nuestros resultados abren la puerta a la idea de que pequeños RNAs participen en la regulación de *TFL1* a través de *AGO1*.

Por otro lado, en este trabajo también se han identificado regiones del promotor de *TFL1* que son clave para la expresión del gen. Para ello se analizó el promotor de *TFL1* mediante *phylogenetic shadowing* y los resultados obtenidos se combinaron con los de un análisis de deleciones realizado previamente en nuestro laboratorio. Una de las regiones reguladoras identificadas se utilizó en un escrutinio de híbrido simple que puso de manifiesto que el factor de transcripción *TCP7*, de función desconocida, es capaz de unirse al promotor de *TFL1*. El análisis fenotípico de líneas con pérdida o ganancia de función del gen *TCP7* ha mostrado que cambios en la expresión de *TCP7* causan alteraciones en la arquitectura de la inflorescencia de la planta. Este análisis también indicó que *TCP7* reprime la expresión de *TFL1*. Nuestros resultados sugieren que *TCP7* controla la arquitectura de la planta a través de la regulación de *TFL1*.



Al llarg de la transició floral, la meristema apical de la tija (SAM) canvia la seua identitat vegetativa, fase en la qual produeix fulles i rames, a inflorescent, fase en la qual produeix flors. Les inflorescències es classifiquen, atenent la identitat de la SAM, en indeterminades, en les quals la SAM creix continuadament durant tota la vida de la planta, i en determinades, en les quals la SAM dóna lloc a una flor terminal. En *Arabidopsis*, l'expressió del gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* al centre de la SAM impedeix la seua conversió en flor i, per tant, determina la inflorescència. Així doncs, *TFL1* manté la identitat inflorescent de la SAM, tenint, per tant, un paper clau en el control de l'arquitectura de la planta. Aquesta funció de *TFL1* està íntimament relacionada amb el seu particular patró d'expressió.

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat la identificació de gens que regulen l'expressió de *TFL1*. Amb aquesta finalitat, d'una banda, es va dur a terme la mutagènesi amb EMS d'una línia reportera la qual incorporava un trasgen (*TFL1pro::GUS*), en la qual l'expressió del gen *GUS* es troba dirigida per les regions reguladores de *TFL1*. Donat el paper de *TFL1* en el control de l'arquitectura de la planta, l'escrutini es va realitzar buscant plantes que presentaren un patró d'expressió de *TFL1pro::GUS* alterat i, a l'hora, presentaren defectes en l'arquitectura de la part aèrea. D'entre els mutants seleccionats, la línia 63.1, a la qual denominem moss, va resultar ser un mutant hipomorf del gen *ARGONAUTE 1 (AGO1)*. El mutant moss mostra un augment de la expressió de *TFL1pro::GUS* en la SAM i expressió ectòpica en les flors, així com una dramàtica alteració de l'arquitectura de la seua inflorescència que sembla estar relacionada amb l'augment de l'expressió de *TFL1*. Els nostres resultats obren les portes a la idea de què RNAs menuts participen en la regulació de *TFL1* a través d'*AGO1*.

D'altra banda, en aquest treball també s'ha identificat regions del promotor de *TFL1* que són clau per a l'expressió del gen. S'analitzà el promotor de *TFL1* mitjançant phylogenetic shadowing i els resultats obtinguts es combinaren amb els d'una anàlisi de delecions realitzat prèviament al nostre laboratori. Una de les regions reguladores identificades va ser utilitzada en un escrutini d'híbrid senzill en el qual es va ficar de manifest que el factor de transcripció *TCP7*, de funció desconeguda, és capaç d'unir-se al promotor de *TFL1*. L'anàlisi fenotípic de les línies amb pèrdua o guany de funció del gen *TCP7* han mostrat que els canvis en l'expressió de *TCP7* causen alteracions en l'arquitectura de la inflorescència de la planta. Aquesta anàlisi també indicà que *TCP7* reprimeix l'expressió de *TFL1*. Els nostres resultats suggereixen que *TCP7* controla l'arquitectura de la planta a través de la regulació de *TFL1*.



**ÍNDICE**



<b>INDICE</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1. La arquitectura de las inflorescencias .....	15
2. El meristemo apical del tallo .....	17
3. El desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	18
3.1 Control del desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	20
3.1.1 Los genes de identidad del meristemo floral .....	21
3.1.2 Los genes integradores de la transición floral .....	22
3.1.3 Integración de las distintas señales por las rutas inductoras de la floración .....	23
3.1.4 Mantenimiento del crecimiento indeterminado del SAM tras la transición floral .....	25
4. <i>TFL1</i> y el desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis .....	25
4.1. La proteína <i>TFL1</i> .....	27
4.2. Patrón de expresión de <i>TFL1</i> .....	28
4.3 Regulación de <i>TFL1</i> .....	29
4.3.1. Regulación de <i>TFL1</i> por las rutas inductoras de la floración .....	29
4.3.2. Regulación de <i>TFL1</i> por los genes de identidad del meristemo floral .....	29
4.3.3. El promotor de <i>TFL1</i> .....	31
4.4. Ortólogos de <i>TFL1</i> en otras especies .....	31
5. Objetivos de este trabajo .....	33
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>Capítulo 1: Búsqueda de genes que regulan a <i>TFL1</i> mediante la mutagénesis de una línea delatora</b> .....	37
1. Mutagénesis de una línea delatora <i>TFL1</i> pro::GUS .....	40
1.1 Descripción de la línea delatora empleada en la mutagénesis .....	40
1.2. Escrutinio de la mutagénesis de la línea reportera <i>TFL1</i> pro::GUS .....	41
1.2.1. Descripción de las líneas mutantes identificadas .....	47
2. Caracterización del mutante <i>moss</i> .....	50

2.1. El mutante <i>moss</i> presentó un fenotipo pleiotrópico con defectos en la arquitectura .....	50
2.2. <i>TFL1</i> se expresa de manera fuerte y ectópica en el mutante <i>moss</i> .....	54
3. Identificación del gen afectado por la mutación <i>moss</i> .....	58
4. Análisis fenotípico del mutante <i>ago1-26</i> .....	60
5. Efecto de la mutación <i>tfl1</i> en el fenotipo del mutante <i>moss</i> .....	61
<b>Capítulo 2: Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de <i>TFL1</i> en especies de brasicáceas</b> .....	<b>65</b>
1. Obtención de las secuencias no codificantes de genes ortólogos de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brasicáceas .....	68
1.1. Identificación del ortólogo de <i>TFL1</i> en <i>C. bursa-pastoris</i> y secuenciación de la región genómica correspondiente .....	70
1.2. Identificación del ortólogo de <i>TFL1</i> en <i>B. rapa</i> y secuenciación de la región genómica correspondiente .....	74
2. Estudio comparativo de la región genómica de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brasicáceas. Identificación de regiones conservadas .....	75
<b>Capítulo 3: Identificación de factores de transcripción candidatos a regular a <i>TFL1</i> mediante la unión directa a su promotor</b> .....	<b>83</b>
1. Identificación de factores de transcripción que interaccionan con regiones reguladoras de <i>TFL1</i> .....	88
1.1. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de MADS con regiones reguladoras del promotor de <i>TFL1</i> .....	88
1.2. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta completa con regiones reguladoras del promotor de <i>TFL1</i> .....	90
2. Caracterización del gen <i>TCP7</i> de <i>Arabidopsis</i> .....	93
2.1. Unión de <i>TCP7</i> al promotor de <i>TFL1</i> .....	93
2.2. Patrón de expresión de <i>TCP7</i> .....	94
2.3. Obtención y análisis de plantas con pérdida de función de <i>TCP7</i> .....	96
2.3.1. Alelos de <i>TCP7</i> obtenidos de una mutagénesis de EMS .....	97
2.3.2. Caracterización del mutante <i>stop</i> que codifica una versión truncada de <i>TCP7</i> .....	99
2.3.3. Reducción de la expresión de <i>TCP7</i> mediante técnicas de silenciamiento génico ....	102
2.4. Obtención y análisis de plantas con ganancia de función de <i>TCP7</i> .....	104
2.4.1. Fenotipo de las líneas 35S:: <i>TCP7</i> .....	104
2.4.2. Análisis de la expresión de <i>TFL1</i> en plantas 35S:: <i>TCP7</i> .....	111



<b>DISCUSIÓN</b> .....	113
1. Análisis del mutante <i>moss</i> . Papel de <i>AGO1</i> en la regulación de <i>TFL1</i> .....	115
1.1. El mutante <i>moss</i> , un nuevo alelo que permite estudiar el papel de <i>AGO1</i> durante el desarrollo .....	115
1.2. El fenotipo del mutante <i>moss</i> sugiere un papel para <i>AGO1</i> en la actividad del SAM .....	115
1.3. La pérdida de función de <i>AGO1</i> afecta a la identidad del meristemo floral .....	116
1.4. La alteración del patrón de expresión <i>TFL1</i> podría contribuir a los defectos relacionados con la identidad del meristemo floral de los mutantes <i>ago1</i> .....	116
1.5. Posibles modelos para explicar la regulación de <i>TFL1</i> por <i>AGO1</i> .....	117
2. Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de <i>TFL1</i> en especies de brasicáceas .....	119
2.1. Conservación modular de las secuencias no codificantes de los genes <i>TFL1</i> de brasicáceas .....	119
2.2. Posible papel de los módulos conservados en la regulación de <i>TFL1</i> .....	120
2.3. Utilidad de los módulos conservados para la predicción de dianas de factores de transcripción que regulan a <i>TFL1</i> .....	121
3. Nuevos posibles reguladores de <i>TFL1</i> identificados por híbrido simple .....	123
4. Función del gen <i>TCP7</i> en el control de la arquitectura de la planta a través de la regulación de <i>TFL1</i> .....	125
4.1. Papel de <i>TCP7</i> en la actividad del SAM y en la transición floral .....	125
4.2. Papel de <i>TCP7</i> en el desarrollo de la hoja .....	125
4.3. Papel de <i>TCP7</i> en el desarrollo de las inflorescencias laterales .....	126
4.4. Posible relación entre <i>TCP7</i> y las auxinas .....	127
4.5. Participación de <i>TCP7</i> en el control del reloj circadiano .....	128
4.6. <i>TCP7</i> reprime la expresión de <i>TFL1</i> .....	129
4.6.1. Relación entre la disminución de los niveles de <i>TFL1</i> y los defectos en la arquitectura de las plantas <i>35S::TCP7</i> .....	129
4.6.2. <i>TCP7</i> podría regular a <i>TFL1</i> a través de la interacción con otros factores de transcripción .....	130
<b>CONCLUSIONES</b> .....	133
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	139
1. Materiales .....	141
1.1. Material vegetal .....	141
1.2. Microorganismos .....	142

1.2.1. Cepas bacterianas .....	142
1.2.2. Cepas de levadura .....	142
1.3. Plásmidos .....	143
1.4. Oligonucléotidos .....	144
1.5. Secuencias utilizadas .....	150
2. Métodos .....	151
2.1. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de Arabidopsis .....	151
2.1.1. Cultivo de Arabidopsis en invernadero .....	151
2.1.2. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i> .....	152
2.1.3. Fertilización cruzada .....	152
2.1.4. Conservación de semillas .....	152
2.1.5. Generación de plantas transgénicas .....	152
2.1.5.1. Transformación genética mediante infiltración al vacío .....	152
2.1.5.2. Selección de plantas transgénicas .....	153
2.2. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias .....	154
2.2.1. Medios y condiciones de cultivo .....	154
2.2.2. Transformación de bacterias .....	155
2.3. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de levaduras .....	155
2.3.1. Medios y condiciones de cultivo .....	155
2.3.2. Transformación de levaduras .....	155
2.4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos .....	156
2.4.1. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	156
2.4.2. Extracción de DNA de cósmidos o BACs de <i>E. coli</i> .....	156
2.4.3. Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	157
2.4.4. Extracción de DNA de levaduras .....	157
2.4.5. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis .....	157
2.4.6. Extracción de RNA total de Arabidopsis .....	158
2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT) .....	158
2.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	158
2.5.2. Transcripción reversa (RT) .....	159
2.5.3. RT-PCR semicuantitativa .....	159
2.5.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) .....	159
2.6. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis .....	160

2.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	160
2.6.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa .....	160
2.7. Detección de DNA transferido a membrana mediante hibridación con una sonda .....	160
2.7.1. Transferencia de DNA a una membrana .....	161
2.7.2. Marcaje de la sonda .....	161
2.7.3. Hibridación, lavados y detección de la señal .....	161
2.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa .....	161
2.9. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	161
2.10. Tratamiento de DNA con enzimas modificadores .....	161
2.10.1. Desfosforilación de extremos cohesivos .....	161
2.10.2. Ligación de fragmentos de DNA .....	162
2.10.2. Ligación de fragmentos de DNA mediante la tecnología <i>Gateway</i> .....	162
2.11. Hibridaciones <i>in situ</i> de RNA (RNA ISH) .....	162
2.11.1. Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina .....	162
2.11.2. Cuantificación de las sondas de RNA .....	163
2.11.3. Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal .....	163
2.12. Construcción de los plásmidos .....	164
2.12.1. Construcciones cebo para los ensayos de híbrido simple .....	164
2.12.2. Construcción con el fragmento de cDNA a partir de la cual se sintetizó la sonda para la RNA ISH de <i>TCP7</i> .....	165
2.12.3. Construcción 35S::TCP7 .....	166
2.12.4. Construcción TCP7-RNAi .....	166
2.13. Métodos de histología y microscopía .....	166
2.13.1. Análisis de la actividad GUS .....	167
2.13.1.2. Aclarado de muestras con hidrato de cloral .....	168
2.13.2. Fijación e inclusión de muestras para RNA ISH .....	168
2.13.3. Obtención de cortes histológicos .....	169
2.13.4. Observación y captura de imágenes con poco aumento .....	169
2.13.5. Microscopía óptica .....	169
2.13.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	169
2.14. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en fondos <i>moss</i> , <i>ago1-26</i> y 35S::TCP7 .....	170
2.14.1. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en el mutante <i>moss</i> .....	170
2.14.2. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en <i>ago1-26</i> .....	171

2.14.3. Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en 35S::TCP7 .....	172
2.15. Genotipado por dCAP .....	172
2.15.1. Generación de la línea empleada en la caracterización de la mutación <i>moss</i> .....	173
2.16. Ensayos de híbrido simple .....	173
2.16.1. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de proteínas MADS .....	173
2.16.2. Escrutinio por híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta entera .....	174
2.17. Determinación y análisis de secuencias de DNA .....	175
2.17.1. Determinación de las secuencias de DNA utilizadas en este trabajo .....	175
2.17.1.1. Secuenciación del gen <i>AGO1</i> en el mutante <i>moss</i> .....	175
2.17.1.2. Secuenciación de las regiones genómicas de <i>TFL1</i> en <i>A. thaliana</i> , <i>C. bursa-pastoris</i> y <i>B. rapa</i> .....	176
2.17.1.3. Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR y clonados en las diferentes construcciones .....	176
2.17.2. Análisis de las secuencias utilizadas en el análisis comparativo de la región genómica de <i>TFL1</i> en diferentes especies de brassicáceas .....	176
2.17.2.1. Predicción de genes .....	176
2.17.2.2. Análisis comparativo de las secuencias .....	176
2.17.2.3. Predicción de sitios de unión a factores de transcripción .....	177
2.17.3. Otras herramientas informáticas utilizadas en este trabajo .....	178
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	181
<b>MATERIALES SUPLEMENTARIOS</b> .....	203
Alineamiento S1 .....	205
Alineamiento S2 .....	209
Alineamiento S3 .....	217
Alineamiento S4 .....	229

# ABREVIATURAS



<b>3'NCS:</b>	Secuencia no codificante localizada en 3' de un gen
<b>5'NCS:</b>	Secuencia no codificante localizada en 5' de un gen
<b>A. lyrata:</b>	<i>Arabidopsis lyrata</i>
<b>A. thaliana:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>ABA:</b>	Ácido abscísico
<b>ABRE:</b>	Elemento de respuesta a ABA
<b>ARR-B:</b>	Familia de factores de transcripción reguladores tipo B de Arabidopsis
<b>AuxRE:</b>	Elemento de respuesta a auxinas
<b>AVT:</b>	AtGenExpress Visualization Tool
<b>B. rapa:</b>	<i>Brassica rapa</i>
<b>BAR:</b>	Bio-Array Resource
<b>BrTFL1:</b>	<i>TFL1</i> de <i>B. rapa</i>
<b>C. bursa-pastoris:</b>	<i>Capsella bursa-pastoris</i>
<b>cDNA:</b>	DNA codificante
<b>ChIP:</b>	Inmunoprecipitación de cromatina
<b>Chip-Seq</b>	Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a ultrasecuenciación
<b>Col:</b>	Ecotipo Columbia silvestre
<b>dsRNA:</b>	RNA de doble cadena
<b>EMS:</b>	metano sulfonato de etilo
<b>ERE:</b>	Elemento de respuesta a etileno
<b>Gal4-AD:</b>	Dominio de activación de la proteína Gal4 de levadura
<b>GARE:</b>	Elemento de respuesta a giberelinas
<b>GAs:</b>	Giberelinas
<b>L. crassa:</b>	<i>Leavenworthia crassa</i>
<b>Ler:</b>	Ecotipo Landsberg erecta
<b>miRNA:</b>	micro RNA
<b>mRNA:</b>	RNA mensajero
<b>ncRNA:</b>	RNA no codificante
<b>NCS:</b>	Secuencia no codificante
<b>ORF:</b>	Pauta abierta de lectura
<b>PCF:</b>	PROLIFERATING CELL FACTORS
<b>qRT-PCR:</b>	Retrotranscripción acoplada a PCR cuantitativa
<b>RISC:</b>	Complejo inductor del silenciamiento génico
<b>RNA ISH:</b>	Hibridación <i>in situ</i> de RNA
<b>SAM:</b>	Meristemo floral del tallo
<b>SEM:</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>siRNA:</b>	RNA pequeño de interferencia
<b>sORF:</b>	pequeña ORF
<b>sRNA:</b>	RNA de pequeño tamaño
<b>TAIR:</b>	The Arabidopsis Information Resource
<b>TFBS:</b>	Sitio de unión a factores de transcripción
<b>TFLpro:</b>	5'NCS+3'NCS de <i>TFL1</i>
<b>TFLpro::GUS:</b>	Construcción que contiene el gen delator GUS fusionado a las secuencias no codificantes 5' y 3' del gen <i>TFL1</i> .
<b>UTR:</b>	Región no traducible





# INTRODUCCIÓN



## 1. La arquitectura de las inflorescencias

Las plantas presentan una gran diversidad en la arquitectura o forma de su parte aérea. La arquitectura de la parte aérea depende de la variación en forma, tamaño, número y disposición de los órganos aéreos, las hojas, los tallos y las flores (posteriormente frutos) (Benlloch *et al.*, 2007).

Los órganos aéreos de la planta se desarrollan a partir de una población de células madre pluripotentes que forman el meristemo apical del tallo (apartado 2.1). Durante el ciclo de vida de la planta, el meristemo apical del tallo (SAM) pasa por dos fases, la fase vegetativa y la fase reproductiva. Durante el desarrollo vegetativo, el SAM produce hojas con yemas axilares en sus flancos. Tras percibir las correspondientes señales ambientales y endógenas, el SAM experimenta la transición a la fase reproductiva, adquiriendo una identidad inflorescente (Irish, 2010). El SAM inflorescente dará lugar a la inflorescencia, la parte de la planta donde se localizan las flores (Weberling, 1992), al producir en sus flancos meristemos laterales con identidad floral que acabarán convirtiéndose en flores.

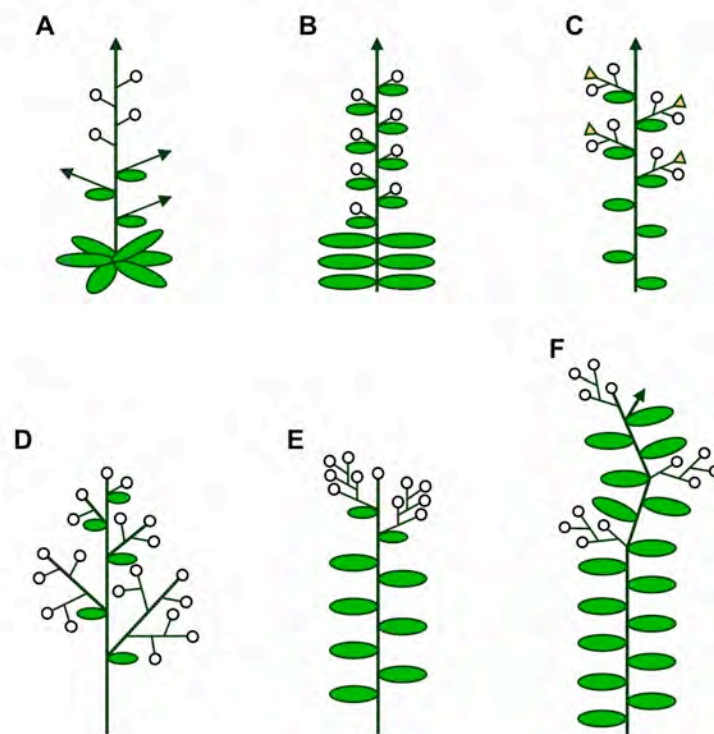
Los tipos de inflorescencias se han clasificado siguiendo varios criterios (Weberling, 1992) que en definitiva obedecen a la identidad que adquieren el SAM y los meristemos laterales que éste origina. Uno de estos criterios ha sido si el SAM mantiene siempre su identidad inflorescente, dando lugar a un crecimiento continuo e indeterminado del eje principal, o si por el contrario, llegado el momento, el SAM adquiere identidad de meristemo floral y por lo tanto, el eje principal finaliza su desarrollo con la formación de una flor terminal.

Sobre este criterio de crecimiento indeterminado o determinado de la inflorescencia principal, junto a otros criterios, como son la existencia o no de un eje principal en la inflorescencia, o si las flores se forman o no directamente en el eje principal, Prusinkiewicz *et al.* (2007) agruparon las inflorescencias observadas en la naturaleza en tres tipos de arquitecturas principales:

- *Racimos*, compuestos por un eje principal, normalmente indeterminado, que lateralmente presenta flores o nuevos ejes que reiteran este patrón de desarrollo. Los racimos pueden ser *simples* si las flores se forman directamente del eje principal, como en *Arabidopsis thaliana* o *Antirrhinum majus* (Figura I.1 A y B), o *compuestos* si las flores se forman a partir de las ramas secundarias o de un orden superior, como en guisante (*Pisum sativum*) (Figura I.1 C) o *Medicago truncatula*.

- *Paniculas*, compuestas por un eje principal que forma una flor terminal y contiene ejes laterales que reiteran este patrón. El grado de ramificación de los ejes laterales disminuye en sentido acropétalo (desde la base hacia el ápice). Las inflorescencias de algunas especies del género *Polemonium* (Figura I.1 D) o de algunas leñosas, como *Sorbus aucuparia*, son ejemplos de paniculas.

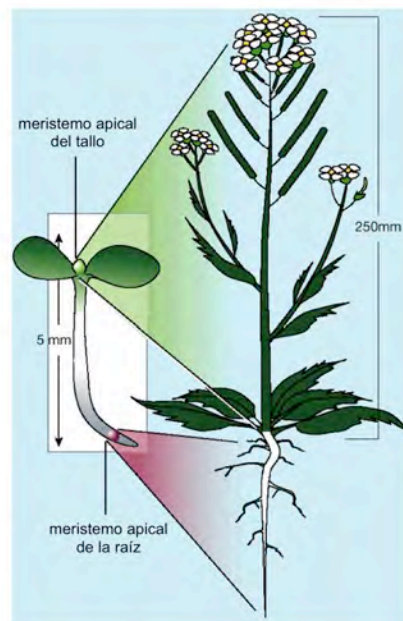
- *Cimos*, compuestos por un primer eje que termina en una flor y en los que el crecimiento continúa a partir de ejes laterales, por debajo de la flor terminal, que reiteran este patrón. De este modo, la inflorescencia está compuesta por una secuencia de ejes determinados. La inflorescencia del tabaco (*Nicotiana tabacum*) es un ejemplo de este tipo de arquitectura (Figura I.1 E). Un caso particular de cimo es el *simpodio*, como el que presenta el tomate (*Solanum lycopersicum*) (Figura I.1 F). En el tomate, una vez el tallo principal finaliza su desarrollo con la formación de la inflorescencia terminal, el crecimiento es retomado por un meristemo axilar que produce varias hojas antes de generar una nueva inflorescencia terminal. Este proceso se repite indefinidamente. Además, los distintos tallos generados suelen alinearse en la misma dirección que el principal, ya que las inflorescencias terminales son desplazadas lateralmente. Como consecuencia, se produce una planta con un eje de crecimiento aparentemente continuo donde se observa una alternancia entre la fase vegetativa e inflorescente del desarrollo (Pnueli *et al.*, 1998).



**Figura I.1. Diagramas de diferentes tipos de inflorescencias.** Fila superior, inflorescencias indeterminadas. **A)** El racimo simple de *Arabidopsis thaliana*. **B)** El racimo simple de *Antirrhinum majus*. **C)** El racimo compuesto de guisante. Fila inferior, inflorescencias determinadas. **D)** Panícula similar a la de algunas especies del género *Polemonium*. **E)** El cimo de tabaco. **F)** El simpodio de tomate. Los óvalos verdes representan hojas o brácteas. Las flechas representan ejes de crecimiento indeterminado. Los círculos representan flores. En (C) los triángulos con fondo amarillo representan órganos residuales. Imágenes modificadas a partir de Benlloch *et al.* (2007).

## 2. El meristemo apical del tallo

El desarrollo vegetal es fundamentalmente post-embionario. Durante la embriogénesis, en los extremos del eje longitudinal de la futura plántula se establecen los meristemos apicales del tallo y la raíz, a partir de las cuales se formarán todas las estructuras adultas de la planta (Figura I.2) (Bowman, 1994; Wolpert y Tickle, 2010). Todo meristemo se caracteriza por la presencia en su zona central de una población de células pluripotentes que están en constante división, auto-renovándose (Sablowski, 2004) al mismo tiempo que son poco a poco desplazadas hacia la periferia, donde se diferenciarán para formar los órganos de la planta adulta (Irish, 2010; Stahl y Simon, 2010).



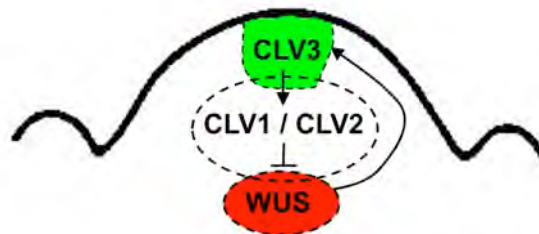
**Figura I.2. El desarrollo de las plantas es fundamentalmente post-embionario.** Tras la germinación se forma una plántula donde ya se observa la estructura básica de lo que será la morfología de la planta adulta. Esta morfología deriva de la actividad de los meristemos apical del tallo y apical de la raíz, establecidos durante la embriogénesis. Las escalas de la figura son aproximadas. Imagen de Arabidopsis modificada a partir de Weigel y Jurgens (2002).

Todos los órganos de la parte aérea de la planta se forman a partir del meristemo apical del tallo. En *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* y *WUSCHEL (WUS)* son dos genes clave en la regulación del desarrollo del SAM. *STM* y *WUS* actúan sinérgicamente durante el desarrollo del meristemo y son necesarios tanto para el establecimiento del SAM durante la embriogénesis como para el mantenimiento de los meristemos vegetativo, inflorescente y floral (Clark *et al.*, 1996; Laux *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1996; Gallois *et al.*, 2002; Lenhard *et al.*, 2002).

El gen *STM* codifica un factor de transcripción con homeodominio que se expresa por todo el meristemo (Long *et al.*, 1996). *STM* retrasa la diferenciación, facilitando así la formación de una población de células pluripotentes lo suficientemente grande como para poder iniciar la organogénesis (Lenhard *et al.*, 2002).

El gen *WUS*, que también codifica un factor de transcripción con homeodominio, tiene restringida su expresión a un grupo de células debajo de la zona central que se conoce como centro organizador. *WUS* es necesario y suficiente para mantener el estado indiferenciado de la población de células pluripotentes (Mayer *et al.*, 1998; Brand *et al.*, 2000; Schoof *et al.*, 2000). En las células del centro organizador, *WUS* activa la expresión de *CLAVATA 3 (CLV3)*, que codifica una proteína de secreción extracelular perteneciente a la familia CLV3-ESR (CLE) (Fletcher *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2006). Por su parte, *CLV3*, a través de la actividad del complejo receptor transmembrana formado por *CLV1* y *CLV2*, limita el tamaño del centro organizador, donde se expresa *WUS* (Figura I.3) (Brand *et al.*, 2000; Fletcher *et al.*, 1999; Lenhard y Laux, 2003; Rojo *et al.*, 2002; Schoof *et al.*, 2000). De este modo, se establece un fino control de la población apical de células madre. Cuanto mayor sea el tamaño de esta población se secretará más *CLV3*, de forma que el dominio de expresión de *WUS* será menor, y viceversa.

El mantenimiento, durante toda la vida de la planta, de la población apical de células madre indiferenciadas es la base del crecimiento indeterminado del meristemo apical del tallo.



**Figura I.3. Control genético de la actividad del SAM.** *WUS*, que se expresa en el centro organizador (color rojo) mantiene indiferenciada la población de células madre. Por su parte, las células madre (color verde) expresan *CLV3*, que codifica para un pequeño péptido que es secretado extracelularmente. *CLV3* activa una ruta de señalización mediada por *CLV1* y *CLV2*. Esta ruta acaba reprimiendo la expresión de *WUS*. →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa.

### 3. El desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis*

El desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis* está íntimamente ligado con el desarrollo del SAM. Así, tras la germinación, el SAM pasa por una fase vegetativa, en la que produce hojas con apenas elongación de los entrenudos entre ellas, formando la estructura conocida como roseta. Además, las hojas de roseta contienen meristemos axilares asociados en sus flancos.

Posteriormente, tras recibir las señales externas y endógenas adecuadas (apartado 4), el SAM sufre la transición a la fase inflorescente, siendo ésta distinguible por el desarrollo a partir del SAM de órganos laterales diferentes a los de la fase anterior. Esta fase inflorescente se divide a su vez en dos. Así pues, en una primera fase inflorescente se generan hojas caulinares en cuyas axilas se desarrollan meristemas laterales inflorescentes y, finalmente, durante la segunda fase inflorescente el SAM produce los primordios florales, que se seguirán generando de manera ininterrumpida durante toda la vida de la planta, dando lugar a una inflorescencia indeterminada de tipo racimo simple (Figura I.1 A y Figura I.2).

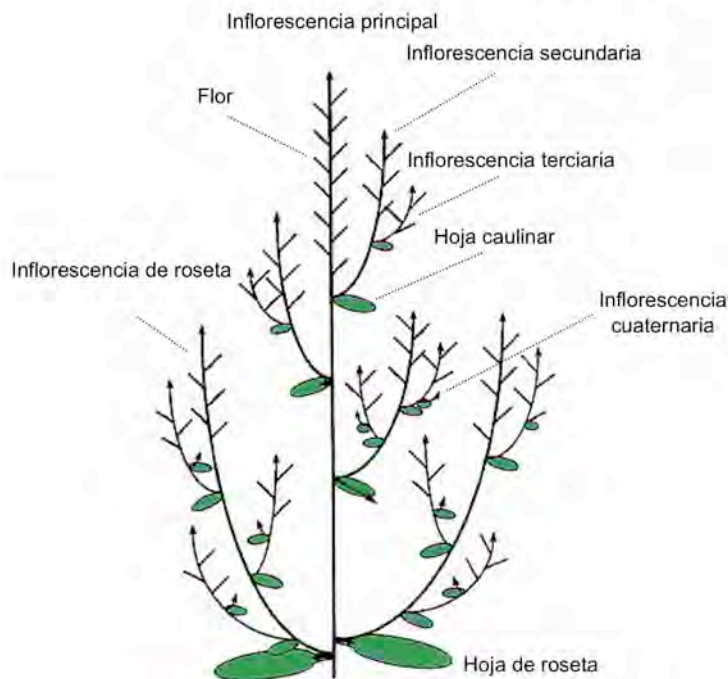
En *Arabidopsis*, la generación de las hojas caulinares y de los primeros primordios de flores va acompañada del aumento en la longitud de los entrenudos, produciéndose la elongación del tallo de la inflorescencia o *bolting* (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994). Por último, una vez se ha formado la inflorescencia principal, pueden crecer nuevas inflorescencias a partir de las axilas de las hojas de roseta.

En resumen, y para aclarar algunos términos que se utilizarán durante el apartado de *resultados* de este trabajo, la arquitectura de la parte aérea de una planta de *Arabidopsis* consta de las siguientes partes (Figura I.4) (Bowman, 1994; Meyerowitz y Somerville, 1994):

- Una inflorescencia principal con una roseta de hojas en su base y con flores en su parte más apical.

- La inflorescencia principal en su parte basal presenta hojas caulinares que sustentan inflorescencias laterales (también conocidas como ramas), desarrolladas a partir de los meristemas laterales formados en sus axilas. Por la posición en que se desarrollan estas inflorescencias laterales respecto a la inflorescencia principal, se denominan inflorescencias secundarias. A su vez, estas inflorescencias secundarias desarrollan hojas caulinares que darán lugar a inflorescencias terciarias, a partir de las cuales pueden llegar a formarse inflorescencias cuaternarias (Koorneef *et al.*, 1991; Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Schultz y Haughn, 1991; Alvarez *et al.*, 1992).

- Por último, algunos de los meristemas laterales formados en las axilas de las hojas de roseta pueden desarrollarse y dar lugar a inflorescencias laterales a las que denominaremos inflorescencias de roseta. Las inflorescencias de roseta reproducen el mismo patrón de desarrollo que la inflorescencia principal.



**Figura I.4. Estructura de la inflorescencia de una planta de Arabidopsis adulta cultivada en día largo.** El diagrama muestra todas las hojas caulinares, pero sólo se representan las hojas de roseta que contienen inflorescencias asociadas. Las superficies ovaladas verdes representan las hojas, caulinares o de roseta. Las flechas indican crecimiento indeterminado. Imagen modificada a partir de Alvarez *et al.*, (1992).

### 3.1 Control del desarrollo de la inflorescencia en Arabidopsis

Para que Arabidopsis desarrolle su inflorescencia, es necesario que antes el SAM experimente el cambio de fase vegetativa a fase inflorescente, también conocido como transición floral. Debido a su naturaleza sésil, las plantas aseguran su éxito reproductivo floreciendo sólo cuando las condiciones sean las idóneas. Esto se consigue a través de una red de rutas de señalización que monitorizan una serie de factores, tanto externos como internos a la planta, que controlan cuándo ocurre la transición floral (Figura I.5).

En Arabidopsis se conocen cuatro rutas genéticas principales de las que depende la floración y que están íntimamente relacionadas con los condicionantes tanto exógenos como endógenos citados anteriormente (Amasino, 2010). Por ejemplo, Arabidopsis es una planta facultativa de día largo, es decir, pese a no mostrar un requerimiento absoluto de días largos para florecer, en condiciones de día largo se reduce su tiempo de floración, indicando la existencia de una *ruta dependiente del fotoperiodo*. Bajo días cortos, la floración se retrasa pero la planta finalmente es capaz de florecer. La *ruta de las giberelinas* es clave para que tenga lugar la floración en estas condiciones. Del mismo modo, existen variedades de Arabidopsis que necesitan una exposición prolongada al frío para florecer. La *ruta de la vernalización* es la responsable de controlar el momento de la floración bajo estas condiciones. Por último, pese a que las condiciones externas sean las óptimas para florecer, también es necesario que otros



factores endógenos, principalmente la edad de la planta, alcancen un nivel adecuado. Así, la *ruta autónoma* recibe información sobre el estado del desarrollo en el que se encuentra la planta además, esta ruta también integra información procedente de la temperatura ambiental.

Al final, la información procedente de todas estas rutas converge en la regulación transcripcional de varios integradores florales, que a su vez regulan la actividad de los genes de identidad del meristemo floral, que son lo que en última instancia inducirán la formación de las flores en los flancos del meristemo inflorescente.

### 3.1.1 Los genes de identidad del meristemo floral

Los genes de identidad del meristemo floral son los que cuando se expresan en los flancos del SAM confieren una identidad de flor al primordio lateral. Estos genes activan y dirigen la expresión de los genes homeóticos florales encargados de construir la flor (Irish, 2010). Los principales genes de identidad del meristemo floral en *Arabidopsis* son *LEAFY* (*LFY*), *APETALA 1* (*API*) y *CAULIFLOWER* (*CAL*).

El gen *LFY* codifica un factor de transcripción exclusivo del reino vegetal, presente desde los musgos a las eudicotiledóneas (Maizel *et al.*, 2005). Durante el desarrollo inflorescente, *LFY* se expresa fuertemente en los primordios laterales del SAM, especificando la identidad floral de los mismos ya que activa la expresión de otros genes de identidad del meristemo floral como *API* y *CAL* (Figura I.5) (Parcy *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1999; William *et al.*, 2004). En estadios posteriores del desarrollo floral, *LFY*, junto con el cofactor *UNUSUAL FLORAL ORGANS* (*UFO*) también interviene en la regulación de genes homeóticos florales como *APETALA 3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) y *AGAMOUS* (*AG*) (Irish, 2010).

Los genes *API* y *CAL* codifican factores de transcripción de la familia MADS (Mandel *et al.*, 1992; Kempin *et al.*, 1995) con funciones redundantes (Bowman *et al.*, 1993; Kempin *et al.*, 1995). *API* y *CAL*, además de ser activados por *LFY* en el meristemo floral, a su vez mantienen inducida la expresión de *LFY* en el mismo (Figura I.5) (Bowman *et al.*, 1993; Parcy *et al.*, 1998; Liljegren *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2010), asegurando el mantenimiento de la identidad del meristemo floral y evitando su reversión a inflorescencia. Posteriormente, la expresión de *API* queda reducida a los dos verticilos más externos de la flor donde participa, junto a *APETALA 2*, (*AP2*) como gen homeótico floral en el desarrollo de los sépalos y pétalos (Irish and Sussex, 1990; Bowman *et al.*, 1993).

Aunque *LFY*, *API* y *CAL* son los principales genes que especifican y mantienen la identidad del meristemo floral, también se considera a los genes *FRUITFULL* (*FUL*) y *AP2* como genes de identidad del meristemo floral. *FUL* codifica un factor de transcripción de la familia MADS que induce la expresión de *LFY* junto a *API* y *CAL* (Figura I.5) (Ferrándiz *et al.*, 2000), mientras que *AP2* actúa durante las primeras etapas del desarrollo floral reforzando la actividad de *LFY* y *API* (Irish and Sussex, 1990; Bowman *et al.*, 1993).

### 3.1.2 Los genes integradores de la transición floral

Los genes integradores son los que recogen la información recibida por las distintas rutas inductoras de la floración y desencadenan la transición floral, activando la expresión de los genes de identidad del meristemo floral. Por lo tanto, estos genes deben ser considerados como promotores de la transición y las alteraciones en su función se manifiestan en retraso o adelanto en el tiempo de floración.

Los genes integradores que promueven la transición floral son básicamente cuatro: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* y *LFY*, previamente presentado como gen de identidad de meristemo floral.

Como hemos dicho, el efecto último de estos genes es la inducción de los genes de identidad del meristemo floral (Figura I.5). Así, la proteína FT, formando un heterodímero con un factor transcripcional de la familia bZIP llamado FD, activa en el SAM la transcripción de *SOC1* y *API* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006). SOC1 y AGL24 son dos factores de transcripción de la familia MADS que activan recíprocamente su expresión en el ápice (Liu *et al.*, 2008), al mismo tiempo que el complejo formado por ambas proteínas activa la transcripción de *LFY* (Liu *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Por último, *LFY*, como hemos comentado anteriormente, activa la expresión de *API* y *CAL* al principio del desarrollo del meristemo floral.

Pero no sólo con la activación de estos genes integradores de la transición floral es suficiente para que se desencadene la transición floral sino que estos genes integradores se encuentran a su vez controlados por represores. Así, este mecanismo represor actúa de refuerzo extra para asegurar que la planta florezca sólo cuando se den todos los factores adecuados (Yant *et al.*, 2009).

El factor de transcripción de la familia MADS codificado por el gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)* es el principal represor de los genes integradores de la transición floral. FLC actúa junto a otra proteína MADS codificada por el gen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). El dímero FLC/SVP es un represor global de la transición floral al ejercer su efecto sobre *FT*, *FD* y *SOC1* (Figura I.5) (Helliwell *et al.*, 2006; Searle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). FLC, de forma análoga a los genes integradores (inductores) de la transición floral, debe ser considerado como un "represor integrador" de la transición floral, ya que como se verá en el siguiente apartado, el efecto de varias rutas inductoras de la floración consiste en poner freno a la actuación de FLC (Figura I.5).

Además de FLC, existen otros represores de la transición floral que actúan básicamente a nivel de *FT*. Son los genes *TEMPRANILLO 1 (TEM 1)*, *TEMPRANILLO 2 (TEM 2)*, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)* y *SCHLAFMUTZE (SMZ)* cuyas proteínas reprimen a *FT* a través de diversos mecanismos (Figura I.5) (Jung *et al.*, 2007; Castillejo and Pelaz, 2008; Mathieu *et al.*, 2009). Por otra parte, *FT* también es reprimido a nivel epigenético por las proteínas reguladoras de cromatina *TERMINAL FLOWER 2 (TFL2)* y *EARLY BOLTING IN SHORT*

DAYS (EBS) (Figura I.5) (Kotake *et al.*, 2003; Takada and Goto, 2003; Piñeiro *et al.*, 2003).

### 3.1.3 Integración de las distintas señales por las rutas inductoras de la floración

Una vez conocidos los protagonistas, sólo falta integrar todo para explicar cómo los distintos factores exógenos y endógenos son percibidos por distintas rutas genéticas para inducir la floración.

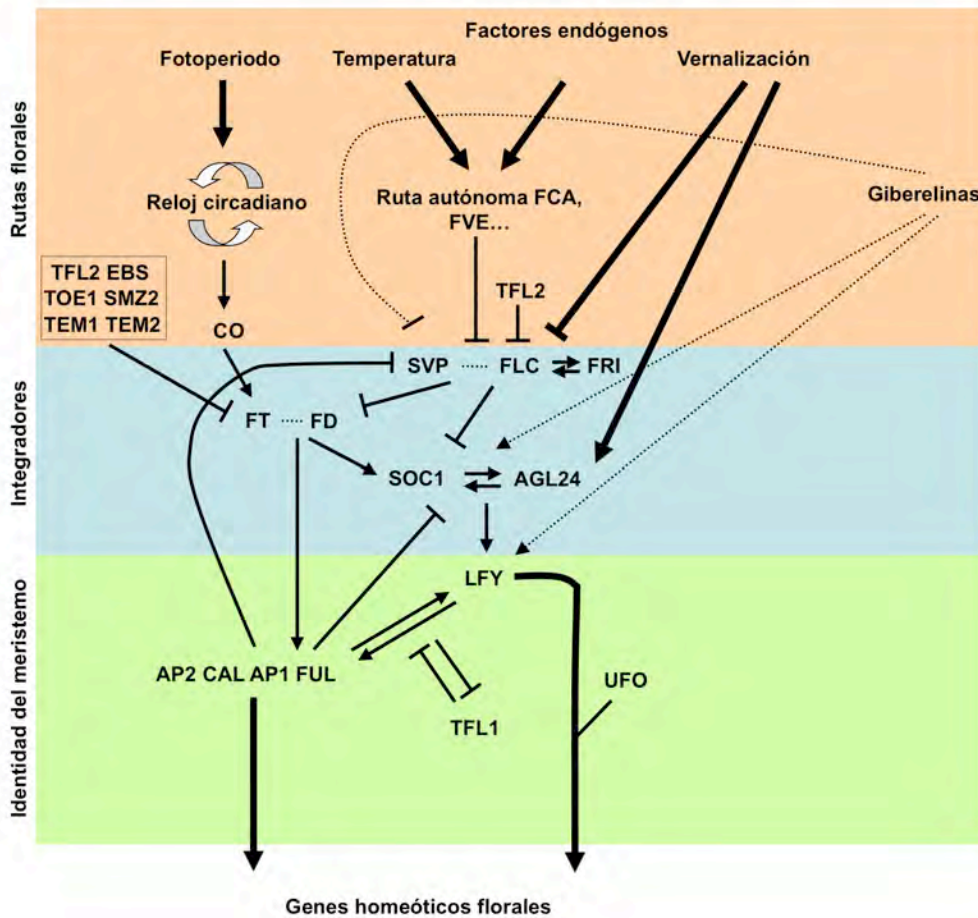
La *ruta del fotoperiodo* (Figura I.5) mide la longitud del día integrando la información procedente de distintos fotorreceptores y el reloj circadiano a través de la regulación transcripcional y postranscripcional de *CONSTANS*, que codifica un factor de transcripción con dedos de zinc. Sólo en condiciones de día largo la proteína CO es estable (Valverde *et al.*, 2004) pudiendo así activar la transcripción de *FT* en las hojas (Suárez-López *et al.*, 2001; Yanovsky and Kay, 2002; Wigge *et al.*, 2005). La proteína FT viaja desde las hojas, a través del floema (Corbesier *et al.*, 2007; Jaeger *et al.*, 2006; Mathieu *et al.*, 2007), hasta el SAM donde ejerce su acción inductora de la transición floral (apartado 1.4.2).

La *ruta de la vernalización* (Figura I.5), induce la floración tras un periodo prolongado de exposición al frío. De este modo, junto con el aumento de la duración del día y la temperatura ambiental, la planta percibe que el invierno ha pasado y llega la primavera. Esta ruta no está activa en todos los ecotipos de *Arabidopsis*, o dicho de otra manera, no todos ellos requieren la exposición al frío para poder florecer. Esto se debe, principalmente a la existencia de diferentes alelos de *FLC* y de su principal activador, *FRIGIDA (FRI)*, fruto de la variación natural (Johanson *et al.*, 2000; Michaels *et al.*, 2003). La ruta de vernalización induce la transición floral al actuar directamente sobre *FLC*, provocando su represión transcripcional a través de procesos relacionados con la modificación de la cromatina (Michaels and Amasino, 1999; Sung and Amasino, 2004; Bastow *et al.*, 2004).

Por otro lado, la capacidad de *Arabidopsis* para florecer en condiciones de día corto, donde los niveles de *FT* son muy bajos (Wigge *et al.*, 2005) es posible gracias a la acción de la *ruta de las giberelinas*. Así en día corto, las giberelinas inducen la floración a través de dos mecanismos independientes de *FT* (Figura I.5), por un lado activando a *LFY* y *SOC1* (Blazquez *et al.*, 1998; Blazquez and Weigel, 2000; Moon *et al.*, 2003; Hisamatsu and King, 2008) y por otro lado, reduciendo la acción negativa del complejo FLC/SVP al reprimir la expresión de *SVP* (Li *et al.*, 2008). Además, recientemente se ha visto que las giberelinas inducen la expresión de *FT* en día largo (Hisamatsu and King, 2008), aunque en estas condiciones su papel en la transición floral es secundario.

Por último, la *ruta autónoma* confiere a la planta la capacidad de florecer independientemente de las condiciones ambientales. Esta ruta es compleja y está formada por al menos dos mecanismos distintos que promueven la floración de manera independiente (Figura I.5). Por un lado, la ruta autónoma *clásica* la integran una serie de genes, como *FCA* y *FVE*, relacionados, respectivamente, con el metabolismo de RNAs y la modificación de la cromatina,

que en última instancia reprimen a *FLC*. Esta ruta, aunque presente en *Arabidopsis*, no se da en todas las plantas (Amasino, 2010) y en *Arabidopsis* también parece implicada en la percepción de la temperatura ambiental (Kumar and Wigge, 2010). Por otro lado, la variante más "moderna" de la ruta autónoma está relacionada con la capacidad para florecer según la edad de la planta y en *Arabidopsis* implica a los microRNAs codificados por los genes *MIR156* y *MIR172*, así como a los factores de transcripción SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE (SPL) y AP2 (Mathieu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Yamaguchi *et al.*, 2009).



**Figura I.5. Control de la transición floral en *Arabidopsis*.** El esquema indica los principales genes implicados en la transición floral y las interacciones entre ellos. En *Arabidopsis*, la floración está regulada a través de cuatro rutas principales que perciben información procedente del ambiente y endógena de la planta: la ruta del fotoperiodo, la ruta autónoma, la ruta de la vernalización y la ruta de las giberelinas. Estas rutas convergen en un grupo de genes que integran esta información (*LFY*, *FT*, *SOC1*, *AGL24*, *FLC*, *SVP*) y regulan la expresión de los genes de identidad de meristemo floral (*AP1*, *LFY*), que dirigen el desarrollo de las flores. Asimismo, los genes de identidad de meristemo floral evitan la reversión a inflorescencia de los meristemos florales, reprimiendo en ellos la expresión de genes de identidad de meristemo inflorescente y de tiempo de floración (*AGL24*, *SOC1*, *SVP* y *TFL1*). →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa. Las líneas discontinuas entre *FT* y *FD*, y *SVP* y *FLC*, indican interacción proteína-proteína. La acción de las giberelinas sobre otros reguladores florales se indica mediante líneas punteadas. Imagen modificada a partir de Serrano-Mislata (2010).

### 3.1.4 Mantenimiento del crecimiento indeterminado del SAM tras la transición floral

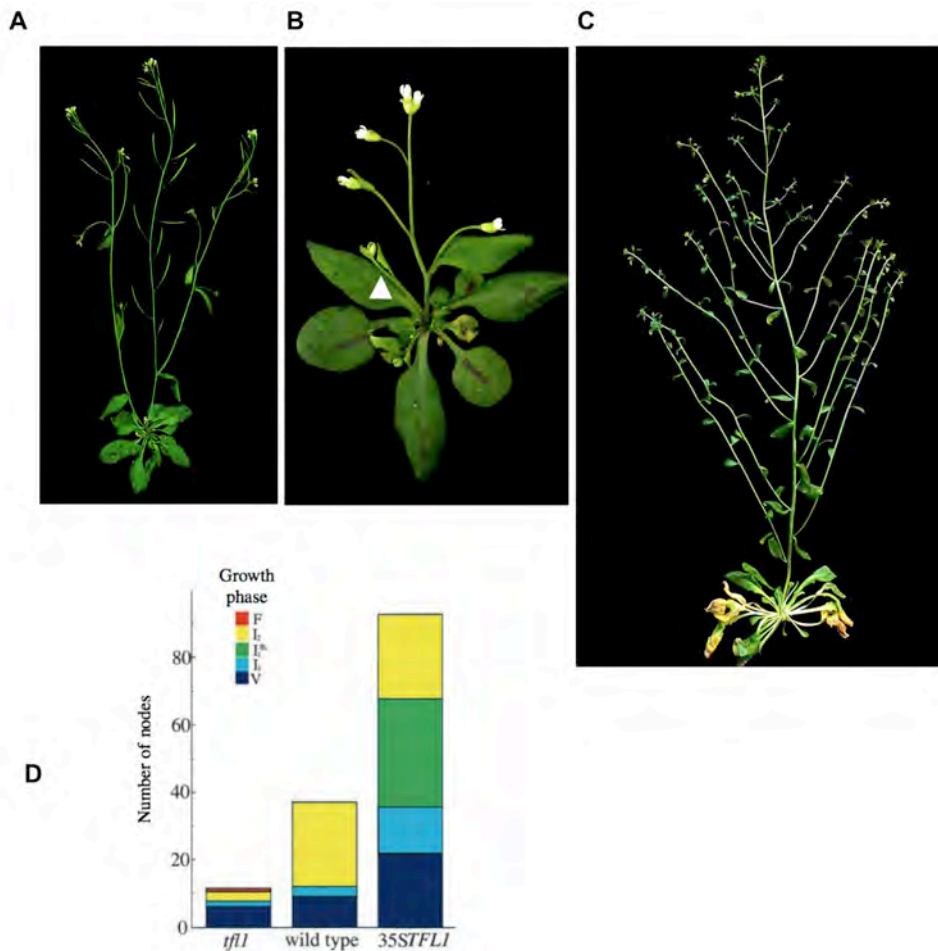
En *Arabidopsis*, tras la transición floral es necesario mantener la identidad inflorescente del SAM para evitar su determinación. Esta función la lleva a cabo el gen *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*.

Las funciones de *TFL1* y los genes de identidad del meristemo floral son antagónicas, ya que allí donde se expresan confieren un carácter o de tallo o de flor a la nueva estructura. Por lo tanto, para el correcto desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis* es necesario que la expresión de *TFL1* quede confinada al centro del SAM para impedir su determinación, mientras que la de *API*, *LFY* y *CAL* ha de quedar confinada a sus flancos, que es donde se formarán las flores. Para conseguir que los patrones de expresión de estos dos grupos de genes antagónicos quede restringido a zonas excluyentes y no solapantes del ápice, se da una represión mutua entre ellos (Figura I.5). De esta forma, *LFY*, *API*, *CAL* y *FUL* especifican y mantienen la identidad del meristemo floral, evitando su reversión a meristemo inflorescente, al reprimir en él la expresión de *TFL1* (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999; Ferrándiz *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011). Por el otro lado, la acción de *TFL1* en el centro del SAM, reprime la expresión de los genes de identidad del meristemo floral manteniendo así el carácter inflorescente de éste (apartado 1.5.2.1).

## **4. *TFL1* y el desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis***

El gen *TFL1* es un regulador clave del desarrollo de la inflorescencia en *Arabidopsis*. Alteraciones en la función de *TFL1* afectan a la arquitectura de la parte aérea de la planta.

Una planta mutante *tfl1* se diferencia de una planta silvestre principalmente en dos aspectos: las plantas *tfl1* florecen antes y sus inflorescencias se hallan transformadas en flores (Figura I.6) (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992; Schultz, 1993; Bradley *et al.*, 1997). Durante la fase vegetativa, el patrón de desarrollo de una planta *tfl1* es aparentemente normal aunque acaba floreciendo tras producir un menor número de hojas que la planta silvestre (Figura I.6) (Shannon y Meeks-Wagner, 1991; Bradley *et al.*, 1997). Por su parte, el desarrollo inflorescente de las planta *tfl1* se encuentra afectado (Figura I.6). Así, la primera fase inflorescente se acorta ligeramente, formándose solamente una o dos hojas caulinares. A continuación, la segunda fase inflorescente es muy corta y tras la producción de entre una y cinco flores, el ápice se determina formando una flor terminal (Bradley *et al.*, 1997; Ratcliffe *et al.*, 1999).



**Figura I.6. *TFL1* es un gen clave para el control de la arquitectura de *Arabidopsis*.** **A)** Planta silvestre del ecotipo Col cultivada en día largo. **B)** Planta *tfl1-1* cultivada en día largo. Esta imagen se ha ampliado respecto al resto para resaltar las modificaciones en la arquitectura de la inflorescencia. La punta de flecha indica una “inflorescencia de roseta” que se reduce a una única flor sustentada por un pedicelo muy largo. **C)** Planta 35S::*TFL1* cultivada en día largo. Esta planta aún no ha entrado en la segunda fase inflorescente, donde se forman las flores. **D)** Efecto de la actividad de *TFL1* en la duración de las fases del desarrollo del SAM. Cada fase está representada por una barra de color y su duración se mide según el número de nudos que el SAM produce en ella. V, fase vegetativa donde se producen hojas de roseta; I1, primera fase inflorescente, donde se producen inflorescencias secundarias sustentadas por hojas caulinares; I1\*, fase inflorescente exclusiva de las plantas 35S::*TFL1* donde se producen inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares; I2, segunda fase inflorescente, donde se producen flores; F, fase exclusiva de las plantas *tfl1* donde se produce la flor terminal. Imagen modificada a partir de Ratcliffe *et al.*, (1998).

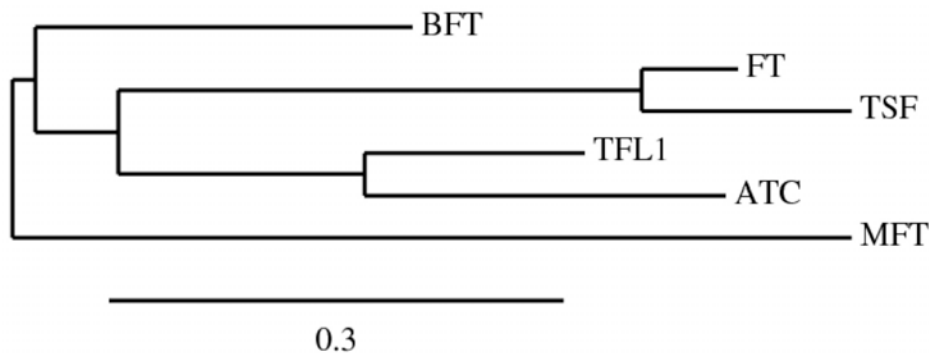
Al contrario que la pérdida de función de *TFL1*, la sobreexpresión de *TFL1* bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.*, 1985), extiende la longitud de las fases vegetativa e inflorescente (Figura I.6) (Ratcliffe *et al.*, 1999). Las plantas 35S::*TFL1* presentan una fase vegetativa mucho más larga que la planta silvestre. La primera fase inflorescente incrementa su duración aún más, lo que se traduce en la formación de una gran cantidad de inflorescencias secundarias. Además, aparece una nueva fase inflorescente, no observada en plantas silvestres, caracterizada por la formación de inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares. Estas coflorescencias adquieren características más florales según se avanza en sentido acropétalo. Finalmente, la planta 35S::*TFL1* alcanza la segunda fase

inflorescente, durante la cual se generaran las flores. Puesto que las inflorescencias secundarias e inflorescencias de roseta repiten el patrón de desarrollo de la inflorescencia principal, se obtiene una planta de gran tamaño y con una arquitectura muy ramificada (Figura I.6) (Ratcliffe *et al.*, 1999).

En resumen, *TFL1* regula la longitud de las distintas fases por las que pasa el SAM a lo largo del ciclo de vida de la planta, afectando al número e identidad de todos los órganos aéreos generados por él y, por lo tanto, actúa como un determinante clave de la arquitectura de la inflorescencia (Bradley *et al.*, 1997; Ratcliffe *et al.*, 1999; Conti y Bradley, 2007).

#### 4.1 La proteína TFL1

En *Arabidopsis*, *TFL1* pertenece a la familia *FT-TFL1* compuesta por seis genes. Los otros miembros de la familia son *FT*, *ATC* (*Arabidopsis thaliana* *Centrorradialis* *homologue*), *BFT* (*BROTHER OF FT AND TFL1*), *MFT* (*MOTHER OF FT AND TFL1*) y *TSF* (*TWIN SISTER OF FT AND TFL1*) (Figura I.7) (Kardailsky, 1999; Kobayashi, 1999; Mimida *et al.*, 2001). Todos ellos codifican proteínas de aproximadamente 25 KDa con homología a las proteínas de unión a fosfatidiletanolamina (PEBPs) (Bradley *et al.*, 1997; Hanzawa *et al.*, 2005). Las PEBPs son un grupo extenso de proteínas presentes en plantas, animales, levaduras y bacterias que participan regulando rutas de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación. El miembro de esta familia más estudiado es la proteína inhibidora de la Raf quinasa (RKIP) de mamíferos, por su papel en la supresión de la metástasis entre otros (Yeung, 1999; Hagan, 2006; Granovsky, 2008). Las PEBPs poseen una estructura globular compacta, con un bolsillo de unión a ligando, lo que les proporciona una amplia superficie para interactuar con otras proteínas (Granovsky, 2008).



**Figura I.7. La familia FT-TFL1 de *Arabidopsis*.** Árbol filogenético sin raíz construido a partir del alineamiento de secuencias de las proteínas de la familia FT-TFL1 de *Arabidopsis*.

Tal y como indica el nombre de la familia, FT y TFL1 son, con creces, sus dos miembros mejor conocidos. Pese a compartir un 59% de identidad a nivel de secuencia, las proteínas FT y TFL1 tienen funciones antagónicas durante el desarrollo de *Arabidopsis*. La pérdida de función de *TFL1* adelanta la floración y causa la determinación del meristemo inflorescente (Shannon

and Meeks-Wagner, 1991; Alvarez *et al.*, 1992; Schultz, 1993; Bradley *et al.*, 1997), mientras que su expresión constitutiva retrasa la floración (Ratcliffe *et al.*, 1998). Por el contrario, la pérdida de función de *FT* retrasa la floración (Koorneef *et al.*, 1991) y su expresión constitutiva adelanta la floración y provoca la determinación del meristemo inflorescente (Kardailsky, 1999; Kobayashi, 1999).

Las proteínas *FT* y *TFL1* muestran una estructura tridimensional muy similar a la de otras proteínas PEBPs de animales y plantas (Banfield y Brady, 2000), pero presentan algunas diferencias en la conformación del bolsillo de unión a ligando (Ahn *et al.*, 2006) que parecen esenciales para su función bioquímica. La sustitución en *TFL1* de una histidina, situada en la periferia del bolsillo de unión a ligando, por el residuo en la posición equivalente de *FT*, tirosina, y viceversa, es suficiente para intercambiar, al menos parcialmente, las funciones de *TFL1* y *FT* (Hanzawa *et al.*, 2005). Estos residuos interactúan con un dominio externo de la proteína que, probablemente, actúa como una superficie molecular de reconocimiento proteico (Ahn *et al.*, 2006). De este modo, tanto los residuos situados junto al bolsillo de unión de ligando como el dominio externo contribuyen a la especificidad funcional de *TFL1* y *FT*, posiblemente modificando su capacidad de formar complejos con otras proteínas.

Una de las proteínas capaces de interactuar tanto con *FT* como con *TFL1* es el factor transcripcional *FD* (Pnueli *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). El dímero *FT-FD* activa la expresión de genes de floración como *API* y *SOC1* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Searle *et al.*, 2006). Modelos que intentan explicar el antagonismo entre las funciones de *TFL1* y *LFY* proponen la competición entre *TFL1* y *FT* por un cofactor que necesario para su actividad (Hanzawa *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006). Ese cofactor podría ser *FD*.

Por otro lado, recientemente se ha visto que la proteína *TFL1* se localiza en la membrana plasmática, el tonoplasto y en algunos tipos de vesículas citosólicas y se ha propuesto que participa en el almacenamiento de proteínas en una clase de vacuolas de reserva que son específicas de plantas (Sohn *et al.*, 2007). Aunque aún está por relacionar cómo de esta manera controla la identidad del meristemo inflorescente. Esta observación contradice los resultados de Conti y Bradley (2007) donde se describe a la proteína *TFL1* como citoplasmática, lo que estaría más de acuerdo con una hipotética función de *TFL1* en regular cascadas de señalización celular.

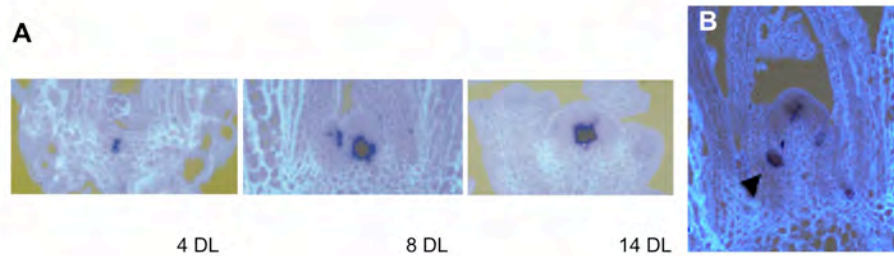
#### **4.2 Patrón de expresión de *TFL1***

Durante el desarrollo de la inflorescencia principal, el RNA mensajero (mRNA) de *TFL1* se expresa débilmente en el centro del meristemo vegetativo (Figura I.8). Tras la transición floral, aumenta notablemente su nivel de expresión (Figura I.8), manteniéndose ésta en el centro del meristemo inflorescente, sin grandes cambios, durante el resto del desarrollo (Figura I.8) (Bradley *et al.*, 1997; Conti and Bradley, 2007).

*TFL1* también se expresa en los meristemos axilares. Durante el desarrollo vegetativo del meristemo axilar, el mRNA de *TFL1* se detecta en todo el primordio (Figura I.8) y



posteriormente, al iniciar el desarrollo reproductivo, su expresión queda restringida al centro del meristemo axilar, donde muestra un patrón similar al del ápice principal (Bradley *et al.*, 1997; Conti y Bradley, 2007).



**Figura I.8. Patrón de expresión de *TFL1*.** **A)** Hibridaciones *in situ*, con *TFL1* como sonda, en secciones de ápices del tallo de la planta de *Arabidopsis silvestre*, recogidos a diferentes tiempos. Imagen modificada a partir de Bradley *et al.*, (1997). DL: días de cultivo en día largo. Teniendo en cuenta que en estas condiciones la transición floral ocurrió el séptimo día, 4 DL corresponde a un meristemo vegetativo, mientras que 8 DL y 14 DL corresponden a meristemos inflorescentes. **B)** Hibridación *in situ*, con *TFL1* como sonda, del ápice del tallo de una planta silvestre tras 12 días de cultivo en condiciones de día largo. Imagen modificada a partir de Conti y Bradley (2006). La flecha señala la expresión en un meristemo axilar joven. En todas las imágenes la expresión de *TFL1* aparece en azul oscuro.

Aunque el mRNA de *TFL1* tiene un patrón de expresión delimitado al centro del SAM, *TFL1* controla la identidad de todas las células del meristemo inflorescente gracias al movimiento de su proteína, que se localiza en todo el SAM, exceptuando los primordios florales (Conti and Bradley, 2007).

Por otro lado, *TFL1* también se expresa en tallo, asociado a floema, (Serrano-Mislata, 2010), en raíz (Sohn *et al.*, 2007) y, según algunas bases de datos de micromatrices de DNA como BAR (Bio-Array Resorce) y AVT (AtGenExpress Visualization Tool), en estructuras florales, principalmente carpelos y silicuas, a un nivel mucho más bajo, no detectable por hibridación *in situ*.

### 4.3 Regulación de *TFL1*

A pesar de la importancia de *TFL1* en el desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*, el conocimiento sobre los factores que regulan su expresión es todavía muy limitado, existiendo poca información sobre las rutas genéticas que controlan la expresión de *TFL1*.

#### 4.3.1 Regulación de *TFL1* por las rutas inductoras de la floración

La ruta del fotoperiodo parece activar a *TFL1*, como lo indica el aumento en los niveles de *TFL1* registrados en plantas que expresan *CO* de manera constitutiva (Simon, 1996; Serrano-Mislata, 2010). Además, existen indicios que sugieren que esta activación podría estar mediada por los factores de transcripción SOC1 y AGL24 (Serrano-Mislata, 2010) (Figura I.9 A).

#### 4.3.2 Regulación de *TFL1* por los genes de identidad del meristemo floral

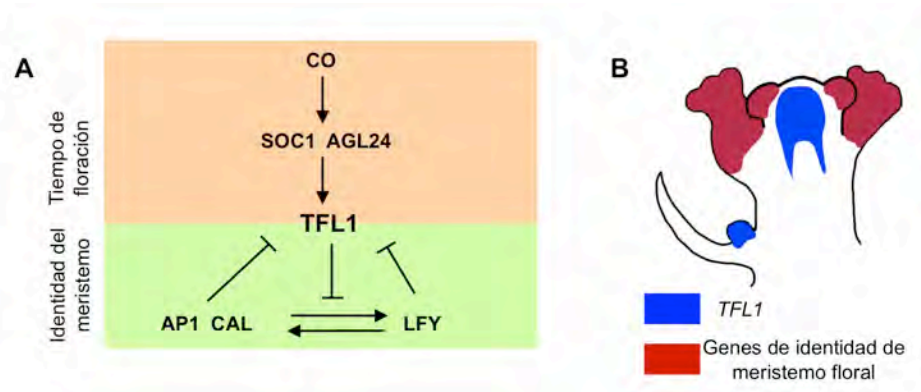
*TFL1* y los genes de identidad del meristemo floral, fundamentalmente *LFY* y *API* tienen patrones de expresión complementarios (Figura I.9 B). De esta forma, mientras *TFL1* se expresa en el centro del meristemo inflorescente (Bradley *et al.*, 1997), *LFY* y *API* lo hacen en los meristemos florales que se forman en su periferia (Mandel *et al.*, 1992; Weigel *et al.*, 1992). Como se ha descrito en el apartado 1.4.4, estos patrones de expresión complementarios se mantienen gracias a la represión mutua entre *TFL1* y los genes de identidad de meristemo floral (Figura I.9 A).

De acuerdo con este modelo, el cambio de identidad del meristemo inflorescente a floral que acaba con la formación de la flor terminal en el mutante *tfl1*, es consecuencia de la expansión por todo el ápice de *LFY* y *API* ante la ausencia de *TFL1* (Weigel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993; Gustafson-Brown, 1994). Por lo tanto, la presencia de *TFL1* en el meristemo inflorescente evita su determinación, al impedir que los genes de identidad del meristemo floral se expresen en él.

Del mismo modo, la expresión constitutiva de *LFY* o *API* suprime drásticamente la expresión de *TFL1* en el ápice (Liljegren *et al.*, 1999), dando lugar a plantas con un fenotipo similar al del mutante *tfl1* (Mandel y Yanofsky, 1995; Weigel y Nilsson, 1995). Además, la expresión de *TFL1* se activa en los primordios florales de las plantas 35S::*LFY*::VP16, donde *LFY* funciona como un activador transcripcional (Parcy *et al.*, 2002). Todos estos trabajos indican que *LFY* y *API* reprimen la expresión de *TFL1*. Finalmente, en el último año se ha podido confirmar que esta represión es directa, ya que tanto *API* como *LFY* se unen a elementos del promotor de *TFL1* (Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011).

Por el contrario, la proliferación de meristemos inflorescentes en el mutante *apl cal*, coincide con la expresión de *TFL1* en los meristemos laterales que se generan a partir del SAM (Ferrándiz *et al.*, 2000). En la misma dirección, la sobreexpresión de *TFL1* en las plantas 35S::*TFL1* genera plantas con gran cantidad de inflorescencias, donde las flores son sustituidas por ramas (Ratcliffe *et al.*, 1999) debido a que *TFL1* retrasa la inducción de *LFY* y *API*. Aún así, la sobreexpresión de *TFL1* no es capaz de bloquear totalmente la expresión de los genes de identidad del meristemo floral y, de hecho, las plantas 35S::*TFL1* acaban produciendo flores viables (Ratcliffe *et al.*, 1999).

Todos estos datos llevan a la conclusión de que la represión mutua entre *TFL1* y *LFY/ API* es clave para definir el correcto patrón de expresión de *TFL1*, que a su vez, es fundamental para la correcta especificación de los meristemos y la arquitectura de la inflorescencia. Todo esto indica que el patrón de expresión de *TFL1* es esencial para su función.



**Figura I.9. Control de la expresión de *TFL1*.** **A)** Esquema que resume los datos conocidos sobre la regulación de *TFL1* por las rutas genéticas implicadas en el desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*. *TFL1* actúa como un punto de conexión de dos procesos clave en el desarrollo de *Arabidopsis* al ser controlado por las rutas genéticas inductoras de la floración, concretamente por la ruta dependiente del fotoperiodo (a través de *SOC1* y *AGL24* que son activados por *CO*), así como por los genes de identidad del meristemo floral. →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa. **B)** Diagrama que representa una sección longitudinal de un ápice inflorescente de *Arabidopsis* donde se señalan los dominios aproximados de expresión de *TFL1* y de los genes de identidad de meristemo floral.

#### 4.3.3 El promotor de *TFL1*

El conocimiento de la estructura del promotor de un gen, con los elementos reguladores que contiene, es clave para el estudio de la regulación de su expresión. En paralelo a la realización de este trabajo, en nuestro laboratorio se ha llevado a cabo un estudio detallado del promotor de *TFL1* mediante un análisis de deleciones (Serrano-Mislata, 2010). Los resultados de este trabajo han demostrado que un fragmento genómico que incluye 0.3 Kb de la región 5' y 3.6 Kb de la región 3' de *TFL1* contiene todos los elementos reguladores necesarios para la correcta expresión de *TFL1*.

De acuerdo con ese estudio, los elementos reguladores presentes en la región 5' del promotor parecen controlar el nivel de expresión de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010), mientras que los elementos de la región 3' controlan diferentes aspectos del patrón espacio-temporal de la expresión de *TFL1* y su eliminación modifica diversos aspectos de la arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis* (Serrano-Mislata, 2010).

#### 4.4 Ortólogos de *TFL1* en otras especies

Como se ha descrito en el apartado 1.5.2.2, la relación antagonista entre *TFL1* y *LFY*, *API* y *CAL*, determina el momento y posición en que se va a generar una flor o una inflorescencia, definiendo la arquitectura de la planta en *Arabidopsis*. Este antagonismo parece estar conservado entre los ortólogos de *TFL1* y *LFY/API* en otras especies, por lo que las diferencias en el patrón de expresión de genes ortólogos de *TFL1* podrían explicar la variabilidad en el tipo de inflorescencia entre distintas especies de plantas (Benlloch *et al.*, 2007).

En *Antirrhinum*, al igual que en *Arabidopsis*, la inflorescencia es un racimo simple (Figura I.1 B). *CENTRORADIALIS (CEN)*, el homólogo de *TFL1* en *Antirrhinum*, no se expresa durante la fase vegetativa del desarrollo. *CEN* se expresa tras la transición floral en el centro del meristemo inflorescente, impidiendo en esta región la expresión de *FLORICAULA (FLO)*, el ortólogo de *LFY* en *Antirrhinum* (Coen *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 1996). De acuerdo con este patrón de expresión, la mutación *cen* no afecta a la longitud de la fase vegetativa y, por tanto, al tiempo de floración pero sí modifica el tipo de inflorescencia, que pasa de ser indeterminada a determinada (Bradley *et al.*, 1996; Cremer *et al.*, 2001). Esta diferencia en los patrones de expresión de *CEN* y *TFL1* llevó inicialmente a proponer que es la expresión de *TFL1* en el SAM vegetativo lo que controla el tiempo de floración.

En guisante, que también posee una inflorescencia indeterminada (Figura I.1 C), las dos funciones principales de *TFL1* se encuentran controladas por dos homólogos de *TFL1* distintos (Foucher, 2003). *DETERMINATE (DET)*, al igual que *CEN*, sólo se expresa en el ápice tras la transición floral y su mutación provoca la determinación de la inflorescencia, sin afectar al tiempo de floración. Por el contrario, *LATE FLOWERING (LF)* se expresa desde la fase vegetativa y su mutación provoca un adelanto de la floración.

En la inflorescencia del tabaco, que es determinada del tipo cimo (Figura I.1 E), los genes homólogos de *TFL1*, *CET2* y *CET4*, se expresan en los meristemos axilares vegetativos pero no en el del tallo principal (Amaya *et al.*, 1999), donde se expresa *NFL (Nicotiana FLO/ LFY)*, el ortólogo de *LFY* (Kelly *et al.*, 1995). La expresión de *NFL* en el SAM es lo que se ha sugerido que causa la determinación de la inflorescencia principal (Kelly *et al.*, 1995; Amaya *et al.*, 1999; Ahearn *et al.*, 2001). De hecho, conforme los meristemos axilares se desarrollan como inflorescencias cimosas, la expresión de *CET2* y *CET4* disminuye de nivel y se induce la de *NFL* (Amaya *et al.*, 1999). Así, *CET2* y *CET4* parecen mantener el carácter vegetativo de los meristemos axilares, retrasando su transición a la fase reproductiva.

De forma similar al tabaco, para el desarrollo del simpodio en tomate, un tipo particular de inflorescencia cimosa (Figura I.1 F), *SELF-PRUNING (SP)*, el homólogo de *TFL1* (Pnueli *et al.*, 1998), se expresa solamente en la fase vegetativa de los meristemos axilares y simpodiales, desapareciendo cuando éstos inician el desarrollo de la inflorescencia (Thouet *et al.*, 2008).

Por lo tanto, atendiendo a las variaciones en los patrones de expresión de los ortólogos de *TFL1* y los genes de identidad del meristemo floral se podría explicar el desarrollo de los distintos tipos de inflorescencias. Así, en el caso de las inflorescencias indeterminadas, como *Arabidopsis*, *Antirrhinum* y guisante, la expresión de los homólogos de *TFL1* en el centro del meristemo apical durante el desarrollo reproductivo sería lo que impide la expresión en éste meristemo de los genes de identidad de meristemo floral, quedando la expresión de éstos restringida a los meristemos florales que se forman en la periferia. Por el contrario, en las inflorescencias determinadas, como son el cimo del tabaco o el simpodio del tomate, la expresión de los correspondientes homólogos de *TFL1* se limita a la fase vegetativa del desarrollo de los meristemos axilares o simpodiales, desapareciendo cuando estos meristemos

inician el desarrollo reproductivo. En ese momento, los genes de identidad de meristemo floral comienzan a expresarse en el ápice y esto sería lo que provoca la determinación del mismo.

## **5. Objetivos de este trabajo**

Como se ha mostrado en esta introducción, la expresión de *TFL1* es esencial para su función en el desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*. Sin embargo, existen pocos datos en la literatura sobre cómo se establece y regula la expresión de *TFL1*. El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido la identificación de nuevos genes implicados en la regulación de la expresión de *TFL1*. Con este fin, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar genes que regulan a *TFL1* mediante el escrutinio de la mutagénesis de una línea delatora que reproduce el patrón de expresión de *TFL1*, seleccionando mutaciones que modifiquen la expresión de *TFL1*.
2. Identificar posibles elementos reguladores del promotor de *TFL1* mediante el análisis comparativo de los promotores de genes ortólogos de *TFL1* en diferentes especies de brasicáceas.
3. Identificar reguladores directos de *TFL1*, buscando factores de transcripción capaces de unirse a elementos reguladores de su promotor, mediante la realización de escrutinios de híbrido simple.



**RESULTADOS**





**CAPÍTULO 1**



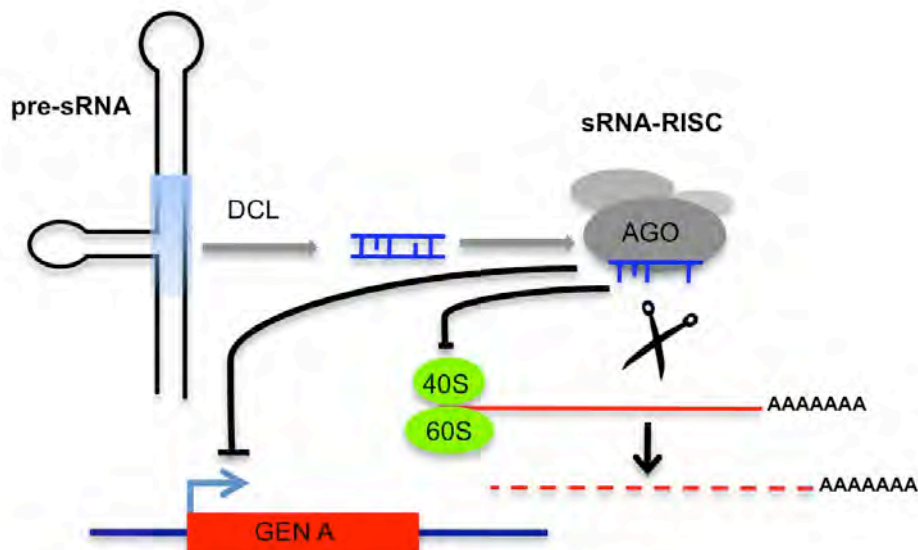
## **Búsqueda de genes que regulan a *TFL1* mediante la mutagénesis de una línea delatora**

La función de *TFL1* es esencial para el correcto desarrollo de la inflorescencia de *Arabidopsis*, sin embargo, poco se conoce sobre cómo se regula su expresión. La unión de diferentes factores de transcripción a los elementos reguladores localizados en los promotores de los genes es una forma de regular en qué momento y lugar debe expresarse un determinado gen. Adicionalmente, la expresión de un gen puede regularse por medio moléculas de RNA de pequeño tamaño (sRNA) (Llave *et al.*, 2002; Plasterk, 2002; Tang *et al.*, 2003).

Los sRNAs son moléculas de RNA de cadena simple de entre 20-25 nucleótidos que se originan a partir del procesamiento por las ribonucleasas DICER-LIKE (DCL) de moléculas de RNA de mayor tamaño y de doble cadena (dsRNA) (Figura C1.1). Aunque existen varios tipos de sRNAs, los más habituales en plantas son los pequeños RNAs de interferencia (siRNAs) y los micro RNAs (miRNAs). Pese a no diferir demasiado en sus tamaños, la diferencia fundamental se encuentra en el origen del dsRNA precursor y en el procesamiento de éste. Así pues, en los miRNAs, la molécula dsRNA procede de la transcripción por parte de la RNA POLIMERASA II de genes que no codifican proteína, solamente a este precursor y que reciben el nombre de genes MIR. Mientras que, en los siRNAs, el origen del precursor dsRNA es más heterogéneo, pudiendo provenir directamente de la replicación de un virus y/o la transcripción de secuencias invertidas repetidas en tándem, o indirectamente, de la actuación de RNA polimerasas dependientes de precursores de RNA de simple cadena. Además, el procesamiento de la molécula precursora lo realiza, generalmente, DCL1 en el caso de los miRNAs y DCL4 en el caso del siRNA (Vaucheret, 2008; Mallory and Bouché, 2008; Voinnet, 2009).

Los sRNAs, dirigen a los complejos RISC (complejo de silenciamiento génico mediado por RNA) en busca de moléculas de ácido nucleico complementarias a su secuencia. Una vez encontradas, el complejo RISC inducirá el silenciamiento del gen diana por medio de diferentes mecanismos que aparecen resumidos en la Figura C1.1. El núcleo del complejo RISC está formado por un miembro de la familia de proteínas ARGONAUTE (AGO). Las proteínas AGO constan de una región carboxilo terminal conservada, con el dominio PAZ de unión al sRNA y el dominio PIWI, que posee actividad endonucleasa similar a la presentada por la RNasa H. La familia AGO de *Arabidopsis* comprende 10 miembros (AGO1-10), de entre los cuales destaca la proteína AGO1. AGO1 fue el primer miembro de esta familia descubierto en *Arabidopsis* y es la principal proteína AGO en la ruta del silenciamiento génico inducido por miRNAs, teniendo un papel clave en el desarrollo de la planta (Vaucheret *et al.*, 2004; Vaucheret, 2008).

A continuación, se describe el escrutinio de una mutagénesis realizada sobre una línea delatora del gen *TFL1* que permitió identificar a AGO1 como un nuevo regulador de la arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis*, a través del control de la expresión de *TFL1*.

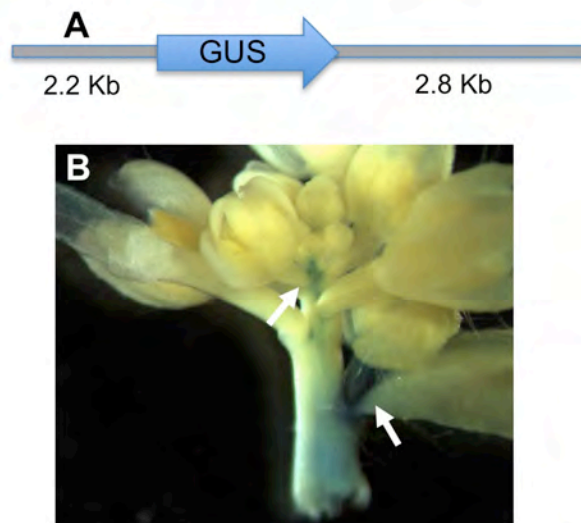


**Figura C1.1. Resumen del silenciamiento génico inducido por pequeños RNAs.** Los pequeños RNAs (sRNA) provienen de moléculas de RNA de mayor tamaño y doble cadena (pre-sRNA) que son procesadas por proteínas tipo Dicer (DCL) en fragmentos doble cadena de 20-40 nucleótidos. Posteriormente, una de las dos cadenas (sRNA) será cargada por un complejo RISC que contiene una proteína ARGONAUTE (AGO), confiriendo al complejo la capacidad de reconocer a ácidos nucleicos de secuencia homóloga. Una vez detectado el ácido nucleico diana, el complejo RISC producirá el silenciamiento de dicha molécula por medio de uno de estos tres mecanismos (1) corte de la molécula de RNA seguido de su degradación, (2) represión de su traducción o (3) metilación del DNA y/o histonas (Voinnet, 2009).

## 1. Mutagénesis de una línea delatora *TFL1*pro::*GUS*

### 1.1 Descripción de la línea delatora empleada en la mutagénesis

Para identificar genes candidatos a regular la expresión de *TFL1* se llevó a cabo una mutagénesis, con metanosulfonato de etilo (EMS), de la línea transgénica *LerPBG1*. Las plantas de esta línea, del ecotipo *Ler*, contienen una construcción delatora *TFL1*pro::*GUS* en la que el gen *uidA* de *Escherichia coli*, que codifica la enzima  $\beta$ -GLUCORONIDASA (*GUS*), está flanqueado por 2.2 Kb y 2.8 Kb de las regiones intergénicas situadas en 5' y 3' del gen *TFL1* de *Arabidopsis* (Serrano-Mislata, 2010) (Figura C1.2 A). En estas plantas, la expresión de *TFL1*pro::*GUS* se observa en en el ápice de las inflorescencias, reproduciendo parcialmente el patrón de expresión de *TFL1* y no mostrando expresión ectópica (Figura C1.2 B).



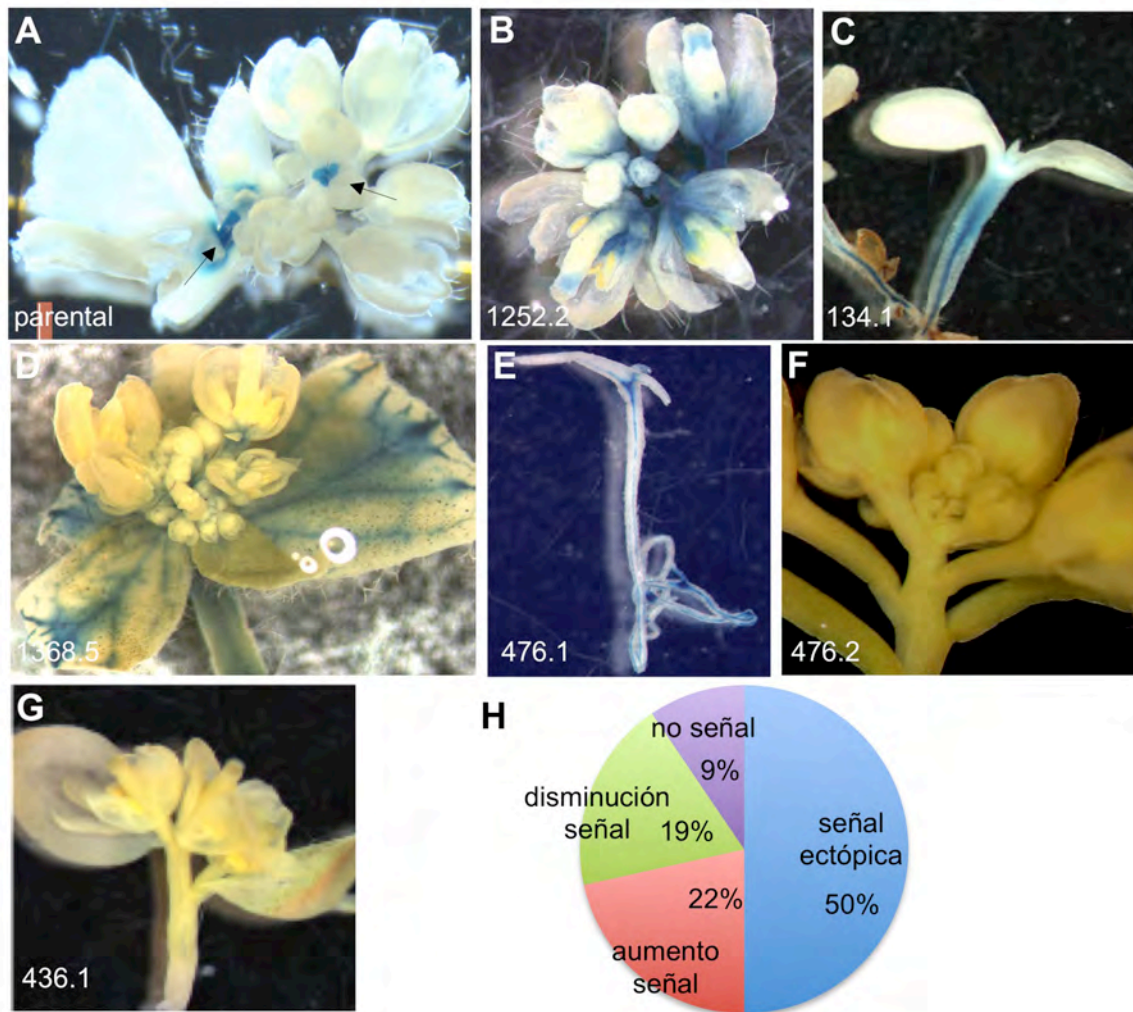
**Figura C1.2. Línea delatora TFL1pro::GUS a partir de la cual se realizó la mutagénesis. A)** La línea parental de esta mutagénesis, denominada LerPBG1, contiene una construcción TFL1pro::GUS en la que la expresión del gen *GUS* se encuentra dirigida por 2.2 Kb y 2.8 Kb de las regiones que flanquean a *TFL1* en 5' y 3', respectivamente. **B)** Imagen del ápice principal en el momento del *bolting* de una planta de la línea LerPBG1 cultivada en condiciones de día largo. Se observa la expresión TFL1pro::GUS en los ápices de las inflorescencias principal y secundaria (señaladas por flechas).

## 1.2 Escrutinio de la mutagénesis de la línea reportera TFL1pro::GUS

Con el fin de identificar posibles mutantes en genes candidatos a regular a *TFL1*, el escrutinio de la mutagénesis se diseñó enfocado en la búsqueda de plantas con una expresión de TFL1pro::GUS alterada. Además, como *TFL1* es un gen clave en el control de la arquitectura de la planta, para reducir el número de falsos positivos, se decidió seleccionar solamente a aquellos individuos que mostraran, a la vez, una expresión de TFL1pro::GUS alterada y defectos en la arquitectura de la parte aérea de la planta.

El escrutinio de la mutagénesis se realizó sobre 1850 familias M2 descendientes de plantas M1 que provenían de semillas de la línea parental LerPBG1 tratadas con EMS. De cada familia M2, cada una de ellas proveniente de una única planta M1, se sembraron, en condiciones de día largo, 24 semillas (en total, alrededor de 44400 semillas) y para cada planta M2 se analizó su patrón de expresión de TFL1pro::GUS y su arquitectura. Puesto que el nivel de expresión de *TFL1* en el SAM alcanza su máximo alrededor de la transición floral y permanece sin grandes cambios durante el resto de la vida de la planta (Bradley *et al.*, 1997; Serrano-Mislata, 2010), decidimos analizar el patrón de TFL1pro::GUS en el momento en el que las plantas hicieron el *bolting*. Aquellas plantas que por presentar problemas durante el desarrollo vegetativo, no habían hecho el *bolting* una semana después que el resto, se arrancaron para determinar el patrón TFL1pro::GUS en la planta entera. Un total de 158 plantas M2 resultaron tener alterados tanto en el patrón TFL1pro::GUS como la arquitectura, siendo seleccionadas como candidatas portadoras de mutaciones en genes que podrían regular a *TFL1*. Estos posibles mutantes se clasificaron en función del patrón de expresión de TFL1pro::GUS y la arquitectura (Figuras C1.3

y C1.4) como se describe a continuación.



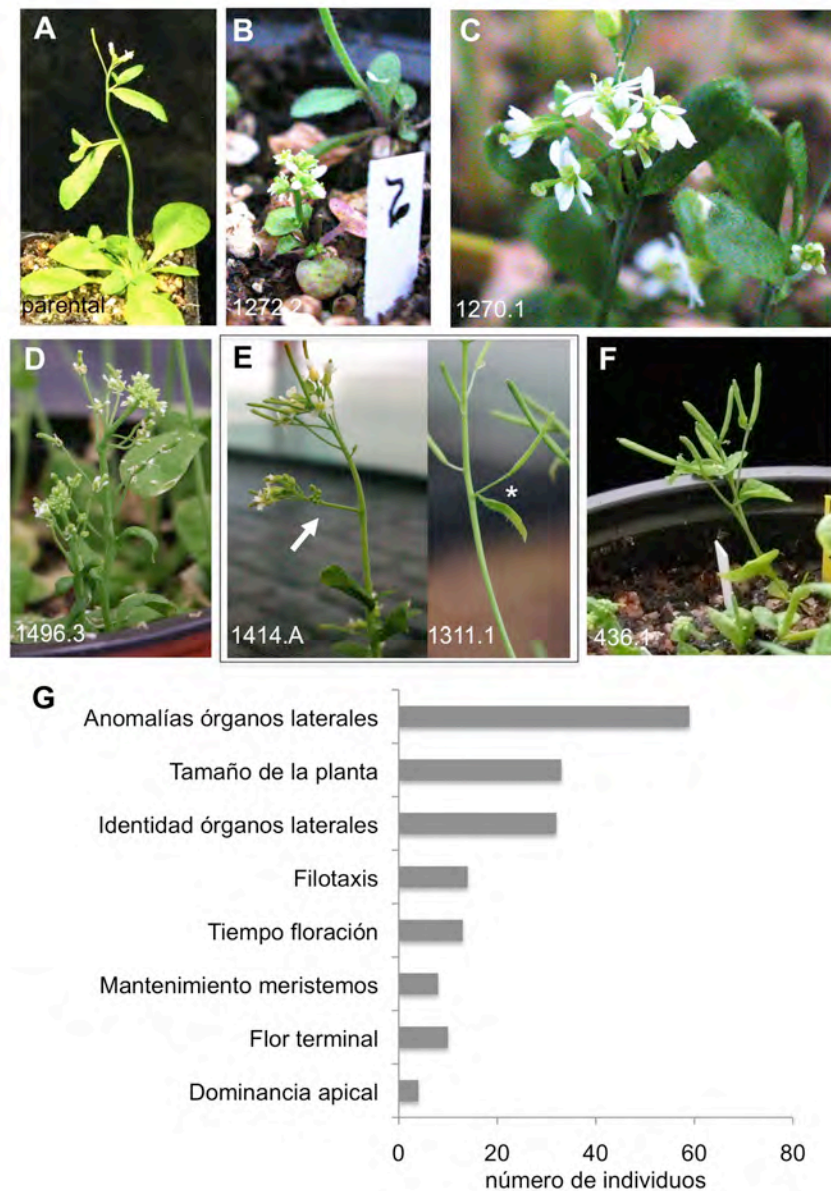
**Figura C1.3. Alteraciones del patrón de expresión de TFL1pro::GUS observadas en el escrutinio de la mutagénesis.** Ápices de inflorescencias en *bolting* sometidos a la tinción de GUS número 1 durante toda la noche. **A)** Planta de la línea parental de la mutagénesis (*LerPBG1*). La expresión solamente se observa en los ápices inflorescentes. **B-G)** Ejemplos de las categorías en las que se clasificaron las distintas alteraciones según el patrón de TFL1pro::GUS observado. El número del individuo aparece anotado. **B)** Aumento de la expresión en el centro del ápice y señal ectópica en flores (receptáculo, estambres y carpelo). **C)** Señal ectópica en el hipocotilo. **D)** Señal ectópica en la nerviación de las hojas. **E)** Señal ectópica en raíz. **F)** Señal muy débil en el centro del ápice. **G)** Ausencia de señal. **H)** Gráfico resumen con las frecuencias de aparición de estas categorías en el escrutinio.

Respecto al patrón de expresión de TFL1pro::GUS (Figura C1.3), los mutantes se clasificaron según presentasen un patrón de expresión ectópico, un aumento o disminución de la expresión, o bien, la ausencia de ésta, comparado siempre con la línea parental (Figura C1.3 A-G). La expresión ectópica supuso la mitad de los casos observados, mientras que la alteración menos representada fue la ausencia de expresión, sólo en 15 de 158 individuos que, además, en su mayoría fueron inviables. El aumento o disminución de la expresión (sin cambiar la localización de ésta respecto a la línea parental) se dio en aproximadamente un tercio del total (Figura C1.3 H). Por lo tanto, la alteración más representada fue la expresión ectópica de

TFL1pro::GUS en órganos tales como hojas, raíz y sobre todo flores. Prácticamente, tres cuartas partes de los individuos en los que se observó la señal TFL1pro::GUS ectópica, la presentaron en flores, ya fuera en el receptáculo floral, en cualquiera de los órganos que componen la flor o, posteriormente, en el fruto.

En cuanto a las alteraciones en la arquitectura de la planta, en un número considerable de individuos (42 de 158) sólo se pudo observar durante la fase vegetativa porque las plantas no llegaron a hacer el *bolting*, motivo por el cual quedaron descartadas para continuar trabajando con ellas. Las anomalías se clasificaron en diferentes tipos (Figura C1.4), según afectaran al tamaño de la planta, (en todos los casos, plantas más pequeñas); morfología o tamaño de los órganos aéreos (hojas, inflorescencias secundarias, ápice, flores o frutos); identidad de los órganos laterales (por ejemplo, una inflorescencia secundaria sin una hoja caulinar en su base puede ser interpretada como la sustitución de una flor por una inflorescencia (Ratcliffe *et al.*, 1998)); filotaxis; tiempo de floración; mantenimiento de los meristemos (SAM o meristemo floral); dominancia apical (ganancia o pérdida) y determinación de alguna de las inflorescencias en una flor terminal. Una misma planta podía mostrar varias de estas alteraciones a la vez.

Al final del escrutinio de la población M2, un total de 116 individuos presentaron defectos tanto en el patrón de expresión de TFL1pro::GUS como en la arquitectura de la planta adulta. El siguiente paso consistió en estudiar si en la descendencia M3 de cada una de estas plantas aparecían de nuevo los fenotipos de patrón de expresión TFL1pro::GUS y de arquitectura previamente identificados en la familia M2. Por lo tanto, cada individuo M2 seleccionado pasó a ser considerado como una línea M2. Al considerar que todas aquellas líneas M2 con igual fenotipo que procedían de la misma línea parental M1 portaban, posiblemente, la misma mutación, se redujo a 78 el número de posibles líneas mutantes. Entre éstas, seleccionamos 40 en base al interés de los fenotipos de expresión de TFL1pro::GUS y de la arquitectura (Tabla C1.1). Tras estudiar la heredabilidad de los fenotipos observados en M2 para estas cuarenta posibles líneas mutantes, sólo 9 de ellas volvieron a segregar individuos M3 que repetían tanto las alteraciones en el patrón de TFL1pro::GUS como en la arquitectura de la inflorescencia. En principio, el bajo número final de líneas seleccionadas pudo deberse a varias causas entre las que destacamos el que la población estaba altamente mutagenizada, lo que dificultó una segregación limpia de los fenotipos y la baja penetrancia de muchos de los fenotipos identificados, lo que complicó su seguimiento en sucesivas generaciones. Finalmente, de estas 9 líneas preseleccionadas, las únicas dos que presentaban un fenotipo de flor terminal (líneas 436.1 y 1396.1) resultaron ser alelos de *tfl1*, como demostraron las pruebas de alelismo realizadas. Así pues, el número de posibles líneas mutantes con las que seguir trabajando se redujo a siete. A continuación se resumen los aspectos característicos del fenotipo de estas líneas mutantes (Figuras C1.5 y C1.6) así como una breve descripción del trabajo realizado con ellas.



**Figura C1.4. Alteraciones de la arquitectura de la parte aérea de la planta observadas en el escrutinio de la mutagénesis de la línea delatora TFL1pro::GUS. A)** Planta de la línea parental (LerPBG1). **B-F)** Ejemplos de las categorías en las se clasificaron las distintas alteraciones de la arquitectura observadas. El número del individuo aparece anotado. **B)** Planta con un tamaño reducido respecto al control. **C)** Alteraciones en órganos laterales, en particular flores con más pétalos, menos estambres y carpelos más delgados que el control. **D)** Problemas en la filotaxis. Planta con una distribución alterada de los órganos laterales. **E)** Problemas en la identidad de órganos laterales. A la izquierda, planta con una inflorescencia secundaria no sustentada por hoja caulinar (flecha) y a la derecha, una planta con flor axilar (asterisco). **F)** Inflorescencia principal acabada en una flor terminal. **G)** Gráfico resumen con las frecuencias de aparición de estas categorías en el escrutinio.



**Tabla C1.1 Individuos M2 seleccionados en el escrutinio de la mutagénesis**

<b>Señal TFL1pro::GUS ectópica <sup>a</sup></b>		
<b>Individuo</b>	<b>Órgano</b>	<b>Defectos en la arquitectura <sup>b</sup></b>
13.1	Flor	Morfología hoja
<b>63.1</b>	Flor	Tamaño de la planta, morfología hoja y flor
<b>64.1</b>	Flor	Identidad órgano lateral, filotaxis
76.1	Flor	Morfología ápice
101.1	Hoja	Tamaño de la planta
235.1	Flor	Flor terminal
551.1	Flor	Mantenimiento del meristemo inflorescente
657.1	Pedicelo	Tamaño de la planta
659.1	Flor	Morfología del ápice
1204.1	Toda la planta	Tamaño de la planta, floración retrasada
1248.1	Flor	Tamaño de la planta, floración adelantada
1286.1	Flor	Tamaño de la planta, filotaxis
<b>1309.1</b>	Flor	Identidad órganos laterales
1368.1	Hojas/tallo	Identidad órgano lateral, filotaxis, morfología flor
<b>1372.1</b>	Flor	Filotaxis
1412.1	Flor/fruto	Flor terminal, identidad órgano lateral
1491.1	Flor	Tamaño de la planta
<b>1496.1</b>	Flor	Tamaño de la planta, morfología hoja
1499.1	Flor	Morfología flor
1538.1	Flor	Tamaño de la planta, filotaxis

---

**Aumento de la señal TFL1pro::GUS<sup>a</sup>**

<b>Individuo</b>	<b>Defectos en la arquitectura<sup>b</sup></b>
31.1	Tamaño de la planta, identidad órgano lateral
<b>77.1</b>	Identidad órgano lateral
522.1	Tamaño de la planta
<b>1266.1</b>	Filotaxis, morfología flor
1347.1	Morfología hojas
1359.1	Tamaño de la planta
1373.1	Filotaxis
1426.1	Tamaño de la planta, floración retrasada
1503.1	Flor terminal, identidad órgano lateral

---

**Disminución de la señal TFL1pro::GUS<sup>a</sup>**

<b>Individuo</b>	<b>Defectos en la arquitectura<sup>b</sup></b>
191.1	Tamaño de la planta, morfología ápice
342.1	Tamaño de la planta
345.1	Tamaño de la planta
357.1	Tamaño de la planta, morfología ápice
1270.1	Flor terminal, morfología flor, mantenimiento meristemo floral
1285.1	Mantenimiento meristemo inflorescente
1384.1	Filotaxis
<b>1409.1</b>	Filotaxis, flor terminal, morfología fruto

---

**Ausencia de señal TFL1pro::GUS<sup>a</sup>**

<b>Individuo</b>	<b>Defectos en la arquitectura<sup>b</sup></b>
247.1	Tamaño de la planta
<b>436.1</b>	<b>Flor terminal, floración adelantada</b>
466.1	Morfología fruto

---

### 1.2.1 Descripción de las líneas mutantes identificadas

Línea 63.1: Presentó expresión de TFL1pro::GUS fuerte en el tallo y ectópica en el carpelo de las flores (Figura C1.5 A), así como un fenotipo morfológico fácilmente reconocible (Figura C1.5 B). Planta de reducido tamaño y una arquitectura severamente alterada con defectos en las hojas y flores (Figura C1.5 B). Por su fenotipo se le dio el nombre de *moss* (musgo).

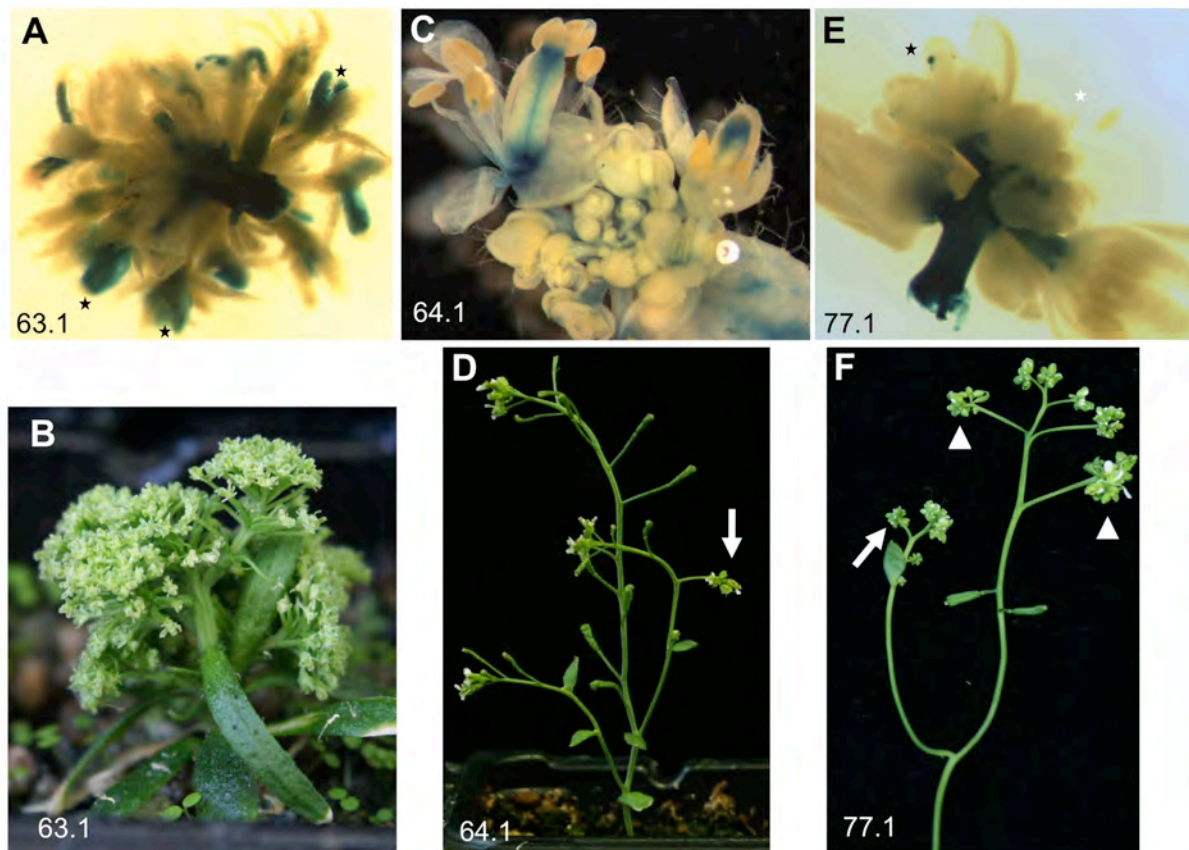
Línea 64.1: En la familia M2 número 64 aparecieron cuatro individuos con alteraciones similares (numerados del 64.1 al 64.4). En los cuatro casos observamos expresión de TFL1pro::GUS ectópica en flor, concretamente en pedicelos, receptáculo floral y en el carpelo (Figura C1.5 C). La arquitectura de la inflorescencia también resultó ser similar en todos ellos, presentando pocas flores con escaso polen y que dieron lugar a frutos pequeños y ensanchados en la parte apical que, generalmente, contenían pocas o incluso ninguna semilla. También observamos inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares y alteraciones en la filotaxis (Figura C1.5 D). La baja tasa de germinación y la reducida expresividad del fenotipo dificultaron el trabajo con esta línea.

Línea 77.1: La expresión de TFL1pro::GUS fue fuerte en ápices de inflorescencias en *bolting* y ectópica en los carpelos de algunas flores (Figura C1.5 E). La arquitectura de la planta adulta presentó una filotaxis alterada, posibles problemas en la identidad de órganos laterales, como la existencia de inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares o de flores ramificadas (Figura C1.5 F) similares a las del mutante *ap1* (Irish y Sussex, 1990). La baja penetrancia de la posible mutación dificultó su seguimiento.

Línea 1266.1: Plantas con un nivel de expresión de TFL1pro::GUS muy fuerte en las inflorescencias jóvenes (Figura C1.6 A), extendido por todo el tallo e incluso pedicelos, y que seguía siendo evidente en inflorescencias de edad muy avanzada, en las que en el parental la señal se apagaba (dato no mostrado). En lo referente a la arquitectura, presentaban problemas de filotaxis, con variabilidad en la longitud de los entrenudos que separan las flores (Figura C1.6 B), aparecían inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares y sus flores, con poco polen, eran prácticamente estériles y contenían un número reducido de semillas que presentaron una baja tasa de germinación.

---

<sup>a</sup> Los individuos seleccionados en el escrutinio se han ordenado según las alteraciones en el patrón de expresión TFL1pro::GUS: ectópico (indicando dónde), aumento, disminución o ausencia de señal. <sup>b</sup> Las anomalías en la arquitectura de la parte aérea de la planta se agruparon en las siguientes categorías: tamaño de la planta (plantas de tamaño reducido), tiempo de floración, anomalías en órganos laterales (hojas, inflorescencias laterales, flores o frutos), morfología del ápice, mantenimiento del meristemo (inflorescente o floral), identidad de los órganos laterales (sustitución de un tipo de órgano lateral por otro), filotaxis, dominancia apical y existencia de flores terminales. Desarrollo temprano: plantas en las que la arquitectura en la fase adulta no pudo analizarse debido a la falta de viabilidad de la planta más allá de la fase de desarrollo vegetativo. En negrita aparecen aquellos individuos en los que en su descendencia se observó de nuevo el fenotipo identificado en M2.



**Figura C1.5. Líneas mutantes en la regulación de *TFL1* (Parte I).** Patrón de expresión de *TFL1pro::GUS* de ápices en *bolting* y arquitectura de las plantas adultas de las líneas 63.1, 64.1, y 77.1. Las estrellas señalan carpelos con señal *TFL1pro::GUS*; las flechas, inflorescencias laterales no sustentadas por hoja caulinar y las puntas de flecha, flores ramificadas (aparición de flores en las axilas de los sépalos). **A-B)** Línea 63.1. **B-C)** Línea 64.1. **E-F)** Línea 77.1.

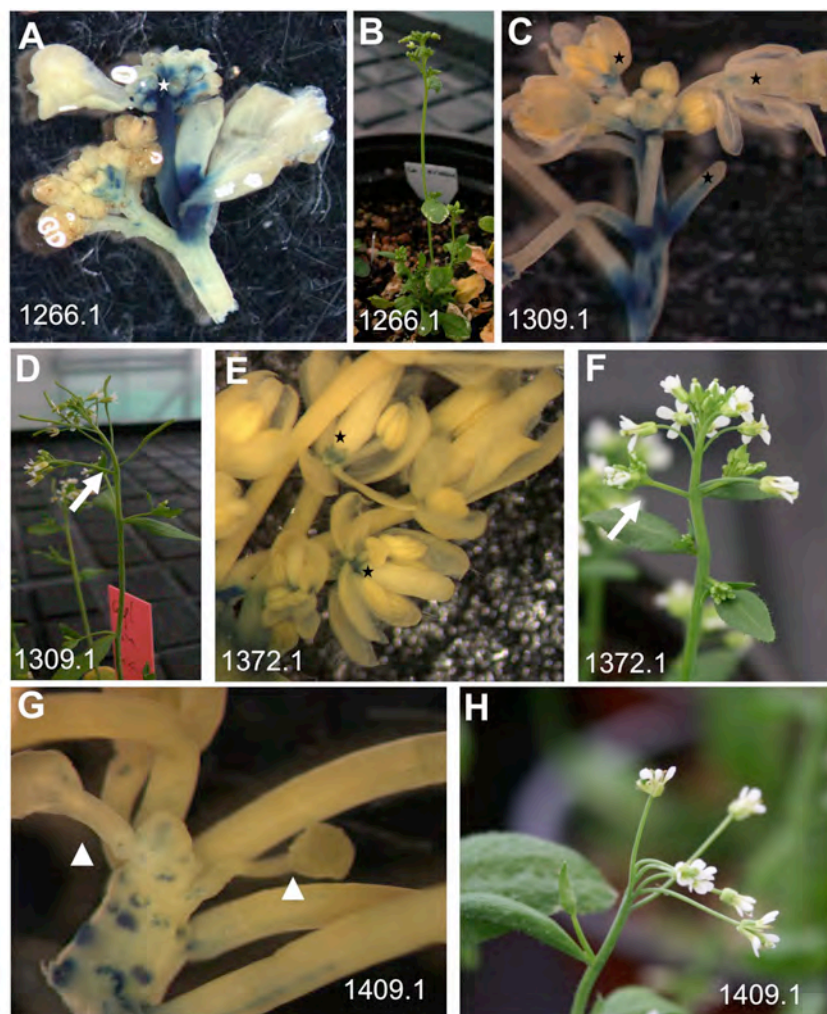
Línea 1309.1: En la familia M2 1309 aparecieron nueve individuos caracterizados por una expresión del gen reportero de *TFL1pro::GUS* fuerte y ectópica en flores (especialmente en pedicelos y receptáculo de la flor) y la presencia de inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares (Figura C1.6 C y D). En posteriores generaciones, la mutación mostró baja expresividad, reduciéndose la señal *TFL1pro::GUS* y el número de inflorescencias secundarias no sustentadas por hojas caulinares; esto dificultó el correcto seguimiento de la mutación.

Línea 1372.1: Los aspectos característicos del fenotipo de esta línea eran un patrón de expresión de *TFL1pro::GUS* ectópico en el receptáculo floral (Figura C1.6 E), así como la presencia de problemas relacionados con la filotaxis (flores y ramas formándose en el mismo punto) y la identidad de los órganos laterales (inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares) (Figura C1.6 F). Los frutos eran de reducido tamaño y delgados pero fértiles.

Línea 1409.1: El individuo M2 fundador de esta línea destacó por la morfología de su ápice en *bolting* (Figura C1.6 G) que parecía carecer de SAM y en su lugar presentar una estructura determinada con la presencia de órganos filamentosos tipo estambres. La señal de *TFL1pro::GUS* en el centro del ápice era más baja que en el control y presentaba un patrón

punteado único entre los individuos analizados en esta mutagénesis. Además, otros problemas fueron la esterilidad, presencia de flores con cinco pétalos (posibles problemas en el meristemo floral), frutos ensanchados en su parte más apical y una filotaxis alterada con una importante reducción en la longitud de los entrenudos florales (Figura C1.6 H). Problemas derivados de la esterilidad de esta línea dificultaron su caracterización.

A continuación, en el siguiente apartado, procederemos a describir el trabajo realizado con uno de los mutantes preseleccionados en este escrutinio, concretamente el mutante *moss*, que presenta una mutación en un gen candidato a regular a *TFL1*.



**Figura C1.6. Líneas mutantes en la regulación de *TFL1* (Parte II).** Patrón de expresión de *TFL1*pro::GUS de ápices en *bolting* y arquitectura de las plantas adultas de las líneas 1266.1, 1309.1, 1372.1 y 1409.1. Las estrellas señalan flores con señal *TFL1*pro::GUS; las flechas, inflorescencias laterales no sustentadas por hoja caulinar y las puntas de flecha, las estructuras tipo estambre que aparecieron en el ápice de la línea 1409.1. **A-B)** Línea 1266.1. **B-C)** Línea 1309.1. **E-F)** Línea 1372.1. **G-H)** Línea 1409.1.

## 2. Caracterización del mutante *moss*

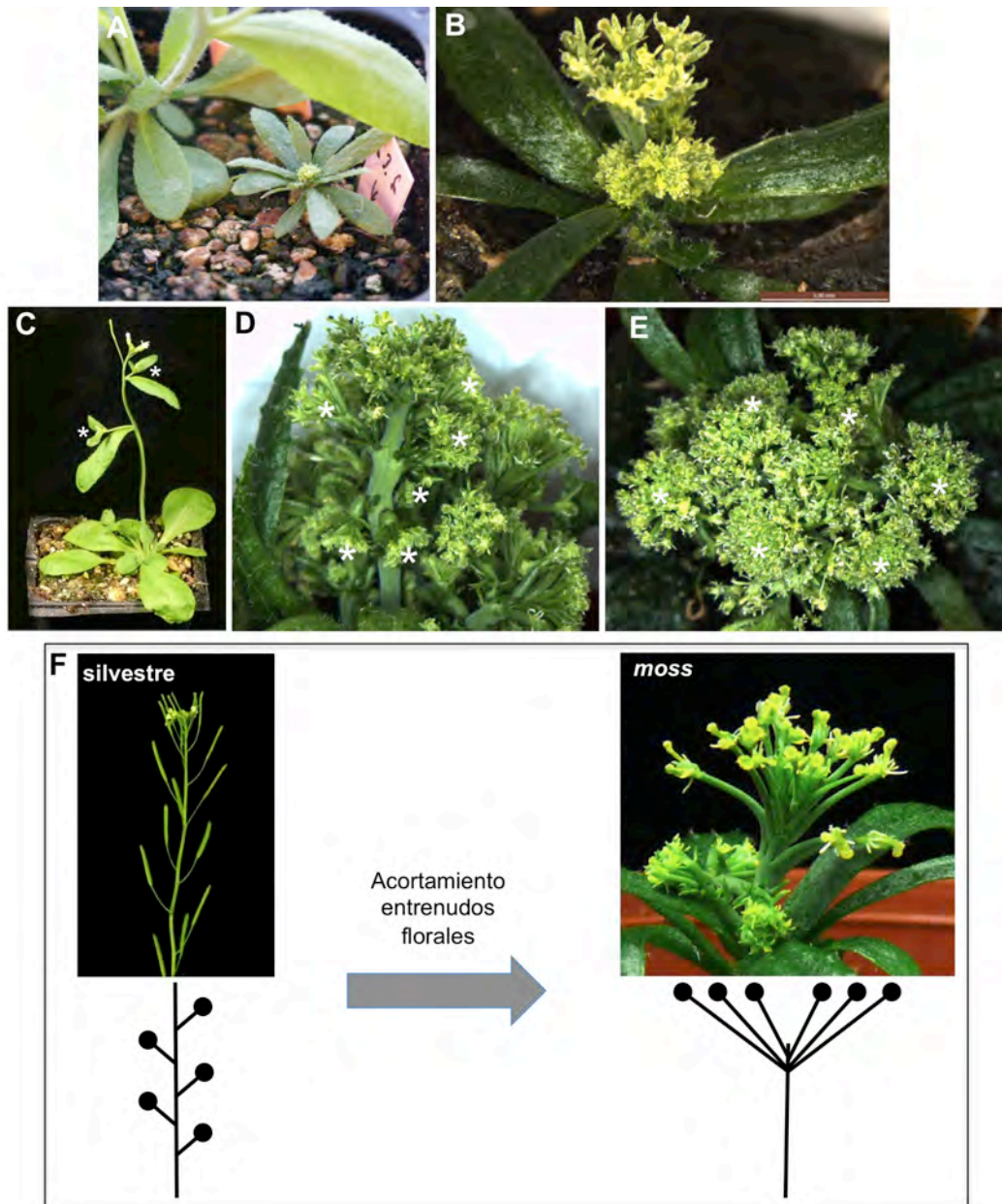
El mutante *moss* (línea 63.1) destacó en el escrutinio realizado sobre plantas M2 por las alteraciones en su arquitectura así como por presentar una expresión de TFL1pro::GUS fuerte y ectópica. Dada su esterilidad, para poder estudiar la heredabilidad de ambos fenotipos se procedió a la identificación de plantas M2 procedentes de la misma línea parental M1 en cuya descendencia segregaran individuos con el mismo fenotipo. Todos los individuos que en M3 y sucesivas generaciones presentaron la arquitectura típica del mutante *moss* también mostraron expresión alta y ectópica del gen delator, por lo tanto, ambas alteraciones se heredaban ligadas.

Antes de analizar el fenotipo mutante con más detalle se procedió a retrocruzar cuatro veces una línea que segregaba la mutación *moss* con la línea parental. De esta forma se pretendió limpiar el fondo genético del mutante *moss* de otras posibles mutaciones resultantes de la mutagénesis con EMS.

### 2.1. El mutante *moss* presentó un fenotipo pleiotrópico con defectos en la arquitectura

El análisis fenotípico del mutante *moss* se realizó con plantas cultivadas en condiciones de día largo.

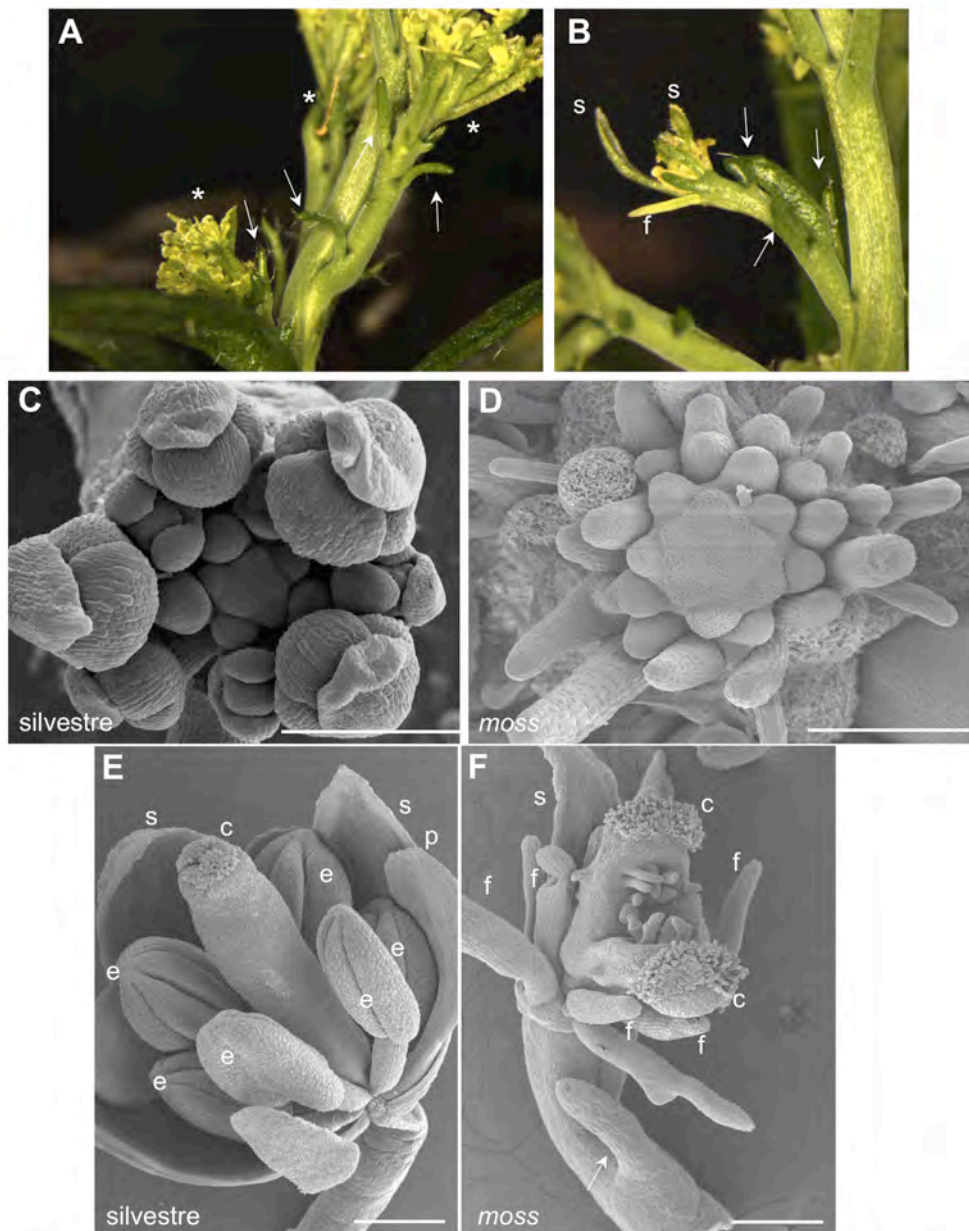
El mutante *moss* se caracterizó por ser una planta de pequeño tamaño, con una roseta formada por hojas de color verde oscuro, estrechas y prácticamente sin peciolo (Figura C1.7 A y B). Uno de sus rasgos más destacables fue la mayor ramificación de su inflorescencia principal, que producía un número de inflorescencias secundarias considerablemente mayor que el silvestre (Figura C1.7 C-E; Tabla C1.2). Debido a la presencia de muchas ramas en una planta tan pequeña, la arquitectura del mutante mostró un aspecto muy compacto (Figura C1.7 D-E). Por otra parte, el acortamiento de los entrenudos que separan las flores del mutante *moss* le confirió a su inflorescencia cierta similitud con una umbela, en lugar del racimo simple característico de *Arabidopsis* (Figura C1.7 F). La principal diferencia entre estos dos tipos de inflorescencias es que, en la umbela, los pedicelos de las flores irradian desde un mismo punto del eje, mientras que en el racimo simple, las flores aparecen en distintas posiciones de dicho eje (Figura C1.7 F) (Font Quer, 1953). En resumen, todas estas observaciones indican importantes alteraciones en la arquitectura de la parte aérea de la planta mutante *moss*.



**Figura C1.7. Arquitectura de la planta mutante *moss*.** **A)** Diferencia de tamaño entre el parental silvestre y el mutante *moss*. Se observa un menor tamaño en el caso del mutante *moss*. **B)** Las hojas del mutante *moss* son estrechas y alargadas. El peciolo es difícil de distinguir. **C)** Arquitectura de la inflorescencia de una planta del parental silvestre. Inflorescencias secundarias señaladas por asteriscos. **D-E)** Los individuos *moss* presentan una arquitectura muy compacta debido a su pequeño tamaño y a la gran proliferación de inflorescencias laterales. Inflorescencias secundarias marcadas por asteriscos. **F)** Comparación de las inflorescencias del parental silvestre y del mutante *moss*. El acortamiento de los entrenudos que separan las flores en el mutante *moss* hace que su inflorescencia recuerde a una umbela frente al racimo simple del silvestre. En los diagramas se esquematiza cómo en el racimo simple las flores aparecen en diferentes puntos a los lados del eje principal, mientras que en la umbela, salen a partir de un mismo punto. Para poder apreciar mejor la inflorescencia del silvestre, la fotografía se tomó con menos aumentos que la correspondiente al mutante *moss*.

Otra característica del fenotipo de los individuos *moss* fue la aparición de defectos en órganos laterales. Para describir dichas alteraciones se compararon a la lupa y al microscopio electrónico de barrido (SEM) las inflorescencias de individuos del mutante *moss* y del parental

silvestre. En el mutante *moss* se observó la aparición de órganos filamentosos (Figura C1.8 A y B) que se desarrollaban a partir de su meristemo inflorescente (Figura 1.8 C y D). Debido a su color verde y la presencia de tricomas (Figura C1.8 A y B) se pensó que estos filamentos podrían tratarse de hojas modificadas. De hecho, su localización en la base de inflorescencias laterales (Figura C1.7 D y Figura C1.8 A) y de algunas flores (Figura C1.8 B y E), coincidiendo con la posición de hojas caulinares y brácteas sugeriría esta posibilidad. Por otro lado, las flores del mutante *moss* presentaron severas alteraciones y eran estériles. Cabe destacar la presencia de dos carpelos no fusionados y la sustitución del segundo y tercer verticilo por un único verticilo compuesto por órganos filamentosos (Figura C1.8 B, E y F). Además, el número de órganos florales se vio reducido. Los sépalos fueron los órganos florales menos afectados, aún así su forma era más alargada y estrecha que en el silvestre (Figura C1.8 B, E y F). En resumen, todas estas observaciones muestran que en el mutante *moss* existen anomalías en los órganos laterales originados a partir del SAM.





Por último, nos preguntamos si la mutación *moss* provocaba cambios en el tiempo de floración. Para ello, se comparó el número de hojas en plantas del parental silvestre y del mutante *moss* crecidas bajo condiciones de día largo, no observándose diferencias significativas (Tabla C1.2). Sin embargo, sí se observó que la aparición de los primeros primordios florales se producía entre 7 y 10 días más tarde en los individuos *moss* que en los controles (Tabla C1.2), sugiriendo problemas en el plastocrono. Por este motivo, se decidió medir la producción de hojas en el tiempo, observándose que las plantas *moss* producían hojas a una velocidad similar al silvestre, pero presentaban un claro retraso al inicio del desarrollo (Figura C1.9). Estos resultados sugieren que la actividad del SAM podría verse afectada por la mutación *moss* al inicio de la fase vegetativa.

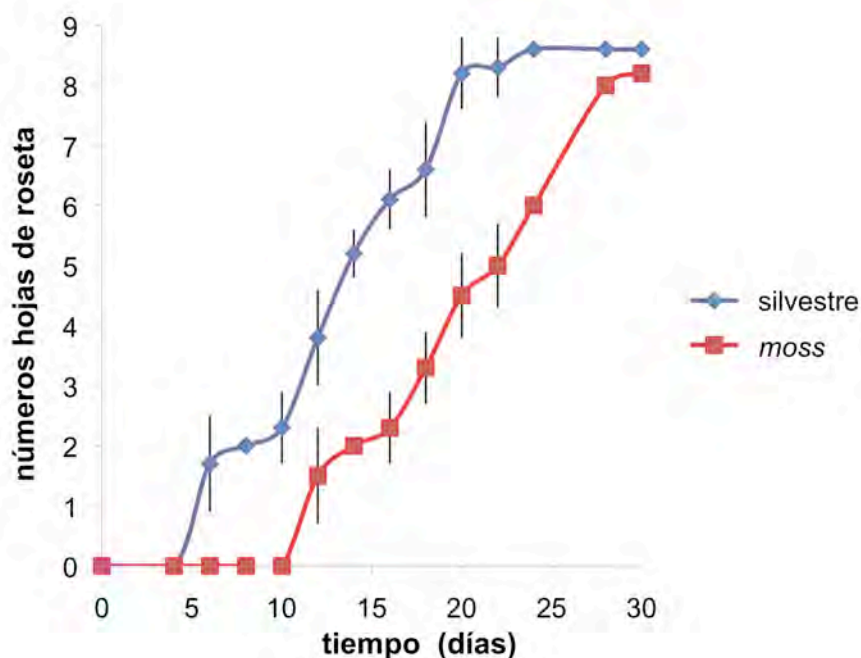
En resumen, la mutación *moss* causa un fenotipo pleiotrópico que afecta a la arquitectura de la inflorescencia, al desarrollo de los órganos laterales y a la actividad del SAM.

**Tabla C1.2. Tiempo de floración y número de inflorescencias secundarias en el parental silvestres y en el mutante *moss***

	Parental silvestre	<i>moss</i>
Inflorescencias secundarias <sup>a</sup>	2.93 ± 0.12	5.90 ± 0.34
Hojas totales <sup>b</sup>	9.67 ± 0.82	9.33 ± 0.46
Días <i>bolting</i> <sup>c</sup>	20.05 ± 0.56	28.20 ± 1.10

Cada valor representa la media ± error estándar. Para ambos genotipos se analizaron un total de 15 plantas cultivadas en día largo. <sup>a</sup> Número de inflorescencias secundarias que desarrolla la inflorescencia principal. <sup>b</sup> Suma del número de hojas de roseta más caulinares. <sup>c</sup> Días hasta hacer el *bolting*.

**Figura C1.8. Alteraciones en los órganos aéreos del mutante *moss* cultivado en condiciones de día largo.** **A)** Detalle de la arquitectura de un mutante *moss* donde se ven tres inflorescencias secundarias (señaladas por asteriscos) en cuyos tallos se aprecian órganos filamentosos de color verde y con tricomas (señalados por flechas). La posición de algunos de estos filamentos en la base de las inflorescencias secundarias coincide con la que tendrían las hojas caulinares si existieran. **B)** Detalle de una flor del mutante *moss*. Se pueden observar la presencia de sépalos estrechos y alargados (señalados por "s"), pero no de pétalos y estambres. En su lugar, existen órganos filamentosos (señalados por "f"). Del mismo modo, en el pedicelo de la flor se desarrollan órganos filamentosos de color verde y con tricomas (señalados por flechas) cuya posición coincidiría con la de posibles brácteas. **C)** Imagen del SAM en fase inflorescente de una planta silvestre (*LerPBG1*) tomada por SEM. Se observan los primordios florales. Barra = 200 µm. **D)** Imagen del SAM en fase inflorescente de una planta *moss* tomada por SEM. Las flores se han diseccionado para su mejor observación. Puede apreciarse la formación de órganos filamentosos. Barra = 200 µm. **E)** Imagen de una flor de una planta silvestre tomada por SEM. Se observa la presencia de todos los órganos típicos de una flor: sépalos (señalados por "s"), pétalos (señalados por "p"), estambres (señalados por "e") y un único carpelo (señalado por "c"). Barra = 300 µm. **F)** Imagen de una flor del mutante *moss* por SEM. El sépalo que aparece es más alargado y estrecho que el de la flor control. No se aprecian pétalos y estambres, observándose en su lugar órganos filamentosos (señalados por "f"). Además, la flor posee dos carpelos no fusionados. En la base del pedicelo existe un filamento (señalado con una flecha) cuya posición coincide con la de una posible bráctea. Barra = 250 µm.



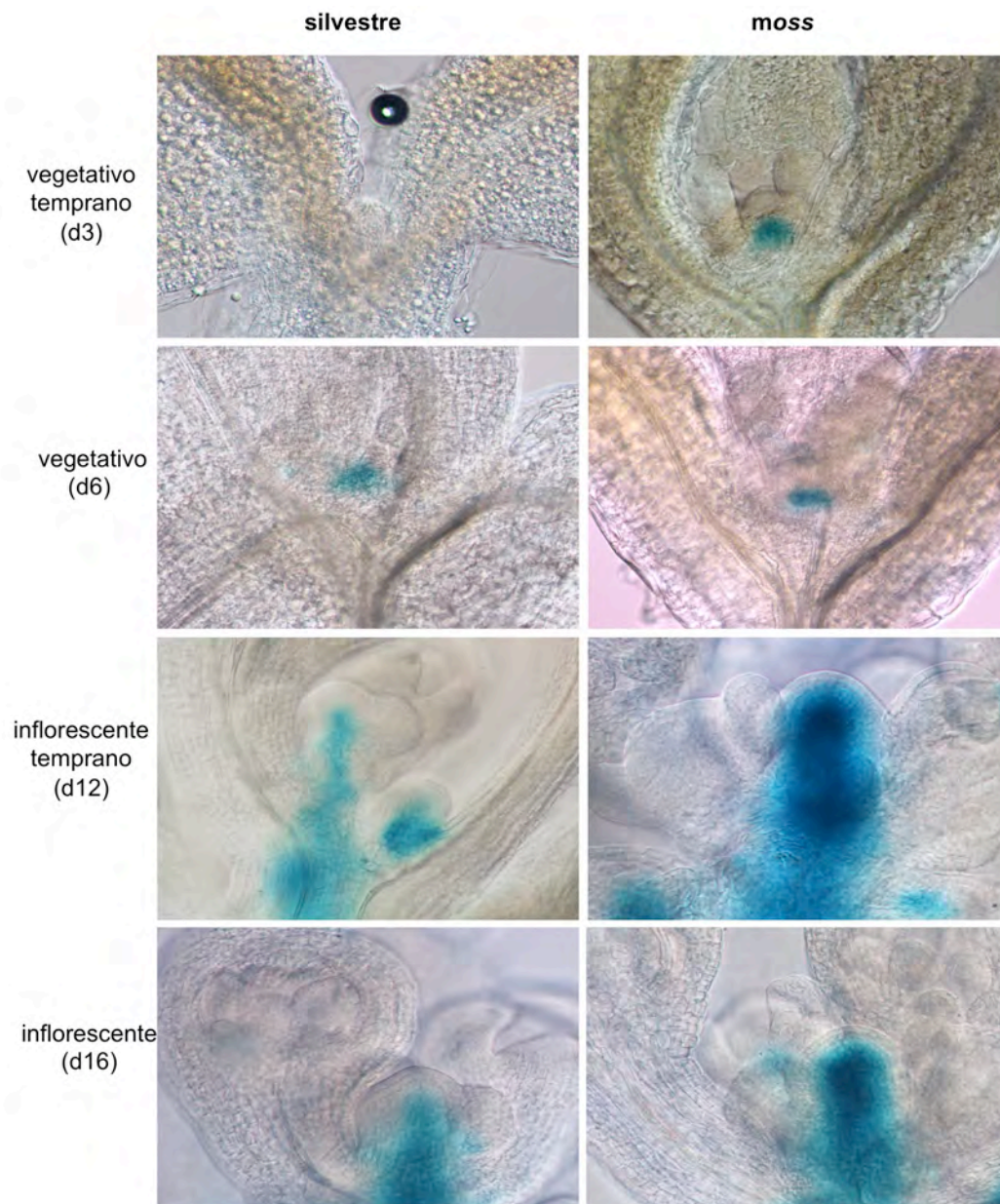
**Figura C1.9. Comparación de la tasa de producción de hojas del parental silvestre y del mutante *moss*.** Producción de hojas de roseta por el SAM en el tallo principal de plantas del parental silvestre y del mutante *moss* cultivadas en día largo. Se observa cómo las plantas *moss* inician la producción de hojas más tarde que el silvestre pero finalmente, el ritmo de producción es similar en ambas plantas. Las barras muestran el error estándar.

## 2.2. *TFL1* se expresa de manera fuerte y ectópica en el mutante *moss*

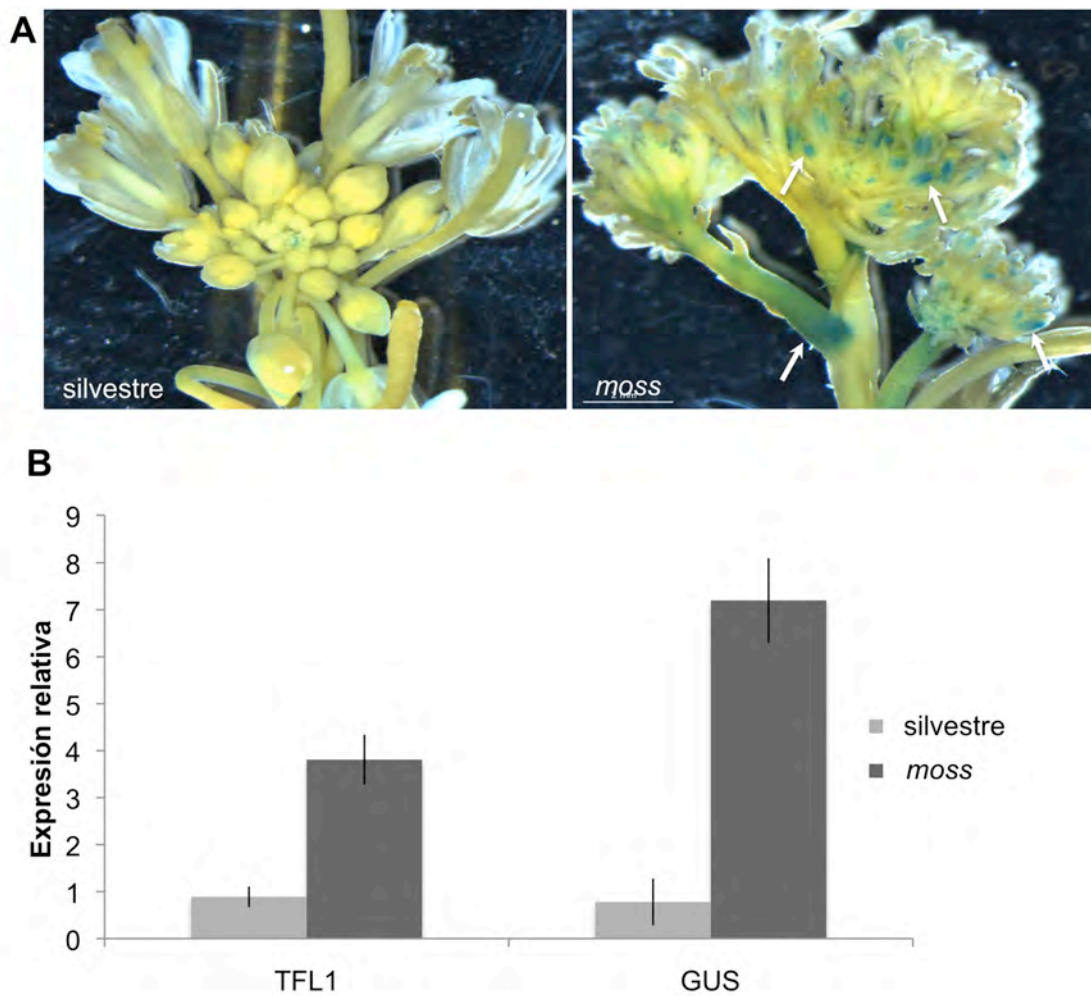
Otro de los caracteres afectados por la mutación *moss* fue el patrón de expresión de *TFL1pro::GUS*. Los individuos *moss* mostraron un patrón de expresión *TFL1pro::GUS* alterado, destacando especialmente su expresión ectópica en flores, concretamente, en carpelos (Figura C1.5 A). Como se ha comentado, la línea delatora usada para la mutagénesis contenía una construcción con una versión incompleta del promotor de *TFL1*, ya que el transgén *TFL1pro::GUS* en esa línea sólo incluía 2.8 Kb de las 4.6 Kb de que consta la región intergénica 3' de *TFL1*. Puesto que en ese transgén faltan algunos de los elementos reguladores de *TFL1*, la mutación *moss* se introdujo mediante cruce en la línea delatora *LerPBG6*. La línea *LerPBG6* contiene una construcción delatora *TFL1pro::GUS* con el promotor completo de *TFL1*. En la construcción *PBG6* el gen *GUS* está flanqueado por 2.2 Kb y 4.6 Kb de las regiones intergénicas situadas en 5' y 3' del gen *TFL1*, que a su vez, contienen todos los elementos necesarios para el correcto patrón de expresión de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010). Todos los resultados que presentamos en este apartado proceden de la observación del fenotipo causado por la mutación *moss* en este fondo *LerPBG6*.

Con el fin de describir más detalladamente el patrón de expresión de TFL1pro::GUS en el mutante *moss*, comparamos la expresión del transgén en el SAM de plantas control y *moss* a lo largo del desarrollo, desde el inicio de la fase vegetativa hasta después de la transición floral (Figura C1.10). La primera diferencia se observó en el inicio del desarrollo vegetativo, detectándose expresión TFL1pro::GUS en plantas mutantes que han expandido sus cotiledones y que apenas han desarrollado los primeros primordios de hojas, mientras que en el control silvestre todavía no se observa señal en este estadio (Figura C1.10 "vegetativo temprano"). Por lo tanto TFL1pro::GUS se activa de forma prematura en el SAM del mutante *moss*. Durante el resto del desarrollo vegetativo, la expresión TFL1pro::GUS permaneció más alta en el SAM del mutante que en el silvestre (Figura C1.10 "vegetativo"). Tras la transición floral, se produce un aumento en los niveles de TFL1pro::GUS en el centro del SAM tanto en las plantas mutantes como en el silvestre, aunque este aumento resulta más evidente en el caso del mutante *moss* (Figura C1.10 "inflorescente temprano" e "inflorescente"). La fuerte expresión de TFL1pro::GUS en el SAM del mutante *moss* se mantuvo durante el resto del desarrollo inflorescente y llegó a extenderse a los pedicelos y carpelos de las flores en la inflorescencia adulta (Figura C1.11 A). Por lo tanto, en el mutante *moss*, la expresión de TFL1pro::GUS se encuentra fuertemente inducida en toda la inflorescencia, incluida las flores.

Las conclusiones obtenidas hasta este punto sobre el efecto de la mutación *moss* en la expresión de *TFL1* se basan en el análisis del patrón de expresión de TFL1pro::GUS, que reproduce el patrón de expresión del gen *TFL1* endógeno. Para confirmar la validez de la estrategia empleada, se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de los mensajeros de *TFL1* y *GUS* en el ápice de la inflorescencia principal de plantas *moss* y silvestres de 40 días. De acuerdo con las observaciones previas (Figura C1.11 A), el resultado de la RT-qPCR mostró un incremento en el nivel de los mensajeros, tanto de *TFL1* como de *GUS*, en el ápice de la inflorescencia principal del mutante *moss* comparado con el silvestre (Figura C1. 11 B). Estos resultados muestran el paralelismo entre el patrón de expresión TFL1pro::GUS y el de *TFL1*. Ambos genes se comportaron de forma equivalente, lo que valida el uso de la construcción delatora TFL1pro::GUS para estimar la expresión de *TFL1* en el mutante *moss*. Por lo tanto, la mutación *moss* provoca la expresión alta y ectópica de *TFL1* en la inflorescencia de *Arabidopsis*.



**Figura C1.10. Patrón de expresión de TFL1pro::GUS durante el desarrollo del SAM del mutante *moss*.** Las plantas silvestre y *moss* están en el fondo genético *LerPBG6*, es decir contienen la construcción deladora TFL1pro::GUS que incluye el promotor completo de *TFL1* (2.2 Kb del 5' y 4.6 Kb del 3'). Todas las muestras se sometieron durante 3 horas a la tinción número 2 (alta astringencia) y se aclararon con hidrato de cloral. Para poder comparar los ápices de plantas silvestre y *moss*, estos se clasificaron en cuatro estadios diferentes: vegetativo temprano, vegetativo, inflorescente temprano e inflorescente. La edad de la planta indicada se refiere al genotipo silvestre.



**Figura C1.11. Expresión de *TFL1* y *TFL1pro::GUS* en el ápice inflorescente de plantas silvestre y *moss*.** **A)** Patrón de expresión de *TFL1pro::GUS* en la inflorescencia principal de plantas silvestre y *moss* en fondo genético *LerPBG6* cultivadas durante 40 días en condiciones de día largo. Ambas muestras se sometieron a la tinción número 2 durante toda la noche. En el mutante *moss* se observa la expresión ectópica de *TFL1pro::GUS* en los pedicelos y carpelos de las flores (señalado por flechas). **B)** Niveles de expresión relativos de *TFL1* y *GUS* analizados por RT-qPCR en el ápice principal de plantas silvestre y *moss* en fondo genético *LerPBG6*, cultivadas durante 40 días en condiciones de día largo. El gen *UBIQUITIN 10 (UBQ10)* se utilizó como gen constitutivo de referencia. Las barras muestran el error estándar.

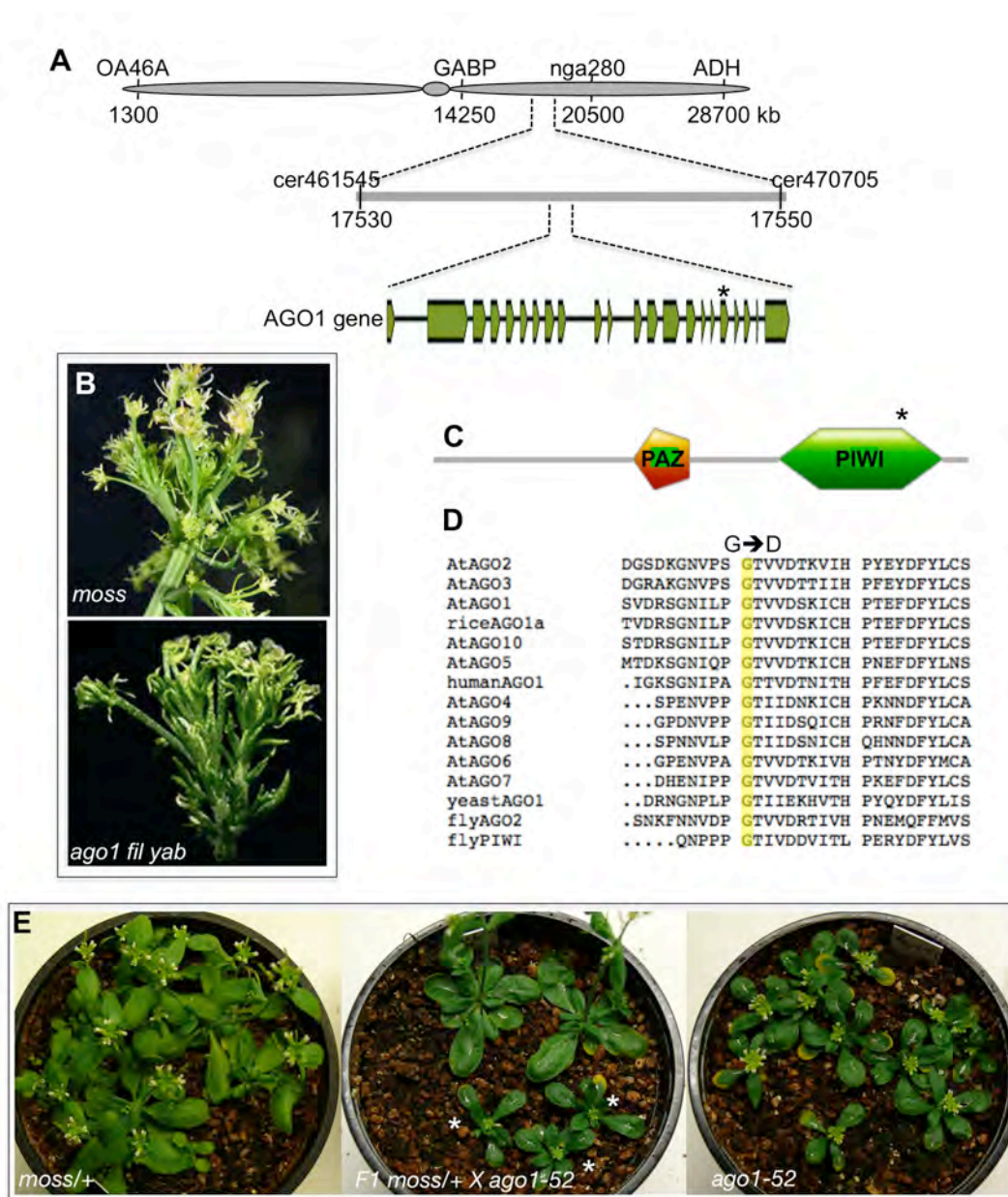
### 3. Identificación del gen afectado por la mutación *moss*

El mutante *moss* se identificó en el escrutinio de la mutagénesis de la línea delatora TFL1pro::GUS llevado a cabo sobre plantas M2. Debido a su esterilidad, hubo que recurrir a la identificación de plantas M2 procedentes de la misma familia M1 que segregaran el mismo fenotipo. Para entender la naturaleza de la mutación *moss*, se analizó la segregación del fenotipo sembrando semillas de varias líneas M2 segregantes en placas con medio de cultivo. Para todos los casos, la proporción de individuos *moss* observada fue cercana a 1/4, lo que sugiere que el fenotipo *moss* está causado por una mutación monogénica recesiva.

Para identificar el locus causante del fenotipo *moss*, se procedió a analizar la segregación de marcadores moleculares en una población de 500 individuos *moss* recombinantes procedentes del cruce entre una planta segregante para el fenotipo *moss* (fondo Ler) y una planta de ecotipo Col. Este análisis se llevó a cabo en el Servicio de Cartografía Genética de la Universidad Miguel Hernández, gracias a la colaboración de los Drs. M.R. Ponce y J.L. Micol y permitió situar la mutación dentro de una región de 16 Kb del cromosoma 1. Concretamente, entre los marcadores CER461545 y CER470705. Esta región contenía 26 genes anotados, uno de los cuales era el gen *ARGONAUTE 1 (AGO1)* (Figura C1.12 A), implicado en el silenciamiento génico postranscripcional mediado por pequeños RNAs (Vaucheret, 2008). La similitud del fenotipo *moss* con el del triple mutante *ago1-37 fl yab3-2* (Yang *et al.*, 2006) (Figura C1.12 B), sugirió que la mutación *moss* podía afectar a *AGO1*.

Para analizar si la mutación *moss* se localizaba en el locus *AGO1*, se procedió a secuenciar el gen *AGO1* de individuos *moss*. La secuencia de *AGO1* en *moss* mostró una transición simple guanina/adenina en el primer nucleótido del exón 18 que daba lugar a la sustitución de una Gly altamente conservada por un Asp en el dominio PIWI de la proteína AGO1 (Figura C1.12 C y D). Este resultado sugirió que la mutación en *AGO1* era la responsable del fenotipo *moss*.

Para confirmar si esa mutación era responsable del fenotipo *moss*, se llevó a cabo una prueba de alelismo. La F1 del cruce entre un homocigoto para el alelo hipomorfo débil *ago1-52* y una planta heterocigota para *moss* dio como resultado, aproximadamente, la mitad de las plantas con fenotipo silvestre y la otra mitad con fenotipo *ago1-52* (Figura C1.12 E). Este resultado indica que los mutantes *ago1-52* y *moss* son alelos de un mismo gen y por lo tanto, que la mutación de *AGO1* es la causa del fenotipo *moss*.



**Figura C1.12. La mutación *moss* afecta al gen *AGO1* de *Arabidopsis*.** **A)** El mapeo con marcadores moleculares delimitó la mutación a una región de 16Kb dentro del cromosoma 1, entre los marcadores cer461545 y cer470705 que comprende, entre otros, al gen *AGO1*, en cuyo exón 18 se encontró una mutación. **B)** Similitud entre las inflorescencias del mutante *moss* y la del triple *ago1 fil yab* (Yang *et al.*, 2006). **C)** Esquema de la proteína *AGO1* con sus dominios PAZ y PIWI. **D)** La mutación causante del fenotipo *moss* provoca en la proteína *AGO1* el cambio de una Gly conservada en todas las proteínas con dominio PIWI por un Asp. **E)** Prueba de alelismo entre *moss* y *ago1-52*. Los dos fenotipos parentales aparecen en la F1. Las plantas F1 con fenotipo *ago1-52* se han señalado con un asterisco. Las plantas se cultivaron en condiciones de día largo. Notas: AtAGO1-10 (familia ARGONAUTE de *Arabidopsis thaliana*). humanAGO1 (Proteína *AGO1* de *Homo sapiens*). Fly AGO2 (Proteína *AGO2* de *Drosophila melanogaster*). flyPIWI (Proteína PIWI de *Drosophila melanogaster*). riceAGO1a (proteína *AGO1a* de *Oryza sativa*). yeastAGO1 (Proteína *AGO1* de *Saccharomyces pombe*).

#### 4. Análisis fenotípico del alelo *ago1-26*

El mutante *moss* se seleccionó por presentar expresión ectópica de *TFL1* y una serie de defectos en la arquitectura de su inflorescencia. Para confirmar que ambas características están realmente causadas por la mutación del gen *AGO1*, se procedió al análisis fenotípico de otros alelos *ago1*. En las bases de datos hay disponibles más de 50 alelos mutantes *ago1*, existiendo una gran variabilidad de fenotipos entre ellos. Desde alelos con fenotipos muy débiles a alelos fuertes donde la planta no llega a completar su desarrollo (Kidner y Martienssen, 2005). Debido a nuestro interés por relacionar la función de *AGO1* con los defectos en la arquitectura de la inflorescencia, necesitábamos analizar otros alelos *ago1* diferentes al *moss* cuya inflorescencia también se viera afectada. El principal problema fue que la mayor parte de los alelos *ago1* tenían un fenotipo extremo en el que la planta no llegaba a producir una inflorescencia, no siendo, por lo tanto, útiles para nuestro estudio. Por el contrario, muchos de los alelos hipomorfos de *AGO1* apenas presentan alteraciones fenotípicas más allá de las hojas, teniendo una inflorescencia prácticamente normal. Finalmente, seleccionamos a *ago1-26* por tratarse de un alelo hipomorfo moderado que llega a producir una inflorescencia (Morel *et al.*, 2002) y además, ésta presenta algunos de los defectos descritos en *moss*.

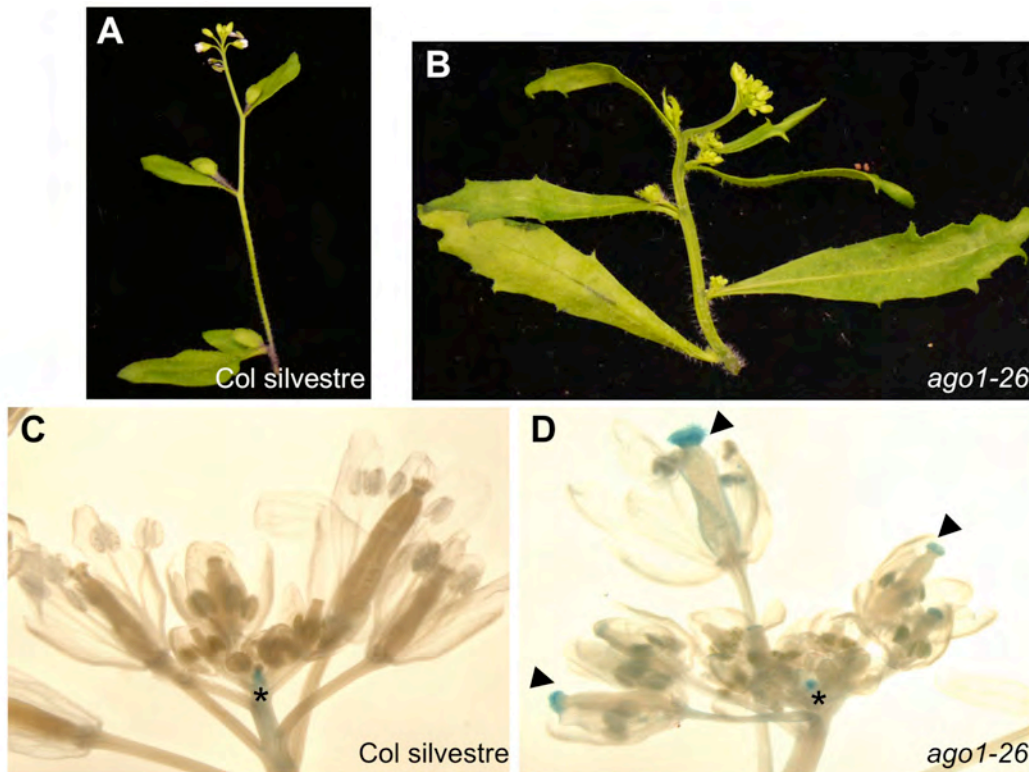
Así pues, una característica destacada del mutante *ago1-26*, por su similitud con el mutante *moss*, es la mayor ramificación de su inflorescencia principal, que presenta un número considerablemente mayor de inflorescencias secundarias que la del silvestre (Tabla C1.3 y Figura C1.13 A y B). Además, al igual que el mutante *moss*, las plantas *ago1-26* son estériles.

**Tabla C1.3. Tiempo de floración y número de inflorescencias secundarias en plantas silvestres y *ago1-26***

	Col silvestre	<i>ago1-26</i>
Inflorescencias secundarias <sup>a</sup>	2.40 ± 0.16	7.4 ± 0.37
Hojas de roseta <sup>b</sup>	8.60 ± 0.16	8.9 ± 0.28
Hojas caulinares <sup>c</sup>	2.40 ± 0.16	7.4 ± 0.37
Hojas totales <sup>d</sup>	11.00 ± 0.21	16.3 ± 0.60

Cada valor representa la media ± error estándar. Para ambos genotipos se analizaron un total de 12 plantas cultivadas en día largo. <sup>a</sup> Número de inflorescencias secundarias que desarrolla la inflorescencia principal. <sup>b</sup> Número de hojas de roseta. <sup>c</sup> Número de hojas caulinares de la inflorescencia principal. <sup>d</sup> Suma del número de hojas de roseta más caulinares.





**Figura C1.13. Fenotipo de las plantas *ago1-26* en condiciones de día largo.** **A)** Arquitectura de la inflorescencia principal de una planta *Col silvestre*. **B)** Arquitectura de la inflorescencia principal de *ago1-26*. Se observa que mientras el silvestre ha producido 3 inflorescencias secundarias, *ago1-26* ha producido 6. **C)** Patrón de expresión de *TFLpro::GUS* en el ápice principal de una planta silvestre. Se observa señal en el centro del ápice (asterisco). **D)** Patrón de expresión de *TFLpro::GUS* en el ápice principal de una planta *ago1-26*. Se observa señal en los carpelos de las flores (puntas de flecha) además de en el centro del ápice. Algunos estambres también presentan señal. Los ápices mostrados en C y D se sometieron a la tinción de GUS número 1 durante toda la noche y posteriormente se trataron con hidrato de cloral.

El siguiente paso fue comprobar si, al igual que en el mutante *moss*, la expresión de *TFL1* estaba alterada en *ago1-26*. Para ello, la mutación *ago1-26* se introdujo mediante un cruce en la línea *LerPBG6* que contiene la construcción deladora *TFL1pro::GUS* con el promotor completo de *TFL1*. El análisis del patrón de expresión de *TFL1pro::GUS* en *ago1-26* mostró señal ectópica del transgén en las flores de dichas plantas, tal y como se observa en el mutante *moss*. Todos estos resultados nos confirman que los fenotipos de mayor ramificación de la inflorescencia principal y expresión ectópica de *TFL1* observados en las plantas *moss* están causados por la mutación en el gen *AGO1* e indica que *AGO1* está implicado en la regulación de *TFL1*.

## 5. Efecto de la mutación *tfl1* en el fenotipo del mutante *moss*

Los resultados presentados indican que la mutación del gen *AGO1* es la causante de una inflorescencia principal más ramificada y del aumento del nivel de expresión de *TFL1* en el SAM (incluyendo su activación prematura) observados en las plantas *moss*. Debido a que existen

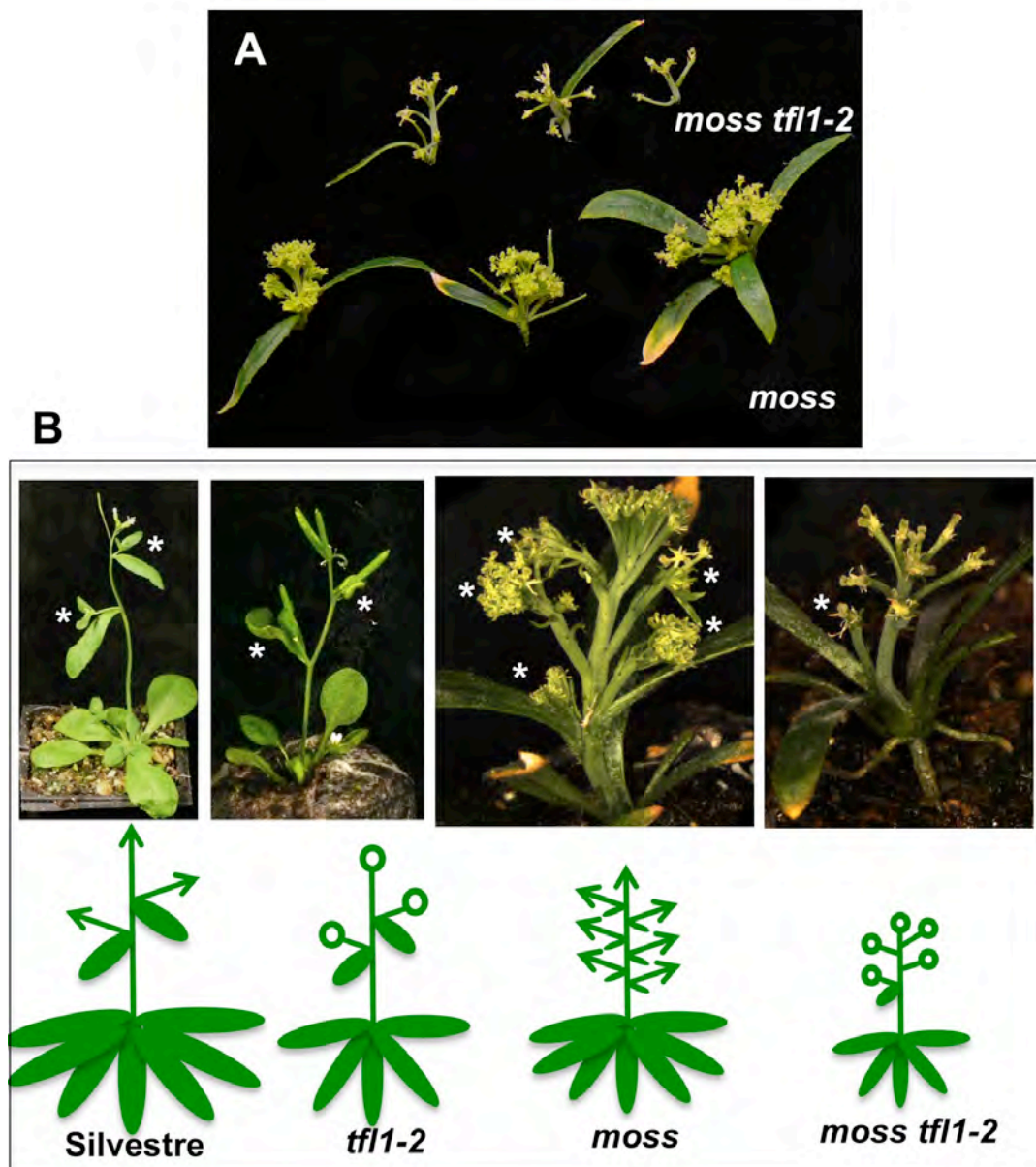
ejemplos en la bibliografía en los que la expresión ectópica de *TFL1* causa un aumento del número de inflorescencia (Ratcliffe *et al.*, 1998; Ferrándiz *et al.*, 2000), nos preguntamos si el aumento del número de inflorescencias secundarias descrito en las plantas *moss* sería consecuencia del aumento del nivel de *TFL1* en su SAM. Si esta hipótesis fuera cierta, al eliminar el exceso de *TFL1* en la inflorescencia del mutante *moss*, su arquitectura debería simplificarse, desarrollándose menos inflorescencias secundarias..

Para responder a esta pregunta, se generó el doble mutante *moss tfl1-2*. El análisis de la arquitectura de la inflorescencia en el doble mutante, los mutantes simples y el silvestre (Tabla C1.4 y Figura C1.14), dio como resultado una drástica disminución del número de inflorescencias secundarias en el doble mutante (Tabla C1.4). Por lo tanto, al suprimir la actividad de *TFL1* en el mutante *moss* (en el doble mutante *moss tfl1-2*), la arquitectura de éste se simplificó drásticamente hasta parecerse a la del mutante simple *tfl1-2* (Figura C1.14 B). Estos resultados indican que la expresión aumentada de *TFL1* contribuye al cambio en la arquitectura del mutante *moss*.

**Tabla C1.4. Influencia de la mutación *tfl1* en la arquitectura de la inflorescencia del mutante *moss***

	Parental silvestre	<i>tfl1-2</i>	<i>moss</i>	<i>moss tfl1-2</i>
Hojas roseta <sup>a</sup>	6.73 ± 0.23	5.60 ± 0.13	6.27 ± 0.17	6.27 ± 0.45
Hojas caulinares <sup>b</sup>	2.93 ± 0.12	2.33 ± 0.19	3.07 ± 0.38	0.73 ± 0.15
Hojas totales <sup>c</sup>	9.67 ± 0.21	7.93 ± 0.15	9.33 ± 0.46	7.00 ± 0.50
Inflorescencias secundarias <sup>d</sup>	2.90 ± 0.12	0.20 ± 0.14	5.91 ± 0.34	0.13 ± 0.09
Flores axilares <sup>e</sup>	0.00 ± 0.00	2.13 ± 0.17	0.00 ± 0.00	0.73 ± 0.15
flores <sup>f</sup>	N.D.	1.67 ± 0.19	N.D.	5.47 ± 0.74

Cada valor representa la media ± error estándar. Para cada genotipo se analizaron un total de 15 plantas cultivadas en día largo. <sup>a</sup> Número de hojas de roseta. <sup>b</sup> Número de hojas caulinares de la inflorescencia principal. <sup>c</sup> Suma del número de hojas de roseta más caulinares. <sup>d</sup> Número de inflorescencias secundarias. <sup>e</sup> Número de flores axilares en la inflorescencia principal. <sup>f</sup> Número de flores producidas por la inflorescencia principal de plantas *tfl1* y *moss tfl1* (no se incluyen las flores axilares ni las flores que forman parte de la flor terminal). N.D., no determinado.



**Figura C1.14.** La mutación *tfl1* simplifica la arquitectura del mutante *moss* en condiciones de día largo. **A)** Comparación de las inflorescencias principales del mutante *moss* y *moss tfl1-2*. Para una mejor observación de las inflorescencias sólo se han conservado las hojas caulinares, habiéndose eliminado las de roseta. Se observa cómo las inflorescencias principales de las plantas *moss* se ramifican en varias inflorescencias secundarias que desaparecen en los dobles mutantes *moss tfl1-2*, cuya arquitectura de la inflorescencia queda más simplificada. **B)** Imágenes y esquemas que muestran la complejidad de la arquitectura en la inflorescencia principal en condiciones de día largo de plantas del parental silvestre, *tfl1-2*, *moss* y doble *moss tfl1-2* respectivamente. En los mutantes *tfl1-2* y *moss tfl1-2*, a menudo, las inflorescencias secundarias son sustituidas por flores axilares (flor sustentadas por una hoja caulinar). En las imágenes, las inflorescencias y/o flores axilares formadas a partir de la inflorescencia principal están señaladas con un asterisco. En los esquemas, las inflorescencias indeterminadas son representadas por flechas y las flores están representadas por círculos.



**CAPÍTULO 2**



## **Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de *TFL1* en especies de brassicáceas**

Los promotores de los genes normalmente contienen múltiples secuencias reguladoras a las que se unen específicamente los factores de transcripción. Estos factores de transcripción actúan modulando la unión de la RNA polimerasa, asegurando así que la transcripción ocurra en el tejido y momento adecuado. A menudo, diferentes sitios de unión a factores de transcripción (TFBSs) se encuentran agrupados, próximos entre sí, formando módulos reguladores cada uno de los cuales está implicado en la respuesta a un determinado estímulo interno o externo (Arnone y Davidson, 1997; Priest *et al.*, 2009).

La búsqueda de regiones funcionales que contengan este tipo de secuencias reguladoras puede llevarse a cabo experimentalmente mediante el análisis de deleciones seriadas del promotor (Hepworth *et al.*, 2002; Baurle, 2005). Por otra parte, existe la posibilidad de utilizar herramientas informáticas capaces de predecir potenciales regiones reguladores dentro de los promotores que se basan en el hecho de que sólo una pequeña fracción del DNA no codificante funciona como TFBSs (Wray *et al.*, 2003). El estudio de los promotores con esas herramientas puede servir de guía para el diseño experimental, lo que permite ahorrar tiempo y recursos.

Ya hace más de una década se comprobó experimentalmente cómo secuencias evolutivamente conservadas en el promotor de *MyoD* de diferentes vertebrados contribuyen al patrón de expresión del gen (Asakura *et al.*, 1995). Este hallazgo puso de manifiesto el poder de la genómica comparativa para la predicción de elementos reguladores y condujo al desarrollo de métodos como el *phylogenetic footprinting*, basado en que la presión selectiva que actúa durante la evolución conduce a la conservación de las secuencias reguladoras más relevantes. Es decir, aquellas regiones del genoma que tienen una función biológica clave deben de acumular mutaciones a una velocidad menor que regiones cuya secuencia no tiene ninguna función específica (Ureta-Vidal *et al.*, 2003). Por lo tanto, la comparación de la secuencias de promotores de genes ortólogos en distintas especies permite identificar regiones conservadas que quizás sean importantes para su regulación. La aplicación de esta estrategia lleva consigo dos premisas a considerar. La primera, que la regulación de la expresión de los genes ortólogos debe de ser idéntica o muy parecida y la segunda, que las especies utilizadas en el análisis deben de estar lo bastante próximas como para poder detectar similitudes en su secuencia no codificante, pero lo suficientemente distantes como para que en el proceso de divergencia sólo las secuencias con función biológica se mantengan conservadas, evitando así falsos positivos (Wasserman y Sandelin, 2004).

Pese al potencial riesgo de realizar este tipo de análisis con especies muy próximas, el *phylogenetic shadowing*, una variante del *phylogenetic footprinting*, compara especies muy cercanas entre sí, teniendo en cuentas sus relaciones filogenéticas para localizar regiones conservadas colectivamente, facilitando así la identificación de regiones no codificantes

funcionales (Boffelli *et al.*, 2003). El *phylogenetic shadowing* ha demostrado ser eficaz en la predicción de elementos reguladores en plantas, como en el caso de los genes *AGAMOUS* (*AG*) y *CRABS CLAW* (*CRC*). La comparación de los promotores de estos dos genes en distintas especies de la familia de las brasicáceas permitió identificar secuencias reguladoras importantes cuya eliminación alteraba el patrón de expresión de ambos genes (Hong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005).

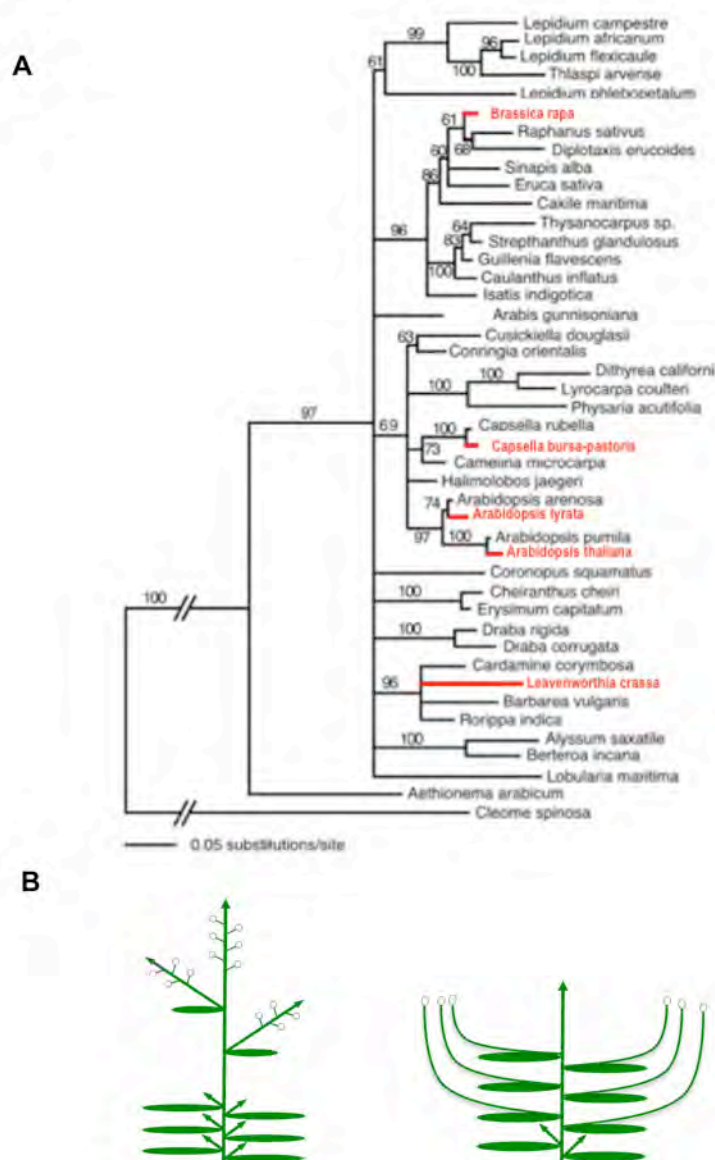
El gen *TFL1* tiene un papel clave en la inflorescencia de *Arabidopsis* y su patrón de expresión, que es esencial para su función, está fuertemente regulado. A pesar de ello, se conoce muy poco sobre cómo se regula la expresión de *TFL1*. Sólo, recientemente, se ha mostrado la unión directa de las proteínas codificadas por los genes *API* y *LFY* a su promotor (Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011). Por todo esto, con el fin de investigar más a fondo la regulación de *TFL1*, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un análisis del promotor de *TFL1* mediante el empleo de delecciones seriadas (Serrano-Mislata, 2010). Para completar y facilitar dicho análisis, en esta tesis hemos procedido al estudio comparativo de la región genómica que contiene al gen *TFL1* en cinco especies de brasicáceas: *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), *Arabidopsis lyrata* (*A. lyrata*), *Capsella bursa-pastoris* (*C. bursa-pastoris*), *Brassica rapa* (*B. rapa*) y *Leavenworthia crassa* (*L. crassa*) (Figura C2.1 A). Todas estas especies presentan una arquitectura de la inflorescencia idéntica, a excepción de *L. crassa* que muestra ciertas diferencias (Figura C2.1 B), sugiriendo que los ortólogos de *TFL1* en las cinco especies tienen una función similar.

## 1. Obtención de las secuencias no codificantes de genes ortólogos de *TFL1* en diferentes especies de brasicáceas

Para la realización de este estudio comparativo, se utilizaron aquellas especies de brasicáceas de las que pudimos disponer de las secuencias no codificantes de genes ortólogos al gen *TFL1* de *Arabidopsis* (*AtTFL1*). Por este motivo, utilizamos *L. crassa* al disponer de las secuencias del ortólogo de *TFL1* con sus correspondientes regiones intergénicas, facilitadas por el Dr. D. Baum (U. Wisconsin, EEUU); *C. bursa-pastoris*, por disponer en nuestro laboratorio de una genoteca de cósmidos procedente del laboratorio de la Dra. R. Schmidt (MPG, Alemania); *B. rapa*, por la gran cantidad de recursos disponibles como resultado del proyecto para la secuenciación de su genoma, y *A. lyrata*, cuya secuencia se ha incluido recientemente en las bases de datos. Por último, como secuencia de referencia, dado que el objetivo último era complementar el análisis por delecciones del promotor de *TFL1* de *Arabidopsis* llevado a cabo en nuestro laboratorio (Serrano-Mislata, 2010), decidimos utilizar las secuencias del ecotipo *Ler*, que fue el fondo utilizado en ese análisis por delecciones, y del que disponíamos de un clon con el fragmento genómico que incluía a *TFL1* procedente del laboratorio del Dr. D. Bradley (JIC, Reino Unido). En resumen, para todos los casos, excepto *C. bursa-pastoris* y *B. rapa*, conocíamos el ortólogo de *TFL1*. Por lo tanto, nuestro trabajo comenzó con la identificación de



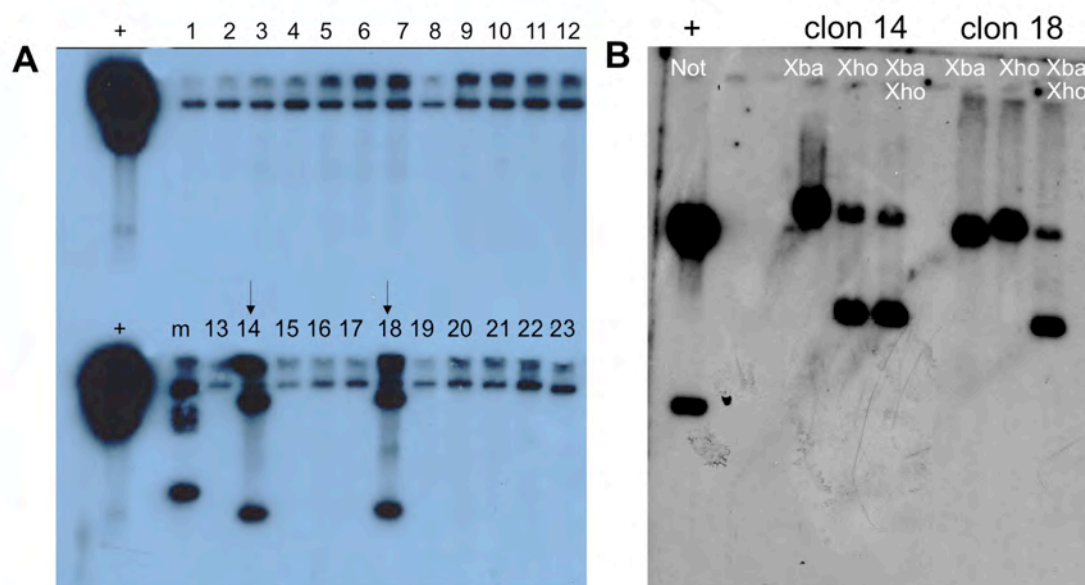
los ortólogos de *TFL1* en estas dos especies. Posteriormente, continuaría con la secuenciación de la región genómica que incluye a *TFL1* en estas dos especies además de en el ecotipo *Ler* de *Arabidopsis*.



**Figura C2.1. Especies pertenecientes a la familia de las brasicáceas utilizadas en el análisis comparativo del promotor de *TFL1*.** **A)** Árbol filogenético sin raíz de la familia de las brasicáceas adaptado de Koch *et al.*, (2000) y Hong *et al.*, (2003). En rojo las especies utilizadas en este trabajo. **B)** Diferencias entre la arquitectura de *Arabidopsis*, *A. lyrata*, *C. bursa-pastoris* y *B. rapa* (izquierda) en la que las flores (representadas por círculos blancos) se forman en tallos elongados y no están sustentadas por brácteas y la arquitectura de *L. crassa* (derecha) donde las flores aparecen en las axilas de las hojas de la roseta. Adaptado de Yoon y Baum (2004). En ambos casos se trata de inflorescencias indeterminadas.

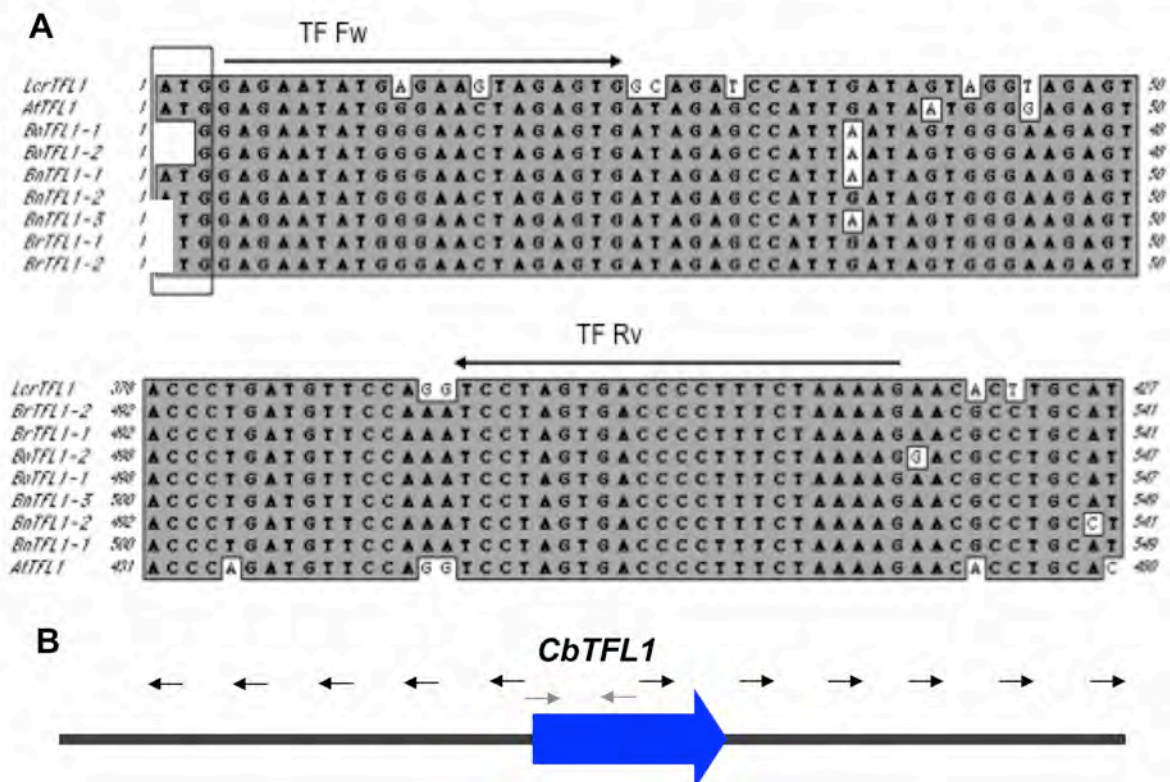
### 1.1. Identificación del ortólogo de *TFL1* de *Capsella bursa-pastoris* y secuenciación de la región genómica correspondiente

En un primer escrutinio de una genoteca de cósmidos del genoma de *C. bursa-pastoris* se identificaron 23 clones positivos al hibridar con una sonda del cDNA completo de *AtTFL1* en condiciones de baja astringencia (55°C y alta fuerza iónica, datos no mostrados). Posteriormente, se procedió al análisis mediante Southern blot de dichos clones. Para ello, se procedió a digerir cada uno de estos clones con NotI y posteriormente se transfirieron a una membrana, donde se hibridaron de nuevo con la sonda del cDNA de *AtTFL1* en condiciones de alta astringencia (65°C y baja fuerza iónica). Los clones 14 y 18 resultaron ser los que mostraron una mayor hibridación con la sonda de *AtTFL1* (Figura C2.A). Para ratificar estos resultados, se realizó un segundo análisis mediante hibridación tipo Southern de estos dos clones, también en condiciones de alta astringencia, digiriendo el DNA con otras enzimas distintas. De nuevo el DNA de ambos clones volvió a hibridar fuertemente con la sonda de *AtTFL1* (Figura C2.B). Estos resultados sugieren que los clones 14 y 18 podían contener al ortólogo de *AtTFL1*.



**Figura C2.2. Análisis por Southern blot de dos clones homólogos de *TFL1* aislados de la genoteca de *C. bursa-pastoris* y estrategia empleada para su secuenciación. A)** Autorradiografía de la hibridación en condiciones de alta astringencia con sonda del cDNA de *AtTFL1* de 23 clones previamente seleccionados de una genoteca de *C. bursa-pastoris* como posibles candidatos a contener al ortólogo de *TFL1*. En la parte superior aparecen, por este orden, un control positivo (*AtTFL1* genómico digerido con NotI) y los clones del 1 al 12 digeridos con NotI. En la parte inferior, tras el control positivo, un marcador de tamaños (m) que muestra hibridación no específica y los clones del 13 al 23 digeridos con NotI. Señalados con una flecha los dos clones (14 y 18) que mostraron una mayor hibridación con la sonda. **B)** Autorradiografía de la hibridación en condiciones de alta astringencia con sonda del cDNA de *AtTFL1* de los clones 14 y 18 digeridos con XbaI, XhoI y XbaI/XhoI respectivamente. +, control positivo (*AtTFL1* genómico digerido con NotI).

Posteriormente, con el fin de determinar si los insertos de dichos clones contenían al ortólogo de *AtTFL1*, se procedió a la amplificación a partir de los mismos de un fragmento de aproximadamente 500 pb con oligonucleótidos derivados de la secuencia codificante de *AtTFL1*. Para ello, se compararon las secuencias de los dos primeros exones, así como del primer intrón de los ortólogos de *TFL1* en *Arabidopsis*, *L. crassa* (Liu *et al.*, 2010) y en diferentes especies del género *Brassica* (Mimida y Motoyoshi, 1999) eligiéndose las regiones más conservadas para el diseño de la pareja de oligonucleótidos (Figura C2.3 A). Posteriormente, se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre los clones 14 y 18 utilizando dichos cebadores y se secuenciaron los amplicones resultantes. En ambos casos se obtuvo la misma secuencia, que resultó muy similar a la secuencia de *AtTFL1*.



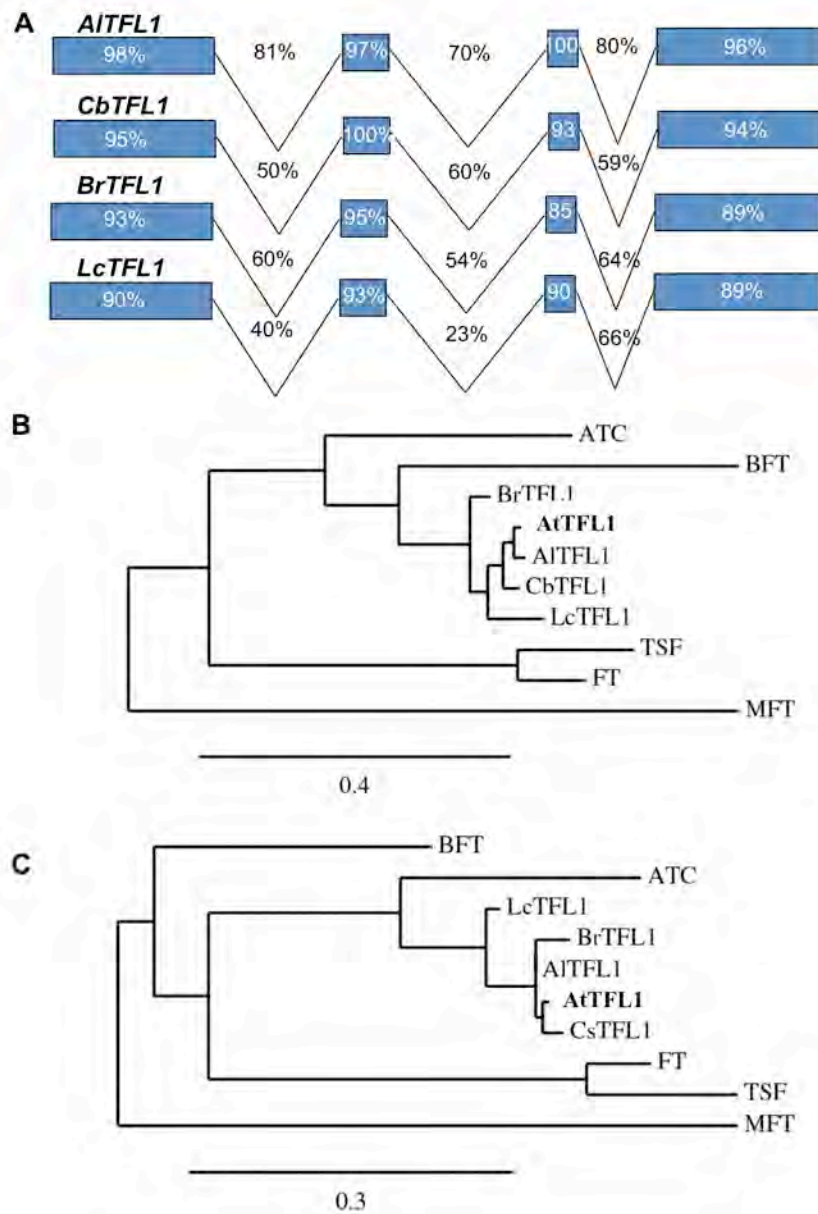
**Figura C2.3. Estrategia empleada para la secuenciación de *CbTFL1* y sus regiones flanqueantes.** **A)** Comparación de la secuencia del inicio del primer exón (parte superior) y final del segundo exón (parte inferior) de supuestos ortólogos de *TFL1* de diferentes especies de brassicáceas. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR del fragmento de los clones de *C. bursa-pastoris* se encuentran señalados con flechas negras en (A) y grises en (B). Rectángulo: marca el ATG con que comienza el primer exón. *AtTFL1*, *TFL1* de *A. thaliana*. *CbTFL1*, *TFL1* de *C. bursa-pastoris*. *LcrTFL1*, *TFL1* de *L. crassa*. *BrTFL1-1* y *BrTFL1-2*; *BnTFL1-1*, *BnTFL1-2* y *BnTFL1-3*; *BoTFL1-1* y *BoTFL1-2* son los supuestos ortólogos de *TFL1* de *B. rapa*, *B. napus* y *B. oleracea* (Mimida y Motoyoshi, 1999). **B)** Para la determinación de la secuencia de la región genómica de *CbTFL1* se realizaron varias rondas de secuenciación sucesivas utilizando en cada caso los extremos del fragmento previamente secuenciado para diseñar oligonucleótidos con los que continuar la secuenciación hacia los extremos. La primera ronda de secuenciación se inició con la pareja de oligonucleótidos diseñados en (A).

A continuación, una vez identificado el posible ortólogo de *AtTFL1* en *C. Bursa-pastoris*, al que denominamos *CbTFL1*, y puesto que el análisis de Southern sugería que los insertos de los clones 14 y 18 eran muy similares, decidimos obtener a partir del clon 14, tanto la secuencia del gen *CbTFL1* como de sus regiones no codificantes en 5' y 3'. Para ello se realizaron varias rondas de secuenciación sucesivas, utilizando en cada caso los extremos del fragmento previamente secuenciado para diseñar oligonucleótidos con los que continuar la secuenciación hacia los extremos (Figura C2.3B). Finalmente, tras varias rondas sucesivas de secuenciación se consiguió determinar la secuencia completa del gen y de sus regiones flanqueantes.

La estructura de cuatro exones y tres intrones predicha para el locus *CbTFL1*, resultó ser idéntica a la de *AtTFL1*. La comparación entre los exones de ambos genes (Figura C2.4 A) mostró una gran similitud en tamaño y secuencia. Así, el primer exón de *CbTFL1* es ligeramente más corto que su correspondiente en Arabidopsis, mientras que, la longitud del segundo y tercer exón apenas varía respecto a Arabidopsis y el cuarto exón resulta ser algo más largo en el caso de *CbTFL1*. El porcentaje de similitud entre los exones de *CbTFL1* y *AtTFL1* es superior al 94% para todos los casos, lo que supone que las proteínas codificadas por ambos genes tan sólo difieren en un aminoácido en su tamaño (178 aminoácidos *CbTFL1* frente a 177 de *AtTFL1*) y en cuatro aminoácidos en su secuencia (Figura C2.4 B).

Para confirmar la ortología entre *CbTFL1* y *AtTFL1*, se compararon las secuencias codificantes de estos dos genes, junto a la del ortólogo de *TFL1* de *L. crassa* (*LcTFL1*) y *A. lyrata* (*AlTFL1*) incluyendo también al resto de genes de la familia *FT-TFL1* de Arabidopsis (*FT*, *TSF*, *ATC*, *MFT* y *BFT*). El análisis filogenético de estas secuencias, tanto a nivel de DNA como de proteína, dio como resultado árboles filogenéticos consistentes con *CbTFL1* como ortólogo de *AtTFL1* (Figura C2.4 C y D).

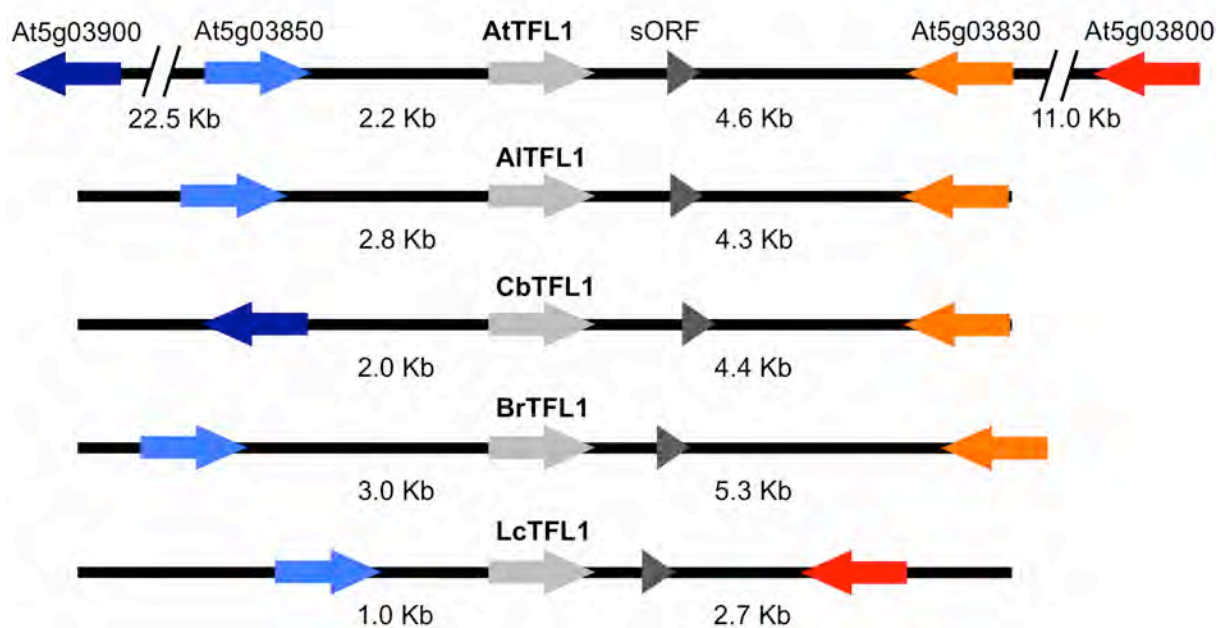
La secuenciación de las regiones intergénicas de *CbTFL1* que obtuvimos incluía también a sus genes flanqueantes, lo que nos permitió observar que la longitud de éstas es muy similar a las de Arabidopsis (Figura C2.5). Asimismo, pudimos utilizar esta secuencia para analizar el grado de sintenia entre las regiones genómicas de estas dos especies. Así, los loci más próximos en 3' fueron homólogos a AT5G0387 y AT5G03830, al igual que en Arabidopsis (Figura C2. 5), lo que indica que existe sintenia entre *C. bursa-pastoris* y Arabidopsis. AT5G0387 ha sido anotado como una pequeña ORF (sORF) que codificaría una hipotética proteína de 51 aminoácidos, aunque no existen evidencias claras de que realmente se exprese según los datos del TAIR y del trabajo de Hanada *et al.*, (2007). AT5G03830 codifica una proteína de función desconocida y no se coexpresa con *AtTFL1* (Bio-Array Resource for plant biology, BAR). Mientras tanto, el locus más próximo en dirección 5' resultó ser homólogo a AT5G03900, situado a más de 22 Kb del ATG de *AtTFL1* (Figura C2.5), lo que indica una gran delección en esta región del genoma respecto a Arabidopsis. En resumen, nuestros resultados muestran que existe sintenia entre *C. bursa-pastoris* y Arabidopsis, tanto en 5' (aunque afectada por una delección) como en 3', lo que confirma la ortología entre *CbTFL1* y *AtTFL1*.



**Figura C2.4. Estudios comparativos realizados para demostrar que *CbTFL1* y *BrTFL1* son ortólogos de *TFL1*.** **A)** Comparación de la estructura y secuencia (a nivel de nucleótidos) de los genes *AiTFL1*, *CbTFL1*, *BrTFL1* y *LcTFL1* respecto a *AtTFL1*. Los exones se representan como rectángulos y los intrones como líneas. El porcentaje de identidad de cada exón o intrón respecto a *AtTFL1* aparece indicado. **B)** Árbol filogenético sin raíz construido a partir de las secuencias codificantes de los genes *AtTFL1*, *AiTFL1*, *CbTFL1*, *BrTFL1*, *LcTFL1* y los miembros de la familia génica *FT-TFL1* de *Arabidopsis*. **C)** Árbol filogenético sin raíz construido a partir de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *AtTFL1*, *AiTFL1*, *CbTFL1*, *BrTFL1*, *LcTFL1* y los miembros de la familia *FT-TFL1* de *Arabidopsis*. *AtTFL1*: *A. thaliana* (*Ler*) *TFL1*; *AiTFL1*: *A. lyrata* *TFL1*; *CbTFL1*: *C. bursa-pastoris* *TFL1*; *BrTFL1*: *B. rapa* *TFL1*; *LcTFL1*: *L. crassa* *TFL1*.

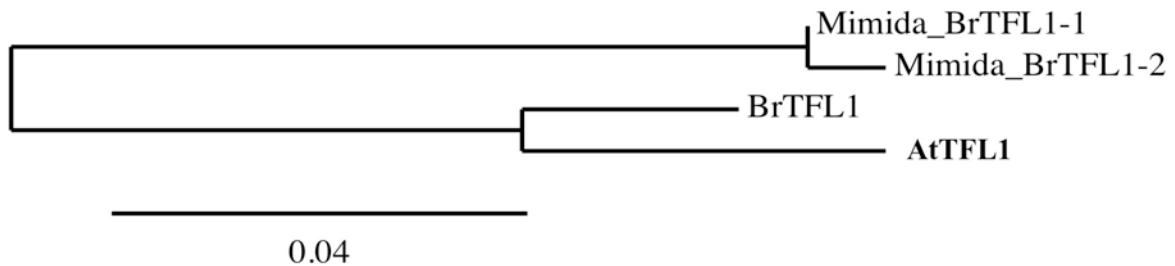
## 1.2. Identificación del ortólogo de *TFL1* de *Brassica rapa* y secuenciación de la región genómica correspondiente

Gracias a la existencia de gran cantidad de datos de el genoma de especies del género *Brassica*, accesible a través de la herramienta GBrowse (TAIR), fue posible identificar varios BACs (cromosomas artificiales de bacteria) de *B. rapa* que contenían el equivalente a la región del genoma de *Arabidopsis* donde se encuentran *TFL1* y sus genes colindantes. La determinación de la secuencia de parte de uno de estos BACs, concretamente el KBrH 96B10, mediante la misma estrategia descrita anteriormente para *C. bursa-pastoris* (Figura C2.3), permitió identificar un gen con un alto grado de homología a *AtTFL1* al que denominamos *BrTFL1*. *BrTFL1* está constituido por cuatro exones y tres intrones y codifica una proteína con un 92% de identidad respecto a la proteína *AtTFL1* (Figura C2.4). El análisis filogenético de la secuencia de *BrTFL1* junto con la de otros ortólogos de *TFL1* y los miembros de la familia *FT-TFL1* de *Arabidopsis* indicó que *BrTFL1* es el ortólogo de *TFL1* en *B. rapa* (Figura C2.4). Posteriormente, tras la secuenciación de la región codificante y de sus regiones flanqueantes, la existencia de sintenia con *Arabidopsis*, tanto en 5' como en 3' (Figura C2.5), confirmó esta afirmación.



**Figura C2.5. Sintenia entre las regiones genómicas de los ortólogos de *TFL1* en las distintas especies de brasicáceas empleadas para este estudio.** Esta figura resume la conservación de los genes (representados por flechas) situados en 5' y 3' de *TFL1* en las cinco especies de brasicáceas utilizadas. Los genes ortólogos entre sí aparecen con el mismo color en las diferentes especies. Las distancias indicadas son entre el ortólogo de *AtTFL1* y el gen adyacente localizado en 5' o 3' (sin considerar la sORF). Las líneas oblicuas indican un salto de distancia fuera de escala. *AtTFL1*: *A. thaliana* (Ler) *TFL1*; *AiTFL1*: *A. lyrata* *TFL1*; *CbTFL1*: *C. bursa-pastoris* *TFL1*; *BrTFL1*: *B. rapa* *TFL1*; *LcTFL1*: *L. crassa* *TFL1*; sORF: At5g03837.

Previamente a nuestro estudio, se habían identificado como ortólogos de *TFL1* en *B.rapa* a otro grupo de genes distintos a *BrTFL1* (Mimida y Motoyoshi, 1999). Sin embargo, tal y como muestra el análisis filogenético (Figura C2.6), nuestros resultados ponen de manifiesto que *BrTFL1* se encuentra más próximo a *AtTFL1* que esos otros genes, permitiéndonos afirmar que *BrTFL1* es el ortólogo de *TFL1* de *B. rapa*.



**Figura C2.6. Análisis filogenético de los supuestos ortólogos de *TFL1* en *B. rapa*.** Árbol filogenético sin raíz estimado a partir del alineamiento de secuencias de las proteínas codificadas por los genes *AtTFL1*, *BrTFL1* y los supuestos ortólogos de *TFL1* en *B. rapa* identificados previamente por Mimida y Motoyoshi (1999).

Del mismo modo que se determinó la secuencia de la región del genoma que incluye a los ortólogos de *TFL1* en *B. rapa* y *C. bursa-pastoris*, se procedió a determinar la secuencia de la región equivalente en el ecotipo *Ler* de *Arabidopsis*. Para ello, se utilizó de nuevo la estrategia descrita en la Figura C2.3 B, utilizando como molde el plásmido PBSKTFL1, que contenía un fragmento genómico de 15.3 kb que comprende a *AtTFL1*, procedente de una genoteca del ecotipo *Ler* (Serrano-Mislata, 2010). Además de las secuencias de *Arabidopsis* (*Ler*), *B. rapa* y *C. bursa-pastoris*, también tuvimos a nuestra disposición las secuencias de las regiones genómicas que comprenden a los ortólogos de *TFL1* en *L. crassa* (gracias al Dr. D. Baum) y *A. lyrata* (proveniente de una base de datos accesible desde el TAIR). De este modo contamos con secuencias de ortólogos de 5 especies de brasicáceas para el estudio comparativo de la región genómica que contiene al gen *TFL1*.

## 2. Estudio comparativo de la región genómica de *TFL1* en diferentes especies de brasicáceas. Identificación de regiones conservadas

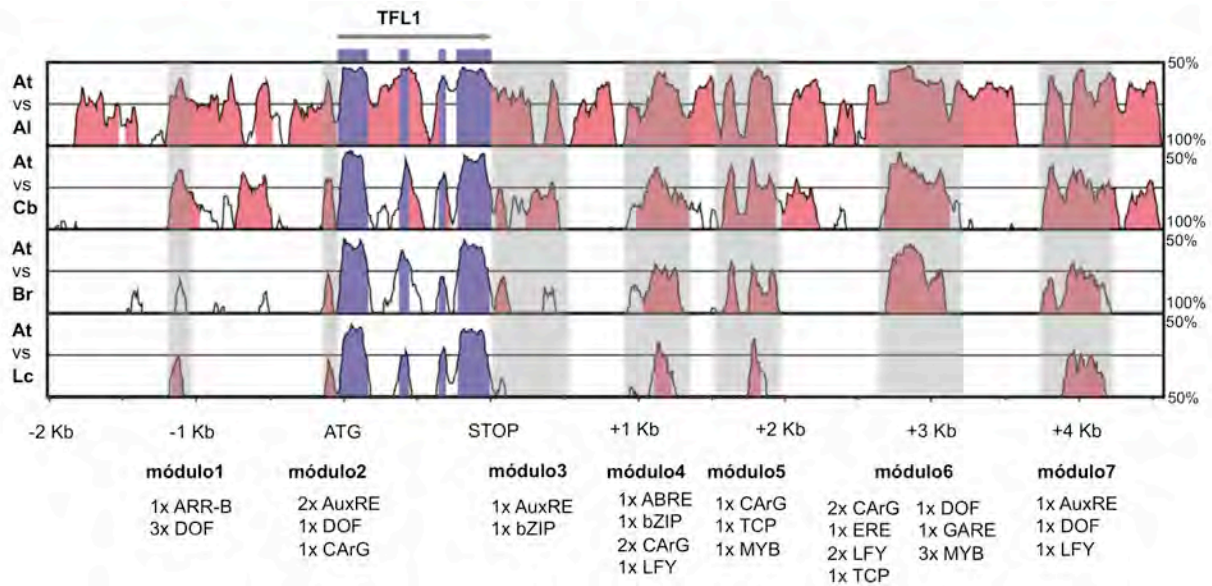
Una vez determinadas las secuencias de las regiones del genoma donde se encuentran los genes *TFL1* de estas cinco especies de brasicáceas, el siguiente paso consistió en el análisis de las mismas mediante el empleo de herramientas de genómica comparativa para, en primer lugar, identificar regiones conservadas y, posteriormente, buscar en ellas posibles sitios de unión a factores de transcripción que nos sugirieran posibles elementos clave en la regulación de *AtTFL1*.

La principal herramienta que hemos empleado ha sido el programa informático VISTA, un paquete de programas y bases de datos para el alineamiento y análisis comparativo de secuencias genómicas de múltiples especies (Dubchak *et al.*, 2000; Frazer *et al.*, 2004). En nuestro estudio, pese a haber alineado toda la región genómica que engloba a *TFL1* en las diferentes especies de brasicáceas, nos centraremos principalmente en el análisis de las secuencias 5' y 3' no codificantes (5'NCS y 3'NCS). La razón por la que no hemos analizado a fondo los exones e intrones de los diferentes ortólogos de *TFL1* utilizados en este trabajo es que estos parecen no ser esenciales para el control de la expresión de *AtTFL1*. Datos que apoyan esta idea son el hecho de que el gen delator *GUS* flanqueado por las regiones 5' y 3' de *AtTFL1*, reproduce totalmente el patrón de expresión espacio temporal de *AtTFL1* y que una construcción con el cDNA de *AtTFL1* flanqueado por dichas regiones es capaz de complementar al mutante *tfl1-1* (Serrano-Mislata, 2010). De todas formas, se incluye información del estudio comparativo de los exones e intrones de los ortólogos de *TFL1* entre las diferentes especies de brasicáceas en la Figura C2.7 y en el alineamiento S1.

Una primera conclusión que se deriva de la comparación de las secuencias de la 5'NCS y la 3'NCS de los cinco ortólogos es que el grado de conservación es superior en la 3'NCS que en la 5'NCS (Figura C2.7). Por otra parte, la comparación de secuencias condujo a la identificación de siete regiones altamente conservadas, la mayoría de las cuales coincidían con regiones importantes para la regulación de *AtTFL1* previamente identificadas en nuestro laboratorio en un análisis por deleciones del promotor de *AtTFL1* (Serrano-Mislata, 2010). Por este motivo, decidimos denominar módulos a estas regiones conservadas, resaltando así su similitud con los módulos reguladores (Arnone y Davidson, 1997; Priest *et al.*, 2009). La localización de estos siete módulos (módulo 1-módulo 7), fue tanto en la 5'NCS, módulos 1 y 2; como en la 3'NCS, módulos 3 a 7; (Figura C2.7. y alineamientos S2 y S3).

Dentro de los módulos conservados, mediante el uso de herramientas informáticas como rVISTA, que compara las regiones conservadas identificada por VISTA contra una base de datos propia de TFBSs de plantas (Loots *et al.*, 2002), como PLACE, una base de datos de TFBSs de plantas que permite la búsqueda de estos motivos en una secuencia facilitada por el usuario (Higo *et al.*, 1999) y la búsqueda de las secuencias de diferentes TFBSs publicados en la bibliografía, se pudieron predecir numerosos TFBSs, los cuales se muestran en la Figura C2.7 y en los Alineamientos S2 y S3 del material suplementario. Durante esta búsqueda, se incidió especialmente en los sitios de unión de aquellos factores de transcripción que podían ser potenciales reguladores de *TFL1*, como los miembros de la familia MADS, LFY, WUSCHEL (WUS) o factores de transcripción de la familia TEOSINTE/BRANCHED/CYCLOIDEA/PCF (TCP). El listado completo de todos los sitios hallados para los factores de transcripción MADS, LFY, WUS y TCP en las secuencias 5'NCS y 3'NCS de *AtTFL1* puede verse en la Tabla C2.1.





**Figura C2.7. Comparación de la región genómica de *TFL1* de *Arabidopsis*, *A. lyrata*, *C. bursa-pastoris*, *B. rapa* y *L. crassa* mediante el programa VISTA.** El análisis compara por parejas la secuencia de *Arabidopsis* (Ler) con las de las otras cuatro especies de brassicáceas. En el eje de ordenadas aparece el grado de homología con la secuencia de *Arabidopsis* (expresado en %) y en el eje de abscisas la posición en Kb respecto al codón de inicio o de parada de *Arabidopsis*. Nótese que por los parámetros seleccionados al utilizar el programa VISTA, en el gráfico sólo aparecen representadas aquellas regiones de más de 100 pb con una homología superior al 50% respecto a *Arabidopsis*. Dentro de estas regiones, aquellas con una homología superior al 75% se destacan en color rosa, mientras que el resto quedan en color blanco. Esta descripción no es válida para los exones que independientemente de su grado de homología aparecen siempre en color azul. Los siete módulos conservados identificados en este análisis (módulo1-módulo7) están sombreados en gris. Dentro de cada módulo se rastreó la existencia de posibles sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) recogidos en bases de datos o en la bibliografía. Debajo de cada módulo se muestra el nombre de los TFBS detectados y el número de veces en que aparecen, siempre y cuando estuvieran conservados en al menos tres de las cinco especies comparadas.

El módulo 1, en *Arabidopsis* (*Ler*), se localiza en la 5'NCS, entre -1.1 Kb y -0.9Kb del ATG. En él se encontraron conservados dos posibles sitios de unión a factores de transcripción de la familia DOF y un sitio de unión de factores de transcripción ARR-B ("type B *Arabidopsis* Response Regulators"). Las proteínas DOF están implicadas en procesos de desarrollo y crecimiento de la planta, especialmente relacionadas con el reloj circadiano (Imaizumi *et al.*, 2005; Yanagisawa, 2002), mientras que miembros de la familia ARR-B actúan en la transducción de la señal de las citocinas (Imamura *et al.*, 2001).

El módulo 2, se sitúa en *Arabidopsis* (*Ler*) en la 5'NCS y comprende las 100 pb anteriores al ATG, incluyendo la 5'UTR, dentro de una región previamente identificada como importante por el análisis de deleciones llevado a cabo en nuestro laboratorio (Serrano-Mislata, 2010). En él se encuentran dos elementos de respuesta a auxinas (AuxRE), un sitio de unión DOF y una caja CArG (sitio de unión de factores de transcripción de la familia MADS). En todos los casos, el grado de conservación en las distintas especies fue alto, especialmente para la caja CArG, a -79 pb en *Arabidopsis* (*Ler*), que coincide con la caja TATA.

El módulo 3, en *Arabidopsis (Ler)* se encuentra en la 3'NCS. Comprende las 500 pb posteriores al codón de parada, incluye la 3'UTR y coincide con una región previamente identificada en nuestro laboratorio como importante para la regulación de *AtTFL1* (Serrano-Mislata, 2010). En *B. rapa* y *L. crassa* sólo la 3'UTR parece estar conservada. Según las búsquedas realizadas, este módulo contiene un posible sitio de unión de factores de transcripción de la familia bZIP (implicados en procesos de estrés, respuesta a patógenos, luz, estrés y desarrollo) (Jakoby *et al.*, 2002), un AuxRE y dos cajas CArG poco conservadas entre las especies de brasicáceas utilizadas en este estudio. Además, a +384 pb respecto a la secuencia de *Arabidopsis (Ler)*, existe una secuencia TTCTGGTCAA que también se encuentra conservada en la 3'NCS de *Antirrhinum majus* y *Vitis vinifera*, aunque no hemos podido asociarla con ningún TFBS conocido.

El módulo 4, localizado en *Arabidopsis (Ler)* entre +0.9 Kb y +1.3 Kb de la 3'NCS, también coincide con una región previamente identificada como importante en nuestro laboratorio (Serrano-Mislata, 2010). Dentro de él se han encontrado cinco posibles TFBSs, todos ellos bien conservados entre las especies de brasicáceas comparadas, que corresponden a un elemento de respuesta a ABA (ABRE), un sitio de unión de factores bZIP, un sitio de unión de LFY y dos cajas CArG.

El módulo 5 en *Arabidopsis (Ler)* se encuentra en la 3'NCS, entre +1.5 Kb y +2.0 Kb y también está dentro de una región previamente identificada en nuestro laboratorio como importante para la regulación de *AtTFL1* (Serrano-Mislata, 2010). Este módulo podría reducirse todavía más a un núcleo de 175 pb, entre +1740 pb y +1914 respecto a la secuencia de *Arabidopsis (Ler)*, que sería la región que se encuentra perfectamente conservada entre las cinco brasicáceas utilizadas y que contiene tres posibles dianas de factores de transcripción bien conservadas. Se trata de un sitio de unión de factores de la familia TCP, algunos de cuyos miembros están implicados en el desarrollo de yemas axilares (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007), un motivo de unión de factores MYB (Martin y Paz-Ares, 1997) y una CArG implicada en la unión de AP1 (Kaufmann *et al.*, 2010). Fuera de este núcleo pero dentro del módulo se encuentran otras dos posibles CArG pobremente conservadas.

El módulo 6 en *Arabidopsis (Ler)* se encuentra en la región de la 3'NCS, situado entre +2.6 y +3.2 Kb y no está conservado en *L. crassa*. Además, es el módulo en el que más posibles TFBSs aparecen, un total de catorce, e incluye una región de las previamente identificadas como importantes por nuestro grupo (Serrano-Mislata, 2010). De los catorce posibles TFBSs, todos menos uno están conservados en al menos tres de las cinco especies comparadas. Este módulo contiene cuatro cajas CArG, tres sitios MYB, dos sitios LFY, un sitio DOF y otro TCP, así como un elemento de respuesta a etileno (ERE) y un elemento de respuesta a giberelinas (GARE). Además, también contiene la secuencia TACATTTA (caja SAM-L1) que coincide con una caja identificada en el promotor de los genes de *Arabidopsis* que se expresan en la capa L1 del SAM y a la que se une el factor de transcripción ATML1 (Abe *et al.*, 2001).

El último módulo conservado identificado, el módulo 7, en *Arabidopsis* (*Ler*) se localiza entre +3.8 Kb y +4.3 Kb y es el único módulo de la 3'NCS que no coincide con ninguna región identificada como importante para la regulación de *AtTFL1* (Serrano-Mislata, 2010). Este módulo incluye un sitio DOF, un AuxRE y un sitio LFY conservados además de un sitio LFY sólo presente en *Arabidopsis*.

En resumen, la comparación de las secuencias 5' y 3' no codificantes de las cinco especies de brassicáceas utilizadas en el presente estudio ha permitido la identificación de siete módulos de secuencia conservada, la mayoría en la 3'NCS, que posiblemente sean importantes para la regulación de *AtTFL1*. El hecho de que cinco de ellos solapen total o parcialmente con regiones identificadas como claves en la regulación de *AtTFL1* en un análisis de deleciones del promotor de *AtTFL1* (Serrano-Mislata, 2010) refuerza esta hipótesis. Además, dentro de estas regiones existen secuencias concretas conservadas que coinciden con los consensos de numerosos TFBSs. Esto nos ha permitido elaborar una lista de factores de transcripción candidatos a regular la expresión de *AtTFL1* (Figura C2.7).

**Tabla C2.1 Posibles sitios de unión de factores de transcripción MADS, LFY, WUS y TCP candidatos a regular a *AtTFL1***

Motivo <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup>	Ubicación <sup>c</sup>
<b>Caja CArG</b> (CHW <sub>6</sub> DG)	CAAATTAAG	-1688 pb en 5'
	CAATTATATG	-609 pb en 5'
	CTAAAATAAG	-276 pb en 5'
	<u>CTATAAATAG</u>	-79 pb en 5' (módulo 2)
	CTTTTTTTAG	+374 pb en 3' (módulo 3)
	CTAAAATATG	+417 pb en 3' (módulo 3)
	<u>CATTAATAATG</u>	+832 pb en 3'
	<u>CCATTTTGGG</u>	+1009 pb en 3' (módulo 4)
	CATAGTTTGG	+1281 pb en 3' (módulo 4)
	CATTATATAG	+1737 pb en 3' (módulo 5)
	<u>CCACTTATGG</u>	+1793 pb en 3' (módulo 5)
	CAAAATTTTG	+1931 pb en 3' (módulo 5)
	<u>CTTTTTATAG</u>	+2138 pb en 3'
	CAAAAATTTG	+2228 pb en 3'
	CAAAAATTAG	+2262 pb en 3' (módulo 6)
	<u>CGATTAAG</u>	+2890 pb en 3' (módulo 6)
	CATAGAAAGG	+3037 pb en 3' (módulo 6)
	<u>CTAAATTTGA</u>	+3051 pb en 3' (módulo 6)
	<u>CAACATAAG</u>	+3146 pb en 3' (módulo 6)
	CATAATATTG	+3261 pb en 3'
CAAAAAAAGG	+3282 pb en 3'	
<b>Sitio de unión de LFY</b> (CCANTG)	<u>CCAATG</u>	+391 pb en 5'
	<u>CCACTG</u>	+1135 pb en 3' (módulo 4)
	<u>CCACTG</u>	+2827 pb en 3' (módulo 6)
	CCAATG	+4133 pb en 3'
	<u>CCACTG</u>	+4143 pb en 3' (módulo 7)
<b>Sitio de unión de LFY</b> (Matriz de F. Parcy)	<u>GACTCTCGAGGACAAACCAA</u>	+4434 pb en 3' (módulo 7)
		+2855 pb en 3' (módulo 6)

<b>Sitio de unión de TCP</b>	GGGACCC	+548 pb en 3'
(GGNCCC)	<u>GGCCCC</u>	+1864 pb en 3' (módulo 5)
	<u>GGTCCC</u>	+3089 pb en 3' (módulo 6)
<b>Sitio de unión de WUS</b>	TTAATGG	-305 pb en 5'
(TTAATGG)	TTAATGG	+810 pb en 3'

<sup>a</sup> Nombre del sitio de unión, en **negrita**, y secuencia consenso rastreada, entre paréntesis. <sup>b</sup> Secuencia del sitio de unión encontrado en las regiones intergénicas 5' y 3' de *TFL1*. Subrayadas, aquellas secuencias conservadas en al menos tres de las cinco especies comparadas. <sup>c</sup> Distancia en pares de bases respecto al codón de inicio ATG (en 5') o al condón de STOP (en 3') del gen *TFL1* de Arabidopsis, ecotipo Ler. En paréntesis se indica si el motivo está dentro de alguna de los módulos conservados identificadas por VISTA. H=A/C/T; W=A/T; D=A/G/T y N=A/T/C/G.



## CAPÍTULO 3





## Identificación de factores de transcripción candidatos a regular a *TFL1* mediante la unión directa a su promotor

*TFL1* juega un importante papel en el control de la arquitectura en *Arabidopsis*, sin embargo, se conoce poco sobre cómo se regula su expresión. Por este motivo, uno de los objetivos de este trabajo ha sido la identificación de factores de transcripción que se unen al promotor de este gen para controlar su expresión. En el capítulo anterior, el análisis bioinformático del promotor de *TFL1* delimitó siete regiones (módulos 1-7) potencialmente claves para la regulación del gen que se encuentran conservadas entre los promotores de ortólogos de *TFL1* en diferentes especies de brasicáceas (Figura C2.7).

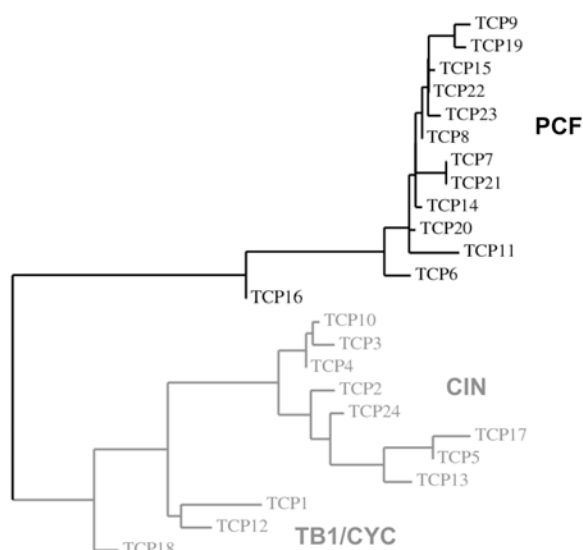
En paralelo, el análisis por deleciones del promotor de *TFL1* mostró que la mayor parte de los elementos necesarios para su correcto patrón de expresión espacio temporal se localizaban en el 3' (Serrano-Mislata, 2010) y se identificaron dos regiones de especial relevancia que además, coincidían con módulos conservados en el estudio informático (Figura C2.7). La primera región, situada entre +1.0 Kb y +1.3 Kb del codón de parada de *TFL1* (módulo 4), juega un papel en el tiempo de floración y la identidad de los meristemos axilares, mientras que la segunda región, localizada entre +2.8 Kb y +3.2 Kb (módulo 6), es clave para la expresión de *TFL1* en el meristemo inflorescente. El análisis informático predijo en ambas regiones varios sitios de unión a factores de transcripción que se encuentran conservados entre las distintas especies de brasicáceas (Figura C2.7 y Tabla C2.1). De entre todos ellos, destacan dos: las cajas CARG, presentes en ambas regiones, y un sitio de unión de factores de transcripción de la familia TCP, situado en la región 2.8-3.2 Kb y que tiene la particularidad de estar conservado sólo en aquellas especies de brasicáceas que presentaban la misma arquitectura de la inflorescencia que *Arabidopsis* (Alineamiento S3 del material suplementario).

Para *TFL1* sólo se conoce la unión directa de dos factores de transcripción a su promotor, concretamente, LFY y AP1 (Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011). Por otra parte, datos genéticos sugieren que, al igual que AP1, otros factores de la familia MADS, como FUL, SOC1, AGL24, FLC y SVP podrían ser reguladores de la expresión de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010).

Los TCPs constituyen una familia de factores de transcripción específicos de plantas que parecen haber tenido un papel determinante durante la evolución de la morfología de las plantas (Cubas *et al.*, 1999). El nombre de la familia deriva de los nombres de sus miembros fundadores, *TEOSINTE BRANCHEDI (TBI)* de *Zea mais* (Doebley *et al.*, 1997), *CYCLOIDEA (CYC)* de *Antirrhinum majus* (Luo *et al.*, 1996) y los *PROLIFERATING CELL FACTORS (PCFs)* de *Oryza sativa* (Kosugi y Ohashi, 1997), todos ellos implicados en el control del crecimiento y proliferación celular de órganos laterales. Aunque durante la evolución, la familia TCP ha sufrido procesos de duplicación génica (en *Arabidopsis* se han predicho 24 genes), todos sus miembros comparten una región homóloga de aproximadamente 60 aminoácidos, situada cerca

del extremo N-terminal, que se conoce con el nombre de dominio TCP (Martín-Trillo, 2004). El dominio TCP presenta una estructura secundaria predicha del tipo *basic helix-loop-helix* (bHLH) (Cubas *et al.*, 1999) que es esencial para la dimerización y unión al DNA (Kosugi y Ohashi, 1997; Aggarwal *et al.*, 2010).

En base a diferencias en el dominio TCP, las proteínas TCP pueden ser agrupadas en dos clases diferentes para las que, además, se han propuesto funciones opuestas durante el desarrollo de los órganos laterales de la planta (Figura C3.1; Martín-Trillo y Cubas, 2010). La clase I o PCF, representada por las proteínas PCF1 y PCF2 de arroz, está relacionada con la promoción del crecimiento celular, al existir ejemplos de factores de transcripción de esta clase que actúan como activadores de genes relacionados con la maquinaria de división celular y la biosíntesis de proteínas (Kosugi y Ohashi, 1997; Trémousaygue *et al.*, 2003; Tatematsu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006; Tatematsu *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2009; Giraud *et al.*, 2010).



**Figura C3.1. La familia TCP.** Árbol consenso sin raíz mostrando las relaciones filogenéticas de las proteínas TCP de Arabidopsis. En negro aparece la clase I o clado PCF y en gris la clase II, dividida a su vez en los clados TB1/CYC y CIN.

Por el contrario, la clase II, a su vez dividida en los clados CIN y CYC/TB1, se ha relacionado con un efecto negativo sobre el crecimiento celular. El clado CIN, ejemplificado por CINCINNATA (CIN) de *Antirrhinum* (Nath *et al.*, 2003), comprende factores implicados en el desarrollo de órganos laterales, principalmente hojas (Palatnik *et al.*, 2003; Koyama *et al.*, 2007; Schommer *et al.*, 2008), y su efecto negativo sobre el crecimiento celular se debe a que promueven la diferenciación celular en aquellos tejidos donde se expresa (Efroni *et al.*, 2008). Cabe destacar que existe un grupo de genes tipo *CIN* que presentan en su secuencia un sitio reconocido por miRNAs de la familia MIR319, por los que son regulados (Palatnik *et al.*, 2003). De forma similar, las proteínas del clado CYC/TB1 están implicadas en la inhibición del crecimiento de yemas laterales, como es el caso de TB1 de maíz (Doebley *et al.*, 1997) y BRANCHED1 (BRC1) de Arabidopsis (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007), o de órganos florales,

como sucede con CYC que se requiere para la generación de un patrón dorsoventral asimétrico en la flor de *Antirrhinum* (Luo *et al.*, 1996).

Por último, los factores de transcripción TCP también parecen implicados en otros procesos diferentes al del desarrollo de órganos laterales (Tabla C3.1), como por ejemplo, embriogénesis (Ruuska *et al.*, 2002; Pagnussat *et al.*, 2005), gametogénesis (Takeda *et al.*, 2006), fotomorfogénesis (López-Juez *et al.*, 2008), senescencia (Schommer *et al.*, 2008) y el funcionamiento del reloj circadiano (Pruneda-Paz *et al.*, 2009; Giraud *et al.*, 2010). En resumen, la familia TCP ejerce un papel destacado en diferentes procesos de desarrollo en *Arabidopsis*.

**Tabla C3.1. Resumen de las funciones descritas para los TCPs de *Arabidopsis***

Código TAIR <sup>a</sup>	Nombre <sup>b</sup>	Clase <sup>c</sup>	Función <sup>d</sup>	Referencia <sup>e</sup>
At1g67260	TCP1	CYC/TB1	Morfología flor	(Cubas, 2001)
At4g18390	TCP2	CIN	Desarrollo hoja	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003; Schommer <i>et al.</i> , 2008; Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At1g53230	TCP3	CIN	Desarrollo hoja, reloj circadiano	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003; Schommer <i>et al.</i> , 2008; Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At3g15030	TCP4	CIN	Desarrollo embrionario, hoja	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003; Pagnussat <i>et al.</i> , 2005; Schommer <i>et al.</i> , 2008)
At5g60970	TCP5	CIN	Fotomorfogénesis	(López-Juez <i>et al.</i> , 2008)
At5g41030	TCP6	PCF	Desconocida	
At5g23280	TCP7	PCF	Desconocida	
At1g58100	TCP8	PCF	Desconocida	
At2g45680	TCP9	PCF	Fotomorfogénesis, metabolismo	(Ruuska <i>et al.</i> , 2002; López-Juez <i>et al.</i> , 2008)
At2g31070	TCP10	CIN	Desarrollo hoja	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003; Schommer <i>et al.</i> , 2008)
At2g37000	TCP11	PCF	Reloj circadiano	(Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At1g68800	TCP12	CYC/TB1	Ramificación	(Aguilar-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
At3g02150	TCP13	CIN	Síntesis de proteínas, metabolismo	(Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At3g47620	TCP14	PCF	Germinación, síntesis de proteínas	(Tatematsu <i>et al.</i> , 2008; Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At1g69690	TCP15	PCF	Reloj circadiano	(Giraud <i>et al.</i> , 2010)
At3g45150	TCP16	PCF	Desarrollo polen	(Takeda <i>et al.</i> , 2006)

At5g08070	TCP17	CIN	Desconocida	
At3g18550	TCP18	CYC/TB1	Ramificación	(Aguilar-Martinez <i>et al.</i> , 2007)
At5g51910	TCP19	PCF	Desconocida	
At3g27010	TCP20	PCF	Síntesis de proteínas, división, crecimiento y expansión celular	(Li <i>et al.</i> , 2005; Hervé <i>et al.</i> , 2009)
At5g08330	TCP21	PCF	Reloj circadiano	(Pruneda-Paz <i>et al.</i> , 2009)
At1g72010	TCP22	PCF	Desconocida	
At1g35560	TCP23	PCF	Desconocida	
At1g30210	TCP24	CIN	Desarrollo hojas	(Palatnik <i>et al.</i> , 2003; Schommer <i>et al.</i> , 2008)

<sup>a</sup> Código identificativo del locus en el TAIR. <sup>b</sup> Nombre del factor de transcripción TCP. <sup>c</sup> Clado de la familia TCP al que pertenece el gen. <sup>d</sup> Función con la que ha sido relacionado. <sup>e</sup> Bibliografía donde se cita la función del gen.

A continuación, se describe la identificación de tres factores de transcripción, pertenecientes a las familias MADS, TCP y Zinc Finger, candidatos a regular la expresión de *TFL1* al ser capaces de unirse a regiones clave del promotor de *TFL1* en ensayos de híbrido simple.

## 1. Identificación de factores de transcripción que interaccionan con regiones reguladoras de *TFL1*

Con el fin de identificar factores de transcripción capaces de interaccionar con el promotor de *TFL1*, se utilizaron las regiones 1.0-1.3 Kb y 2.8-3.2 Kb de la 3'NCS de *TFL1* (de aquí en adelante 1.0-1.3TFL1pro y 2.8-3.2TFL1pro) para llevar a cabo el escrutinio de dos genotecas de cDNA diferentes en ensayos de híbrido simple (Li y Herskowitz, 1993; Wang y Reed, 1993). Por un lado, se utilizó una genoteca de cDNA procedente de una mezcla de todos los tejidos de *Arabidopsis* y, por otro, una genoteca formada por dímeros de factores de transcripción de la familia MADS.

### 1.1. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de MADS con regiones reguladoras del promotor de *TFL1*

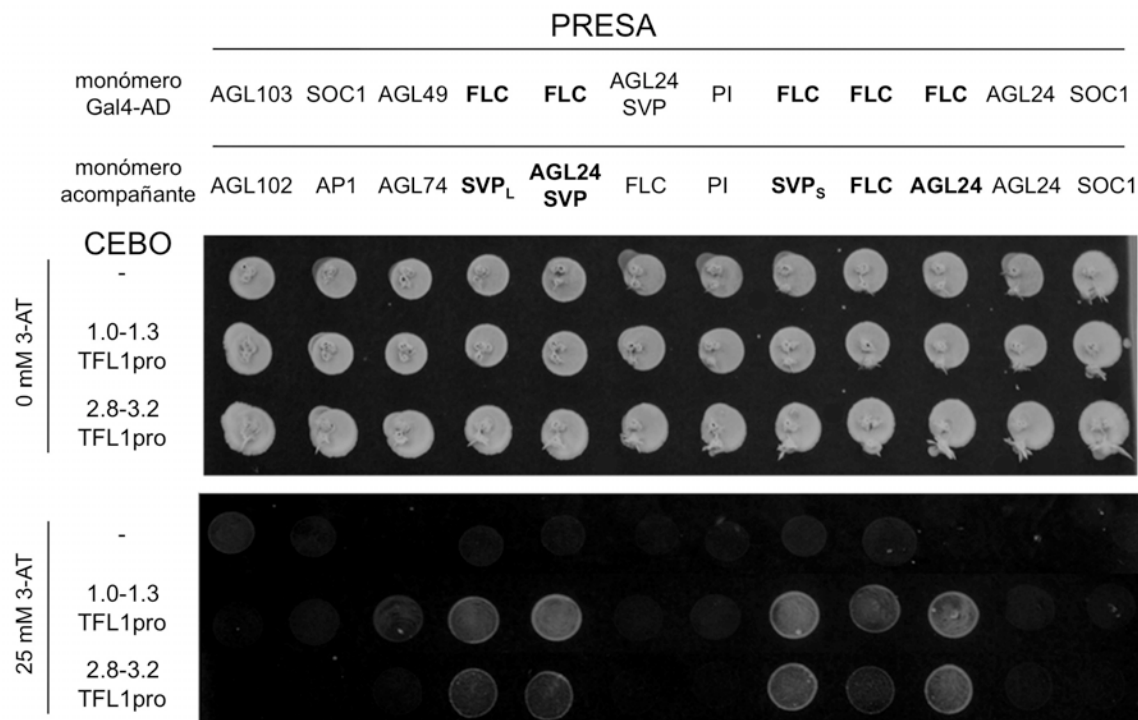
La existencia de varias cajas CArG conservadas en las regiones 1.0-1.3TFL1pro y 2.8-3.2TFL1pro, sugería que uno o varios factores de transcripción de la familia MADS podrían ser capaces de interaccionar con ellas. Debido a que los factores MADS nunca actúan en forma de monómeros aislados (Riechmann *et al.*, 1996; West *et al.*, 1998), para el escrutinio de híbrido

simple se utilizó la genoteca de dímeros de proteínas MADS construida en el laboratorio del Dr. G. Angenent (PRI, Países Bajos) que consta de 340 dímeros formados por combinaciones de 75 factores de transcripción pertenecientes a la familia MADS. Para cada dímero, sólo uno de los dos monómeros se encuentra fusionado al dominio de activación del factor de transcripción Gal4 (Gal4-AD) de levadura (Ciannamea *et al.*, 2006; Immink *et al.*, 2009).

Para investigar la capacidad de unión de factores de transcripción MADS al promotor de *TFL1*, las regiones 1.0-1.3*TFL1*pro y 2.8-3.2*TFL1*pro se fusionaron al gen delator de síntesis de histidina *HIS3* del vector pINT-His-3B y se integraron en el genoma de la cepa de levadura PJ69-4a. Por otro lado, la genoteca de dímeros de MADS estaba dentro de la cepa de levadura PJ69-4a. Para el escrutinio final, se procedió la conjugación entre ambas cepas y a la selección en medio selectivo sin histidina de los correspondientes clones positivos.

Los escrutinios realizados utilizando como cebo tanto el fragmento 1.0-1.3*TFL1*pro, como el 2.8-3.2*TFL1*pro, llevaron a la identificación de los mismos 5 clones positivos (Figura C3.2). En todos ellos, la proteína fusionada a Gal4-AD resultó ser FLC (Figura C3.2), indicando que FLC era capaz de unirse a las regiones 1.0-1.3*TFL1*pro y 2.8-3.2*TFL1*pro. Además, estos 5 clones eran los únicos, de entre los 340 clones que componen la genoteca, que contenían la fusión FLC:Gal4-AD. Este hecho refuerza la idea de que FLC es capaz de unirse al promotor de *TFL1*.

Estos resultados concuerdan con observaciones realizadas anteriormente en nuestro laboratorio, que mostraron cómo en plantas 35S::FLC la señal del gen reportero *TFL1*pro::GUS desaparecía del meristemo apical de plantas adultas (Serrano-Mislata, 2010). Por este motivo, para profundizar en la posible interacción entre FLC y el promotor de *TFL1* se recurrió a experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que fueron llevados a cabo en colaboración con el Dr. C. Helliwell (CSIRO, Australia). En estos ensayos se intentó comprobar si había enriquecimiento de las regiones 1.0-1.3*TFL1*pro y 2.8-3.2*TFL1*pro en la cromatina que precipita con anticuerpos contra FLC. Para ello se utilizaron muestras procedente de hojas y ápices de plántulas con actividad FLC (35S::FLC, C24 o Col FRI) o sin ella (*flc-3* o *flc-20*). Sin embargo, no pudimos obtener resultados claros que confirmaran la unión *in vivo* de FLC a esas regiones del promotor de *TFL1* (resultados no mostrados).



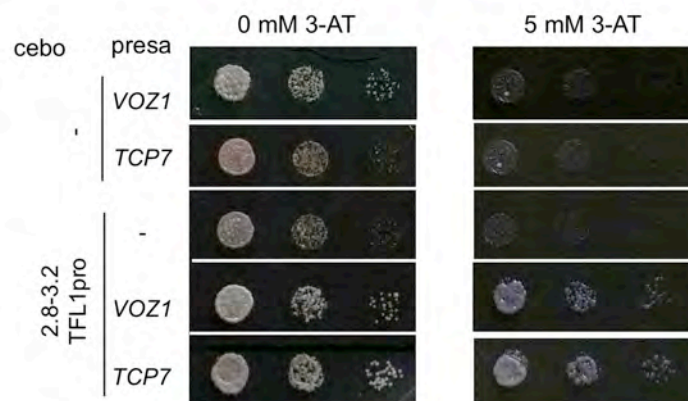
**Figura C3.2. FLC se une a las regiones 1-1.3TFL1pro y 2.8-3.2TFL1pro en ensayos de híbrido simple.** Crecimiento, en placas con 0 mM o 25 mM de 3-amino-trizol (3-AT), tras incubación a temperatura ambiente durante siete días, de los cinco únicos clones positivos del ensayo de híbrido simple (en negrita), junto a otros clones que resultaron negativos. Insertos en el vector cebo: -, vector cebo sin inserto (control negativo); 1.0-1.3 TFL1pro, región 1.0.-1.3 Kb. de la 3'NCS de *TFL1*; 2.8-3.2 TFL1pro, región 2.8.-3.2 Kb. de la 3'NCS de *TFL1*. La presa consta de dos monómeros de factores MADS, pero sólo uno de ellos fusionado a Gal4-AD. SVP<sub>L</sub> y SVP<sub>S</sub> se refieren a variantes de distinto tamaño de la proteína SVP por splicing alternativo. AGL24SVP se refiere a la fusión de diferentes dominios de las proteínas AGL24 y SVP<sub>L</sub> en una sola proteína. Más información en de Folter *et al.*, 2005; Ciannamea *et al.*, 2006; Immink *et al.*, 2009.

## 1.2. Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta completa con regiones reguladoras del promotor de *TFL1*

Para identificar más factores de transcripción, además de los de la familia MADS, que fuesen capaces de unirse al promotor de *TFL1*, se llevó a cabo un escrutinio de híbrido simple utilizando una genoteca de cDNA de una mezcla de todos los tejidos de Arabidopsis.

Para tal fin, el fragmento 2.8-3.2TFL1pro se fusionó al gen *HIS3* del vector pHISi y se integró en el genoma de la cepa de levadura Y187. Posteriormente, la cepa Y187 que contenía el fragmento del promotor de *TFL1* se conjugó con la cepa AH109 que contenía la genoteca de cDNA de planta completa en el vector pGADT7rec. En aquellas colonias que fueron capaces de crecer en medio sin histidina se procedió a aislar el plásmido de la genoteca y a secuenciar el fragmento incluido en el mismo. Varios de los clones positivos identificados contenían fragmentos de cDNA de los genes AT5G23280 y AT1G28520, que codifican factores de transcripción (Figura C3.3).

Debido a que el fragmento utilizado como cebo en este escrutinio era de un tamaño cercano a las 400 pb, en el límite de lo que se suele utilizar en los ensayos de híbrido simple, cabía la posibilidad de que un factor transcripción que se uniera al principio del fragmento 2.8-3.2TFL1pro, quedara demasiado alejado de la maquinaria basal de inicio de la transcripción, lo que puede impedir que interaccione con ella y que dé lugar a la consiguiente expresión del gen *HIS3*. Para evitar este problema, se decidió llevar a cabo en paralelo con el escrutinio anteriormente descrito, un segundo escrutinio en el que se utilizó como cebo el fragmento 2.8-3.2TFL1pro invertido.

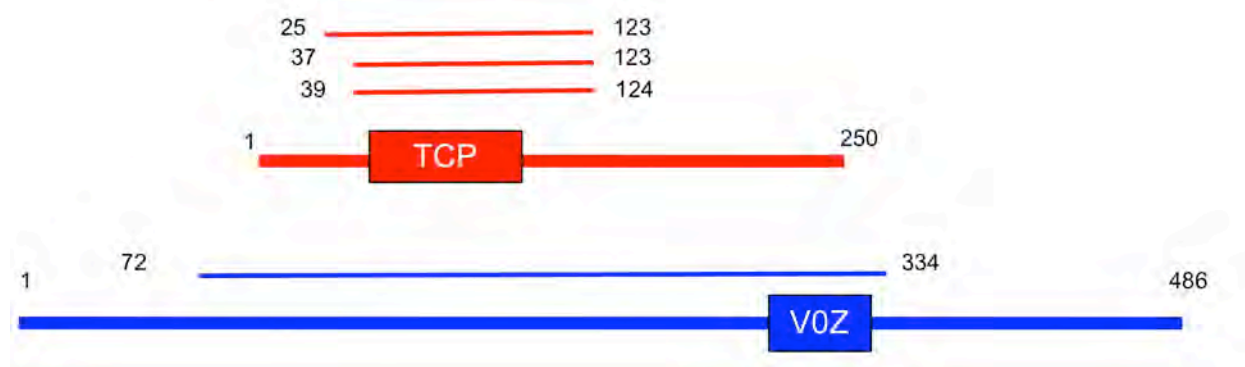


**Figura C3.3. TCP7 y VOZ1 se unen a la región 2.8-3.2TFL1pro en un ensayo de híbrido simple.** Crecimiento de los clones positivos en el ensayo de híbrido simple de la genoteca de cDNA de planta completa con la región 2.8-3.2TFL1pro. Los correspondientes clones de levadura se incubaron durante una semana a temperatura ambiente, en placas con 0mM o 5mM de 3AT. Insertos en el vector cebo: -, vector cebo sin inserto (control negativo); 2.8-3.2 TFL1pro, región 2.8.-3.2 Kb de la 3'NCS de *TFL1*. Insertos en el vector presa: -, vector presa sin inserto (control negativo); VOZ1 y TCP7.

El gen AT5G23280 se corresponde con *TCP7*, un gen de función desconocida que codifica un factor de transcripción de la familia TCP (Figura C3.1). Los clones de cDNA de *TCP7* identificados contenían insertos que codificaban tres fragmentos de la proteína *TCP7* que variaban en la longitud del extremo N-terminal, resultando en proteínas de 85, 86 y 98 aminoácidos respectivamente. Tal y como era de esperar, los tres clones contenían íntegro el dominio TCP (Figura C3.4), que es necesario para la unión al DNA (Kosugi and Ohashi, 1997). Asimismo, también se encontraron dos clones positivos de *TCP7* en el otro escrutinio realizado, utilizando como cebo el fragmento 2.8-3.2TFL1pro invertido (resultados no mostrados).

La otra proteína identificada con capacidad de unión al fragmento 2.8-3.2TFL1pro es la codificada por el gen AT1528520. Esta proteína se conoce con el nombre de ARABIDOPSIS VASCULAR ONE-ZINC FINGER 1 (VOZ1) y pertenece a una familia de factores de transcripción de plantas, con dos miembros en Arabidopsis, que presentan un dominio en común (dominio B) en el cual se ha predicho la formación de un dedo de zinc. El gen *VOZ1* se expresa en floema y fue identificado originalmente por la capacidad de la proteína que codifica de unirse en ensayos de híbrido simple al promotor del gen que codifica la bomba de protones V-PPasa de

la membrana de la vacuola (Mitsuda et al., 2004). En nuestro escrutinio mediante híbrido simple encontramos dos clones positivos para esta proteína. Ambos contenían el mismo fragmento del cDNA de *VOZI* (Figura C3.4). Además, también en este caso detectamos dos clones positivos adicionales para *VOZI* en el segundo escrutinio realizado utilizando como cebo el fragmento 2.8-3.2*TFLI*pro invertido (resultados no mostrados).



**Figura C3.4. Esquema de los clones positivos del escrutinio de híbrido simple con la genoteca de cDNA de planta completa.** En rojo y azul se representan las proteínas TCP7 y VOZ1, respectivamente. TCP, dominio TCP; VOZ, dedo de zinc dentro del dominio B característico de las proteínas VOZ. La líneas sobre las proteínas representan los clones de cDNA parciales que se identificaron en el escrutinio de híbrido simple de la genoteca de cDNA de planta completa con el 2.8-3.2*TFLI*pro. Se muestra la longitud en aminoácidos de cada fragmento representado. La numeración indica la posición del aminoácido inicial y final de cada polipéptido, denominando 1 a la metionina inicial de las proteínas completas.

Respecto a la secuencia del fragmento 2.8-3.2*TFLI*pro a la que se une VOZ1, no se identificó ningún sitio de unión putativo para proteínas de la familia VOZ (Mitsuda et al., 2004) en el análisis informático de ese fragmento del promotor de *TFLI*. En la actualidad, en nuestro laboratorio se continúa investigando la unión de VOZ1 al promotor de *TFLI* por medio de otras aproximaciones.

En resumen, hemos conseguido identificar tres factores de transcripción (FLC, TCP7 y VOZ1) que se unen en ensayos de híbrido simple a regiones reguladoras importantes del promotor de *TFLI*, siendo por tanto, candidatos a regular directamente la expresión de *TFLI*.

De entre ellos, decidimos continuar este trabajo con la caracterización del gen *TCP7*, ya que se desconoce su función y que varias proteínas de su familia están implicadas en el desarrollo de meristemos y órganos laterales, lo que posiblemente pueda relacionarse con *TFLI*. No obstante, en nuestro grupo se sigue investigando la posible regulación de *TFLI* por *FLC* y *VOZ1*.



## 2. Caracterización del gen *TCP7* de *Arabidopsis*

Desde el descubrimiento de los primeros miembros de la familia TCP en *Arabidopsis* hace más de una década (Cubas *et al.*, 1999), el conocimiento sobre los genes que componen esta familia ha aumentado considerablemente. En la actualidad, conocemos la función, al menos en parte, de 17 de los 24 genes *TCP* que existen en *Arabidopsis* (Tabla C3.1). Sin embargo, no se sabe prácticamente nada sobre *TCP7*.

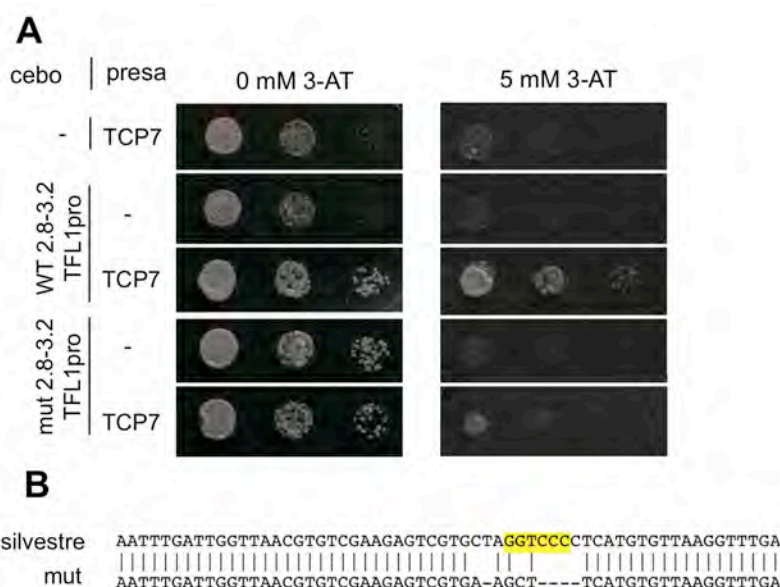
*TCP7* pertenece a la clase PCF y el gen con el que guarda más parecido es *TCP21* (82% de identidad entre las secuencias codificantes). De hecho, ambos genes surgieron por una duplicación reciente (Blanc *et al.*, 2003; Navaud *et al.*, 2007). Sin embargo, no parece que se trate de genes redundantes, al menos en lo que se refiere a la regulación del gen *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, uno de los componentes clave del reloj circadiano, proceso en el que participa *TCP21* (Pruneda-Paz *et al.*, 2009). Del mismo modo, estudios posteriores tampoco sugieren una posible función de *TCP7* en el reloj circadiano pese a que los niveles de su mensajero oscilan de forma circadiana (Giraud *et al.*, 2010).

A continuación, se presenta una caracterización de este gen que incluye el estudio de su patrón de expresión y el efecto que la alteración de su función tiene en *Arabidopsis*.

### 2.1. Unión de *TCP7* al promotor de *TFL1*

El análisis comparativo de las secuencias de las regiones no codificantes de los ortólogos de *TFL1* mostrado en el capítulo anterior, predijo la existencia de un posible sitio de unión de factores de transcripción de la familia TCP dentro del fragmento 2.8-3.2TFL1pro utilizado de cebo en el escrutinio mediante híbrido simple que identificó a *TCP7* (Tabla C2.1). La secuencia de esta caja de unión predicha para TCP coincide plenamente con el motivo de unión consenso GGNCCC descrito para los TCPs (Kosugi and Ohashi, 2002) y además, se encuentra conservada entre la mayoría de las especies de brassicáceas comparadas (Alineamiento S3). Cuando se realizó un ensayo de híbrido simple con un fragmento 2.8-3.2TFL1pro en el que se modificó la secuencia de esa caja TCP se perdió la interacción entre *TCP7* y el fragmento dicho fragmento (Figura C3.5), indicando que *TCP7* se une específicamente a esa caja.

Continuando con esta línea de la investigación, en colaboración con el Dr. J.A. Darós (IBMCP, Valencia) se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel utilizando proteína recombinante 6xHis:*TCP7* producida en *E. coli* y un fragmento de la región 2.8-3.2TFL1pro que contenía la posible caja de unión de TCP mutada o sin mutar. Sin embargo, en las condiciones ensayadas la proteína *TCP7* no discriminó entre la caja silvestre y la mutada, observándose la unión de la misma a ambos tipos de fragmentos (resultados no mostrados). Pese a este resultado no concluyente, los experimentos de híbrido simple descritos indican que *TCP7* es capaz de unirse al fragmento 2.8-3.2TFL1pro, probablemente, en la caja predicha en la posición +3089 pb.



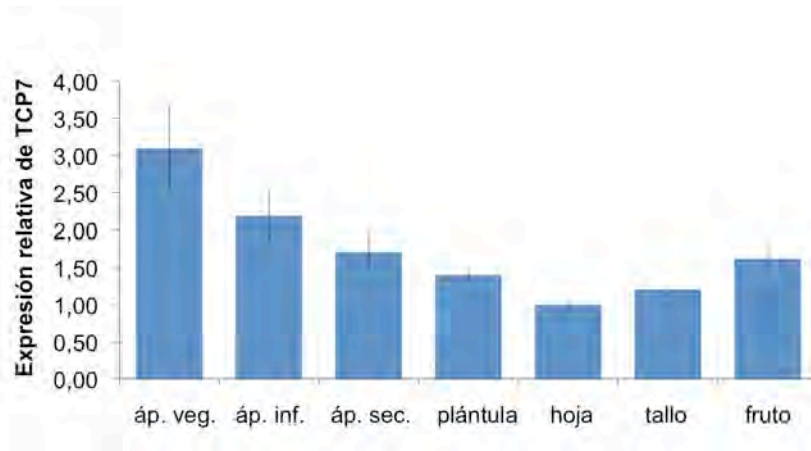
**Figura C3.5. TCP7 se une específicamente por híbrido simple a la caja TCP.** **A)** Efecto de la mutación de la caja de unión predicha para TCP en la unión de TCP7 a la región 2.8-3.2TFL1pro en un ensayo de híbrido simple de TCP7. Los correspondientes clones de levadura se incubaron durante una semana a temperatura ambiente en placas con 0mM ó 5mM de 3AT. Insertos en el vector cebo: -, vector cebo sin inserto (control negativo); WT2.8-3.2 TFL1pro, región 2.8.-3.2 Kb. de la 3'NCS de *TFL1*. mut2.8-3.2 TFL1pro, región 2.8.-3.2 Kb. de la 3'NCS de *TFL1* con el posible sitio de unión de TCP mutado. Insertos en el vector presa: -, vector presa sin inserto (control negativo) y TCP7. **B)** Mutación de la caja de unión predicha para TCP utilizada en (A). Sustitución del posible sitio de unión de TCP (señalado en amarillo) por la secuencia CTAAGGT, para generar la una versión mutada de la región 2.8-3.2TFL1pro.

## 2.2. Patrón de expresión de *TCP7*

El estudio del patrón de expresión de un gen desconocido es una herramienta de gran valor para obtener pistas sobre su posible función. En el caso de *TCP7*, de nuevo, se sabe poco acerca de cómo se expresa. Dado que su secuencia no ha sido incluida en la mayoría de micromatrices de DNA comerciales, no aparecen datos de su expresión en las bases de datos accesibles en la red (BAR, AVT y Geneinvestigator entre otras). La poca información de la que disponemos indica que su RNA se expresa en diferentes órganos de la planta como tallo, hoja y flor (Yao et al., 2007) y sus niveles de expresión varían con un ciclo circadiano, siendo sus niveles máximos al inicio del día y decayendo progresivamente hasta alcanzar su mínimo por la noche (Giraud et al., 2010).

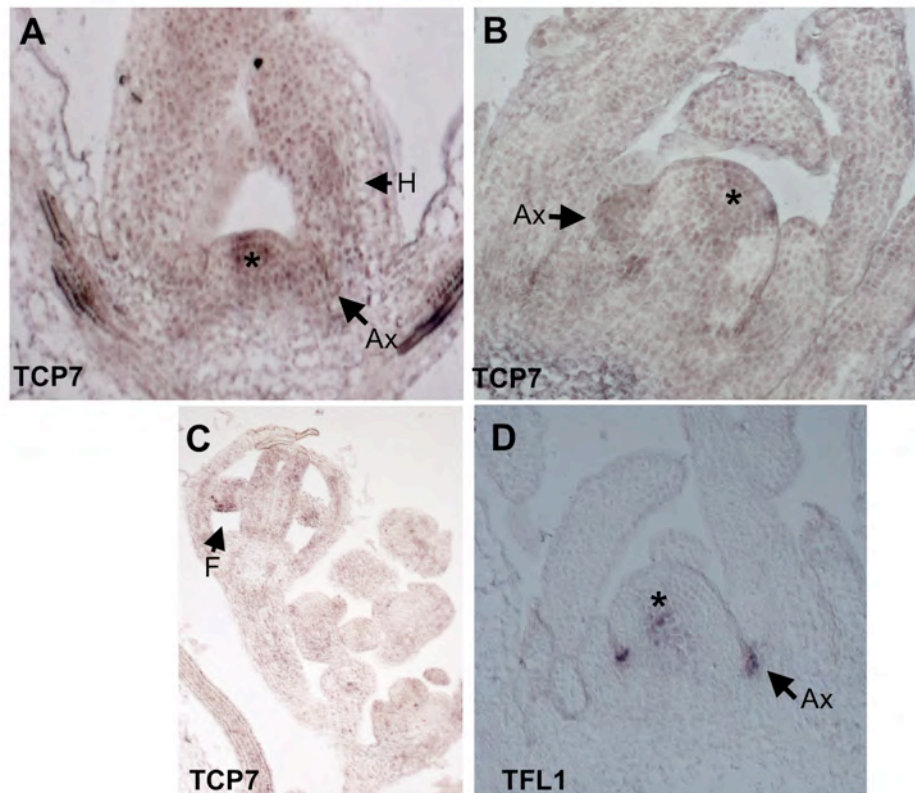
En un primer paso para determinar el patrón de expresión de *TCP7*, procedimos a analizar los niveles del mRNA de *TCP7* en diferentes partes de la planta (Figura C3.6). Debido a nuestro interés por relacionar a *TCP7* con *TFL1*, entre las partes a analizar, se seleccionaron tanto aquellas en las que *TFL1* se expresa (ápice vegetativo, ápice de inflorescencia principal, ápice de inflorescencia secundaria y tallo) como otras en las que no (hoja y fruto) (Serrano-Mislata, 2010). Pudimos detectar expresión de *TCP7* en todos los casos, siendo los niveles más

altos en el ápice vegetativo. Nuestros resultados están de acuerdo con los resultados de (Yao et al., 2007) que indicaban que *TCP7* se expresa en todos los órganos de la planta.



**Figura C3.6. Expresión del mRNA de *TCP7* en diferentes órganos de *Arabidopsis*.** Niveles de expresión de *TCP7* en diferentes partes de la planta determinados mediante RT-qPCR. Los valores representados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas y las barras de error, al error estándar entre ellas. Como gen constitutivo de referencia se utilizó *UBQ10*. ap veget, ápice vegetativo; ap inf, ápice de inflorescencia principal; ap sec, ápice de inflorescencia secundaria; plántulas enteras de 12 días; hojas de roseta; tallos y frutos.

Debido a nuestro interés por estudiar la posible regulación de *TFL1* por *TCP7* y dado que *TCP7*, al igual que *TFL1*, se expresa en el ápice del tallo, decidimos examinar con más detalle el patrón de expresión de *TCP7* en esa estructura mediante hibridación *in situ* (Figura C3.7). El mRNA de *TCP7* se detectó en el centro del SAM, tanto en fase vegetativa (Figura C3.7 A) como inflorescente (Figura C3.7 B), así como en los meristemos axilares (Figura C3.7 A y B), mostrando similitud con el patrón de expresión descrito para el mRNA de *TFL1* (Figura C3.7 D) (Bradley et al., 1997). No obstante, a diferencia de *TFL1*, *TCP7* también se expresa en hojas (Figura C3.7 A), principalmente en la cara adaxial, y en los órganos florales (Figura C3.7 C). Todos estos resultados indican un solapamiento parcial de los dominios de expresión de *TCP7* y *TFL1*, lo que es compatible con un posible papel de *TCP7* en la regulación de *TFL1*.



**Figura C3.7. Análisis del patrón de expresión de *TCP7* y *TFL1* por hibridación *in situ*.** **A)** Sección del ápice vegetativo de una planta silvestre (Col) de 6 días hibridada con una sonda de *TCP7*. Puede apreciarse señal en el centro del SAM, meristemo axilar y cara adaxial de las hojas. **B)** Sección del ápice inflorescente de una planta silvestre de 12 días hibridada con una sonda de *TCP7*. La señal aparece en el centro del SAM y en un meristemo axilar. **C)** Primordios florales de una planta silvestre de 14 días hibridada con una sonda de *TCP7*. Se observa señal en algunos órganos florales. **D)** Sección del ápice inflorescente de una planta silvestre de 12 días hibridada con una sonda de *TFL1*. La señal aparece en el SAM y meristemos axilares. El asterisco señala la expresión en el centro del SAM. Las flechas señalan la expresión en meristemo axilar (Ax), hojas (H) y órganos florales (F).

### 2.3. Obtención y análisis de plantas con pérdida de función de *TCP7*

Para elucidar el papel biológico de un gen, la fuente de información más valiosa es, sin duda, el análisis del fenotipo causado por su pérdida de función. Actualmente, en *Arabidopsis* la forma más habitual de disponer de un mutante de pérdida de función para un determinado gen es la obtención de líneas con inserciones de T-DNA en la secuencia codificante del gen o, en su defecto, en las proximidades de ésta. Sin embargo, esto no ha sido posible para *TCP7*, ya que hasta la fecha, en las bases de datos no existen líneas con inserción dentro de su región codificante, en las UTRs o en las proximidades del gen (a no menos de 600 bp del ATG o del codón de parada). Por lo tanto, para disponer de líneas de pérdida de función de *TCP7* hubo que proceder a su obtención por medio de dos abordajes diferentes. El primero, la identificación mediante TILLING de mutaciones puntuales en *TCP7* generadas por EMS y la segunda, utilizando técnicas de silenciamiento génico, mediante el diseño de miRNAs artificiales (amiRNA) y RNA de interferencia (RNAi) específicos contra *TCP7*.

### 2.3.1 Alelos de *TCP7* obtenidos de una mutagénesis de EMS

Un experimento de TILLING llevado a cabo en el laboratorio del Dr. C. Alonso Blanco (CNB, Madrid) en el fondo genético *Ler glabrous1-1* (*Ler gl1*) identificó 39 líneas con mutaciones diferentes en el gen *TCP7* (Tabla C3.2; Martín *et al.*, 2009). Debido al alto número de alelos obtenidos, en un primer paso se procedió a la clasificación de estas líneas atendiendo a la presunta gravedad del cambio de aminoácido provocado por la mutación y posteriormente, se inició la caracterización de las mejor valoradas. Las líneas seleccionadas fueron las líneas 955, 1222, 1309, 2875, 5301 y 6509 (Tabla C3.2). En todas ellas, excepto la línea 5301, era el dominio TCP de la proteína el que se hallaba afectado (Figura C3.8). Sin duda, la más prometedora fue la línea 2875, en la que la mutación origina una versión truncada de la proteína de tan sólo 64 aminoácidos y con el dominio TCP interrumpido por la mitad. Las líneas 955 y 6509 se seleccionaron por presentar sustituciones no conservativas en posiciones clave que impiden la formación de una alfa hélice en la región básica del dominio TCP (Cubas *et al.*, 1999). La línea 1309 se seleccionó por el posible efecto en el dominio TCP de sustituir un residuo hidrófobo conservado en la alfa hélice, por un aminoácido polar como la serina. En las líneas 1222 y 5301, cuya mutación se encuentra fuera del dominio TCP, se valoró la potencial importancia de sustituciones no conservativas. Por último, cabe destacar que en todas estas líneas, con excepción de la 6509, la mutación se hallaba en heterocigosis. Para las líneas 1222, 2875 y 5301 se consiguió obtener individuos homocigotos.

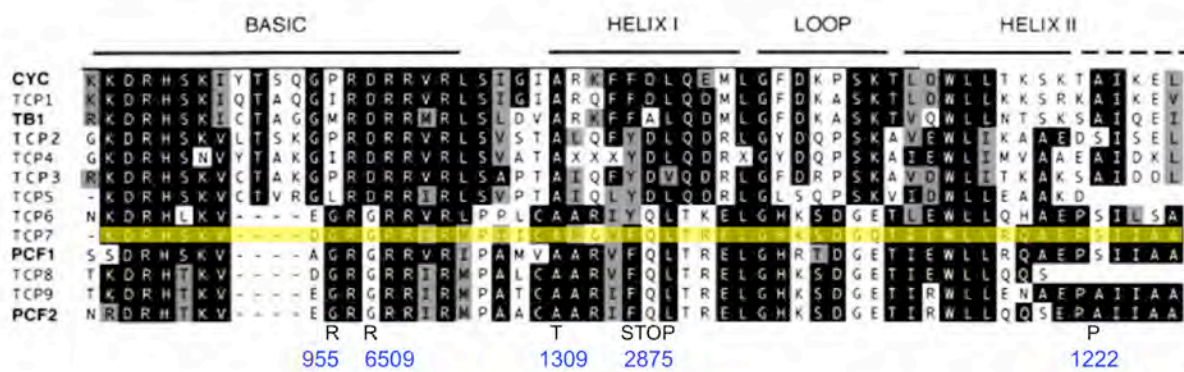
Una vez seleccionadas las líneas mutantes supuestamente más prometedoras, el siguiente paso fue su siembra para la posterior observación de los posibles fenotipos en su descendencia. Debido a que las mencionadas líneas procedían de una mutagénesis de EMS, era esperable la presencia de mutaciones adicionales en otros loci distintos a *TCP7*, lo que podría originar fenotipos que nada tuvieran que ver con este gen. Con el fin de discriminar entre los fenotipos dependientes e independientes de la pérdida de función de *TCP7*, se procedió, simultáneamente, a la siembra de semillas de líneas con mutaciones en *TCP7* que eran sinónimas o muy conservativas (Tabla C3.2).

La primera conclusión del análisis de las plantas procedentes de las semillas de todas estas líneas fue la existencia generalizada de mutaciones adicionales a *TCP7*. Los individuos descendientes de líneas con mutaciones sinónimas presentaron a menudo fenotipos relacionados con la supervivencia y tamaño de la planta que también se registraron en la descendencia de muchas de las líneas con mutaciones supuestamente más graves. Esto conllevó a descartar que dichas anomalías estuvieran necesariamente relacionadas con una reducción de la función de *TCP7*, pudiendo deberse también a la existencia de mutaciones en otros genes. Además, para algunas de estas líneas no se pudieron identificar a los homocigotos. Finalmente, se redujo el número de líneas mutantes con las que continuar trabajando a sólo una (Tabla C3.3), la línea 2875 que codificaba la versión truncada de la proteína *TCP7* y a la que nos referiremos en adelante como línea *stop*.

Tabla C3.2. Líneas mutantes de *TCP7* obtenidas por TILLING

Línea <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Cambio de aa <sup>c</sup>	Línea <sup>a</sup>	Posición <sup>b</sup>	Cambio de aa <sup>c</sup>
972	30	Asn → Asn	6261	403	Leu → Phe
5556	57	Ile → Ile	3320	455	Ser → Asn
1962	70	Ala → Thr	<b>3545</b>	516	Ala → Ala
1529	92	Ser → Leu	4242	516	Ala → Ala
<b>955</b>	142	Gly → Arg	<b>1366</b>	518	Arg → Lys
<b>2274</b>	146	Arg → Lys	6719	520	Pro → Ser
<b>6509</b>	148	Gly → Arg	<b>5301</b>	530	Gly → Glu
3332	150	Gly → Gly	38	551	Gly → Glu
2066	155	Arg → Lys	4073	551	Gly → Glu
<b>6868</b>	155	Arg → Lys	4067	631	Ala → Thr
5563	161	Arg → His	1176	661	Val → Ile
<b>4150</b>	168	Pro → Pro	4116	680	Gly → Asp
<b>1309</b>	178	Ala → Thr	4514	680	Gly → Asp
<b>2875</b>	193	Gln → STOP	3725	701	Ser → Phe
5334	201	Thr → Thr	5304	701	Ser → Phe
<b>1222</b>	266	Ser → Phe	317	719	Pro → Leu
351	350	Thr → Ile	1251	736	Glu → Lys
3837	358	Asp → Asn	1298	748	Arg → Cys
2684	389	Thr → Met	344	778	No codifica
2693	394	Pro → Ser			

<sup>a</sup> Nombre de la línea <sup>b</sup> Posición de la mutación en la secuencia codificante del gen *TCP7*. La posición 1 corresponde a la A del ATG. <sup>c</sup> Cambio de aminoácido (si procede) provocado por la mutación. En el caso de la línea 344 no se produce cambio de aminoácido por estar situada en la 3'UTR. En amarillo se han señalado aquellas líneas cuyas mutaciones son candidatas a alterar gravemente la función del gen *TCP7*. En negrita aparecen los nombres de las líneas que se sembraron para observar su fenotipo.



**Figura C3.8. Cambios originados en el dominio TCP por las mutaciones de algunas líneas identificadas en el experimento de TILLING de *TCP7*.** Alineamiento del dominio TCP completo de varios miembros de la familia. En amarillo se resalta la secuencia de aminoácidos del fragmento de la proteína *TCP7*. Debajo del alineamiento se indican los cambios de aminoácido en la secuencia de los mutantes de *TCP7* más interesantes obtenidos por TILLING. Los números en azul corresponden con los de las líneas mutantes. Alineamiento adaptado de Cubas *et al.* (1999).

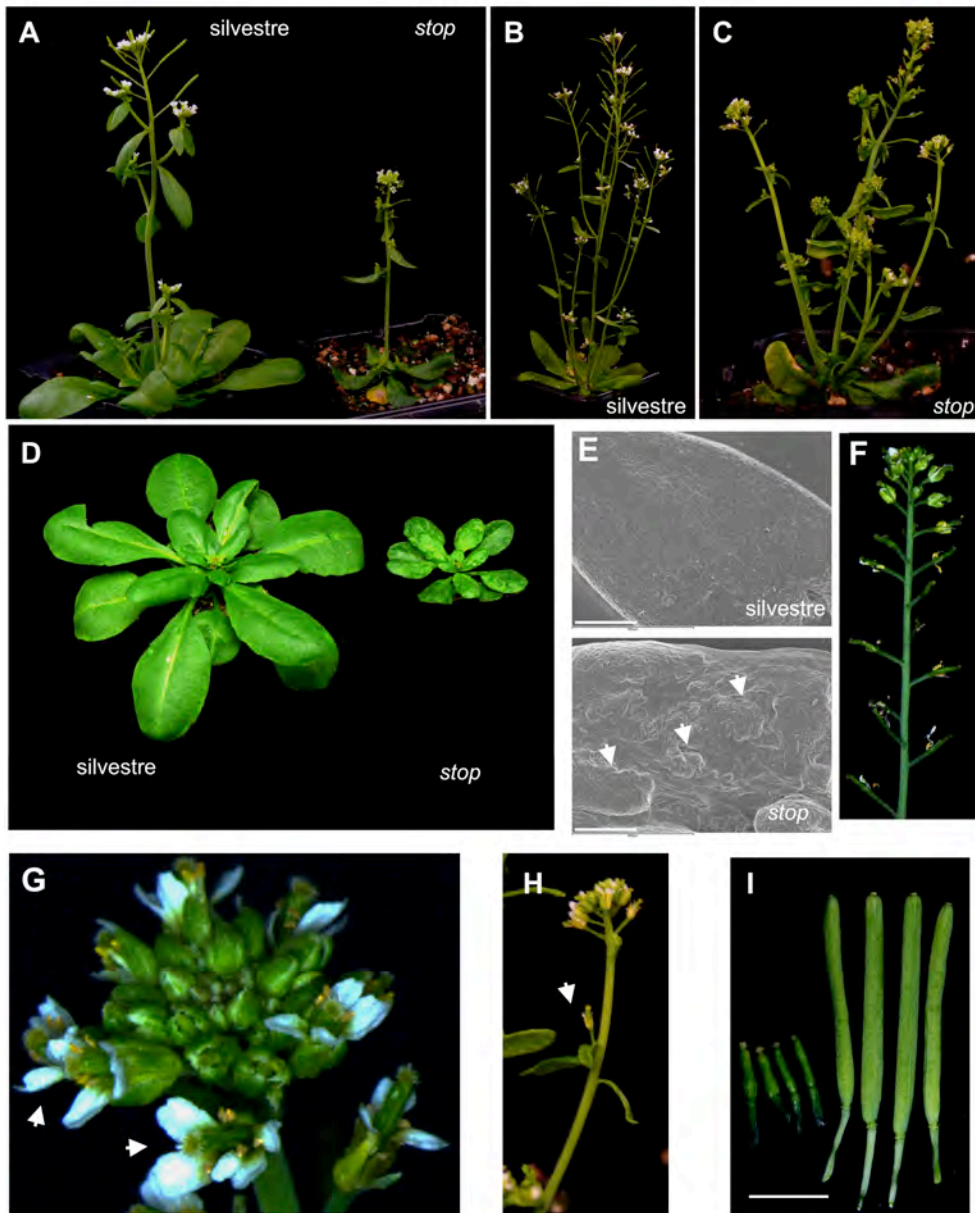
**Tabla C3.3. Resultados de los escrutinios de líneas mutantes de *TCP7* con potencial interés**

Línea <sup>a</sup>	Homocigoto <sup>b</sup>	Observaciones <sup>c</sup>
955	No	1, 2
1222	Sí	3
1309	No	3
2875	Sí	1, 2
5301	Sí	3
6509	No	3

<sup>a</sup> Nombre de la línea. <sup>b</sup> Se refiere a si se pudieron identificar individuos homocigotos. <sup>c</sup> Problemas ocurridos durante el escrutinio de esa línea: (1) Baja supervivencia. La mayoría de plantas no llegan a completar su desarrollo. (2) Esterilidad. (3) El fenotipo que segrega la línea mutante coincide con el observado en líneas con mutaciones sinónimas.

### 2.3.2. Caracterización del mutante *stop* que codifica una versión truncada de *TCP7*

La germinación de las semillas procedentes de la línea heterocigota 2875 proporcionada por el Dr. C. Alonso Blanco presentó un bajo porcentaje de germinación. Entre las plantas que germinaron, se identificaron varios homocigotos para la mutación *stop*. Todos ellos presentaban enanismo, hojas rugosas y esterilidad. Estas características se observaron de nuevo en la descendencia de plantas heterocigotas hermanas, correspondiéndose todos los casos con homocigotos para la mutación *stop*. Posteriormente, para un mejor estudio del fenotipo, con el fin de evitar el efecto de otras mutaciones adicionales que pudiesen existir, se caracterizaron individuos *stop* homocigotos descendientes de una línea segregante seleccionada tras tres retrocruces con el parental silvestre (Figura C3.9).



**Figura C3.9. Aspectos más característicos del fenotipo del mutante *stop* en condiciones de día largo.** **A)** Comparación del tamaño entre una planta silvestre (*Ler gl1*) y *stop*. **B y C)** Fenotipo adulto de plantas silvestre y mutante respectivamente. La imagen de la planta mutante ha sido aumentada para la mejor observación de sus rasgos. **D)** Comparación de la superficie de las hojas de roseta entre plantas silvestre y mutante. Cabe destacar que las hojas de ambas plantas carecen de tricomas por la presencia de la mutación *gl1* en el fondo genético en el que se realizó la mutagénesis. **E)** Vista detallada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de la superficie de la primera hoja caulinar en plantas control y mutante, respectivamente, en el mismo estadio del desarrollo. Las flechas señalan masas de tejido desorganizado (tumores). Barra = 300  $\mu$ m **F)** Inflorescencia principal de una planta mutante donde se observa que los frutos aún conservan los pétalos. **G)** Detalle del ápice inflorescente de una planta mutante con flores que tienen 5 pétalos (señaladas por flechas). **H)** Detalle de una flor axilar (flecha) en una planta mutante. **I)** Comparación de los cuatro primeros frutos de la inflorescencia principal en plantas mutantes (izquierda) y silvestre (derecha). Barra = 0.5 cm. Las plantas *stop* mostradas pertenecen a individuos R3 homocigotos.



Las plantas *stop* retrocruzadas mostraron los rasgos fenotípicos previamente observados, del mismo modo que su observación más detallada permitió descubrir otros nuevos (Figura C3.9). Las anomalías más importantes detectadas fueron una reducción importante del tamaño (Figura C3.9 A), el aspecto rugoso de sus hojas, debido a la proliferación en las mismas de una especie de tumores o masas desorganizadas de células (Figura C3.9 D y E), problemas en la abscisión de los órganos florales (Figura C3.9 F) y, en ocasiones, un aumento del número de órganos florales (Figura C3.9 G) así como la formación de flores en las axilas de las hojas caulinares (Figura C3.9 H). Además, el mutante presentaba frutos de pequeño tamaño (Figura C3.9 G) que eran estériles. También cabe señalar, que la proporción de plantas homocigotas en la progenie de una línea heterocigota siempre fue del orden de 1/10, muy inferior a la proporción esperada para una mutación monogénica recesiva.

Con el fin de determinar si la baja proporción de individuos homocigotos en la descendencia de los heterocigotos se debía a un problema en el desarrollo del gametofito femenino, se cuantificó el número de semillas por silicua, así como el porcentaje de germinación de las mismas entre la descendencia de plantas del parental silvestres y de heterocigotas para el alelo *stop*, no encontrándose diferencias significativas (resultados no mostrados). Por lo tanto, la baja proporción de individuos *stop* homocigotos no parece estar causada por problemas en el desarrollo del gametofito femenino o en la germinación de la semilla. No podemos descartar que, quizás, la clave se encuentre en el gametofito masculino.

Por otra parte, por la relación de *TCP7* con *TFL1*, se procedió a examinar con más detalle en el mutante *stop* la arquitectura de la inflorescencia y el tiempo de floración (Tabla C3.4), caracteres ambos controlados por *TFL1* (Bradley *et al.*, 1997; Ratcliffe *et al.*, 1998). En las plantas *stop* se observaron diferencias en la arquitectura de la inflorescencia respecto a las plantas del parental silvestre. Estas diferencias consistieron en un aumento del número inflorescencias terciarias y de inflorescencias de roseta en las plantas *stop* (Tabla C3.4). En cuanto al tiempo de floración, medido como el número de hojas, los datos indican que no hay diferencias significativas con el silvestre. No obstante, el número de días hasta hacer el *bolting* era claramente superior en los mutantes, lo que sugiere problemas en el plastocrono.

Debido al parecido de *TCP7* con su homólogo *TCP21*, es posible que exista redundancia entre ambos genes. Para comprobar esta posibilidad, se procedió a obtener el doble mutante *stop tcp21* mediante cruce. Las plantas *stop tcp21* no presentaron diferencias apreciables respecto al fenotipo del mutante simple *stop* (datos no mostrados), sugiriendo que no parece que haya redundancia génica entre *TCP7* y *TCP21*.

Para comprobar si el fenotipo del mutante *stop* es realmente debido a la mutación en el gen *TCP7*, se procedió a un ensayo de complementación del mutante *stop* con una construcción en la que la región codificante del gen *TCP7* era dirigida por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Para ello, se procedió al cruce de una línea heterocigota para el alelo *stop* con una línea homocigota 35S::*TCP7*. En la F2 de este cruce se observó el fenotipo de aquellas

plantas con al menos una copia del transgén y que, tras el correspondiente genotipado, resultaron ser homocigotas para el alelo *stop*. Tras analizar el fenotipo de estas plantas, se observó que la construcción 35S::TCP7 no fue capaz de complementar el fenotipo *stop* en todos los casos. Este resultado cuestiona que el fenotipo de las plantas *stop* anteriormente mostrado sea debido exclusivamente a la mutación de *TCP7*.

Por lo tanto, debido a la incertidumbre respecto al mutante *stop* y ante la dificultad para trabajar con el resto de líneas procedentes del TILLING, se decidió intentar obtener líneas de pérdida de función del gen *TCP7* mediante otros abordajes.

**Tabla C3.4. Características fenotípicas de las plantas *stop* cultivadas en día largo**

	Silvestre ( <i>Ler gl1</i> ) (n=12)	<i>stop</i> (n=12)
Inflorescencias secundarias <sup>a</sup>	4.11 ± 0.17	4.62 ± 0.22
Inflorescencias terciarias <sup>b</sup>	3.32 ± 0.41	4.21 ± 0.85
Inflorescencias de roseta <sup>c</sup>	4.22 ± 0.13	5.77 ± 0.27
Hojas de roseta <sup>d</sup>	7.75 ± 0.22	8.1 ± 0.41
Hojas caulinares <sup>e</sup>	3.93 ± 0.11	4.7 ± 0.26
Hojas total <sup>f</sup>	11.58 ± 0.23	12.8 ± 0.44
Días <i>bolting</i> <sup>g</sup>	17.92 ± 0.19	24.4 ± 0.37

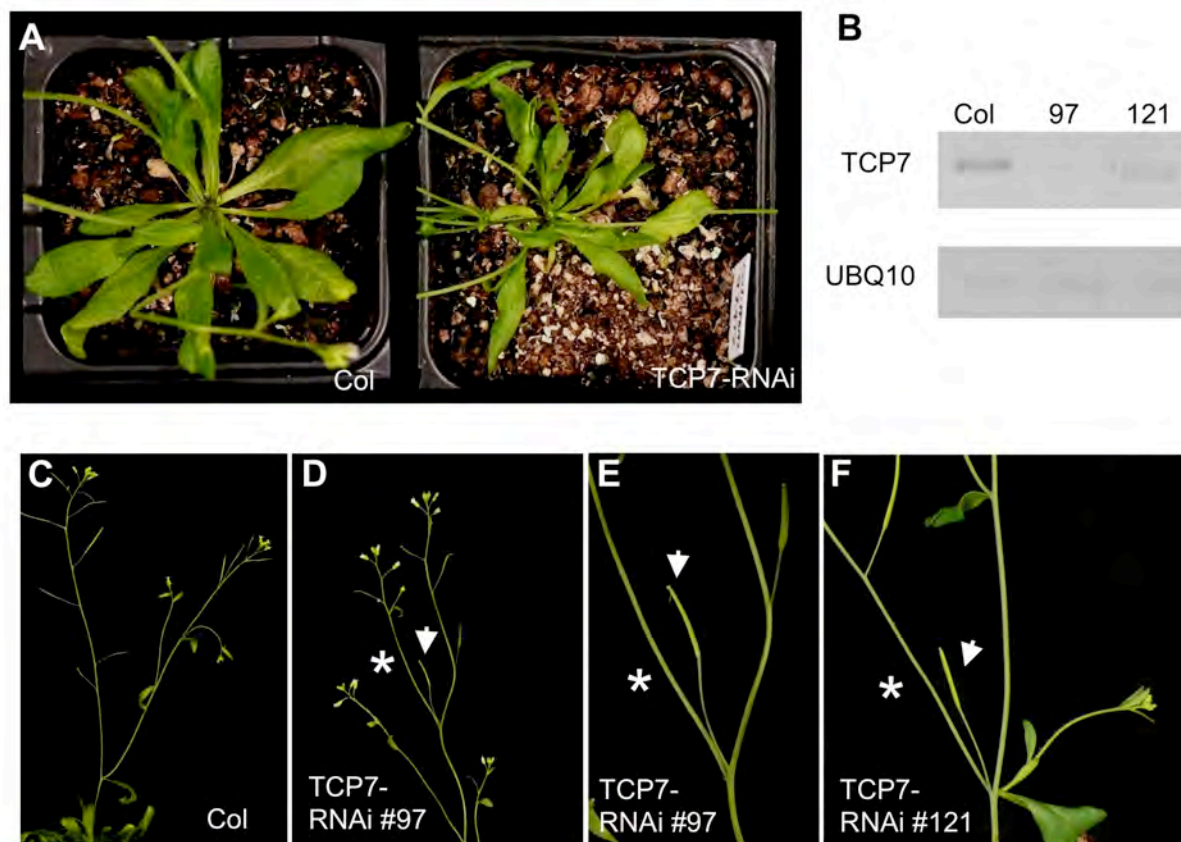
Cada valor representa la media ± error estándar. Para ambos genotipos se analizaron un total de 12 plantas cultivadas en día largo. <sup>a</sup> Número de inflorescencias secundarias que desarrolla la inflorescencia principal. <sup>b</sup> Promedio del número de inflorescencias terciarias que se desarrollan por inflorescencia secundaria. <sup>c</sup> Número de inflorescencias de roseta contabilizadas a día 35. <sup>d</sup> Número de hojas de roseta. <sup>e</sup> Número de hojas caulinares de la inflorescencia principal. <sup>f</sup> Suma del número de hojas de roseta más caulinares. <sup>g</sup> Días hasta hacer el *bolting* (tallo elongado 1mm; Día 0 se refiere a cuándo fueron transferidas a la cámara de cultivo después del periodo de estratificación).

### 2.3.3. Reducción de la expresión de *TCP7* mediante técnicas de silenciamiento génico

Ante las dificultades para obtener mutantes de pérdida de función de *TCP7* por medio de mutagénesis con EMS o líneas con inserciones de T-DNA, se decidió recurrir a herramientas basadas en el silenciamiento génico inducido por pequeños RNAs. En los últimos años, se han desarrollado técnicas basadas en el uso de precursores artificiales de microRNAs (amiRNA) o de RNA de interferencia para silenciar la expresión de genes (Schwab, 2006; Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001).

En primer lugar, se diseñó un precursor de amiRNA a partir de una región conservada entre *TCP7* y *TCP21*. A continuación, se generaron plantas transgénicas con una construcción en la que dicho precursor de amiRNA estaba bajo el control del promotor 35S. Tras analizar el fenotipo de 100 líneas aproximadamente, tanto en T1 como en T2, no observamos ninguna línea con fenotipo distinto al del silvestre (resultados no mostrados). Por este motivo decidimos cambiar de estrategia e intentar reducir los niveles de *TCP7* en plantas mediante RNA de interferencia (RNAi).

El diseño de la construcción de RNAi para silenciar a *TCP7* se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, se identificó el fragmento de secuencia más divergente entre los mensajeros de *TCP7* y su pariente más cercano, *TCP21*. Dicha secuencia se correspondió con el final de la región codificante y principio de la 3'UTR de *TCP7* (Alineamiento S4). A continuación, esta secuencia de *TCP7* se clonó en el vector pB7GWIWG2 que incluye los elementos necesarios para desencadenar en la planta el silenciamiento del gen diana (en nuestro caso *TCP7*) mediado por RNAi (Wesley *et al.*, 2001; Wesley *et al.*, 2003). Esta construcción se transformó en plantas de *Arabidopsis* fondo Col (Figura C3.10).



**Figura C3.10. Algunas de las características más relevantes de las plantas TCP7-RNAi cultivadas en condiciones de día largo. A)** Comparación de las hojas de roseta entre el silvestre (Col) y una planta TCP7-RNAi. **B)** Niveles de expresión de *TCP7* determinados por RT-PCR semicuantitativa en muestras de RNA extraído de una mezcla de plántulas de dos semanas procedentes de poblaciones segregantes T2 de las líneas 97 y 121. El gen *UBQ10* se utilizó como gen constitutivo de referencia. **C)** Arquitectura de la inflorescencia de una planta silvestre. **D)** Arquitectura de la inflorescencia de una planta T2 de la línea TCP7-RNAi #97. Puede observarse la presencia de una inflorescencia secundaria no sustentada por una hoja caulinar (señalada por un asterisco) y el acortamiento del entrenudo que separa la primera flor producida en el tallo de la inflorescencia principal de la última inflorescencia secundaria (señalado por una flecha). **E)** Ampliación de la imagen D para una mejor observación del acortamiento del entrenudo que separa la primera flor de la última inflorescencia secundaria. **F)** arquitectura de la inflorescencia de una planta T2 de la línea TCP7-RNAi #121. Pueden observarse las mismas anomalías mostradas en D.

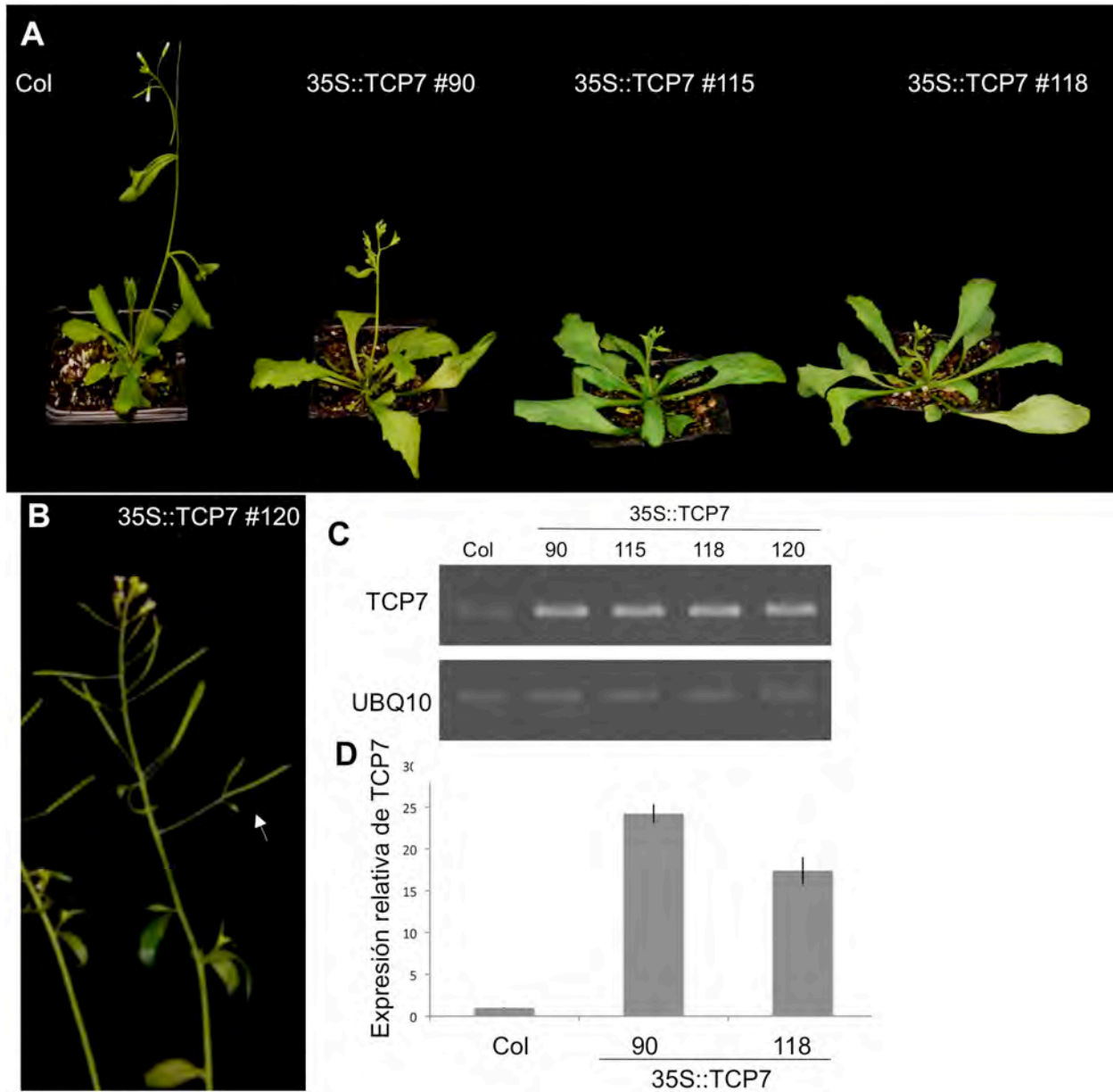
Tras un análisis preliminar de plantas T1, se identificaron 6 líneas que presentaban el mismo tipo de alteración en la filotaxis. Ésta consistió en el acortamiento del entrenudo que separa la primera flor producida en el tallo de la inflorescencia principal de la última inflorescencia secundaria. Posteriormente, al analizar la descendencia de estas líneas, seleccionamos las dos líneas que presentaron la mayor reducción de los niveles de expresión de *TCP7* (líneas 97 y 121; Figura C3.10). Estas dos líneas presentaron las mismas anomalías observadas en T1, además de otras alteraciones, como inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares y hojas de roseta más estrechas y alargadas que las del silvestre (Figura C3.10). Cabe destacar que estos resultados se han obtenido recientemente. En el futuro, esperamos disponer de plantas homocigotas de estas líneas con las que llevar a cabo una caracterización más detallada.

#### **2.4. Obtención y análisis de plantas con ganancia de función de *TCP7***

Otra herramienta de gran interés para averiguar el papel biológico de un gen consiste en su expresión constitutiva en plantas transgénicas mediante el uso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.*, 1985). Por este motivo, se generó una construcción 35S::*TCP7* subclonando la región codificante del cDNA de *TCP7* en el vector binario pEarleyGate100, donde se fusiona el fragmento clonado al promotor 35S (Earley *et al.*, 2006).

##### 2.4.1 Fenotipo de las líneas 35S::*TCP7*

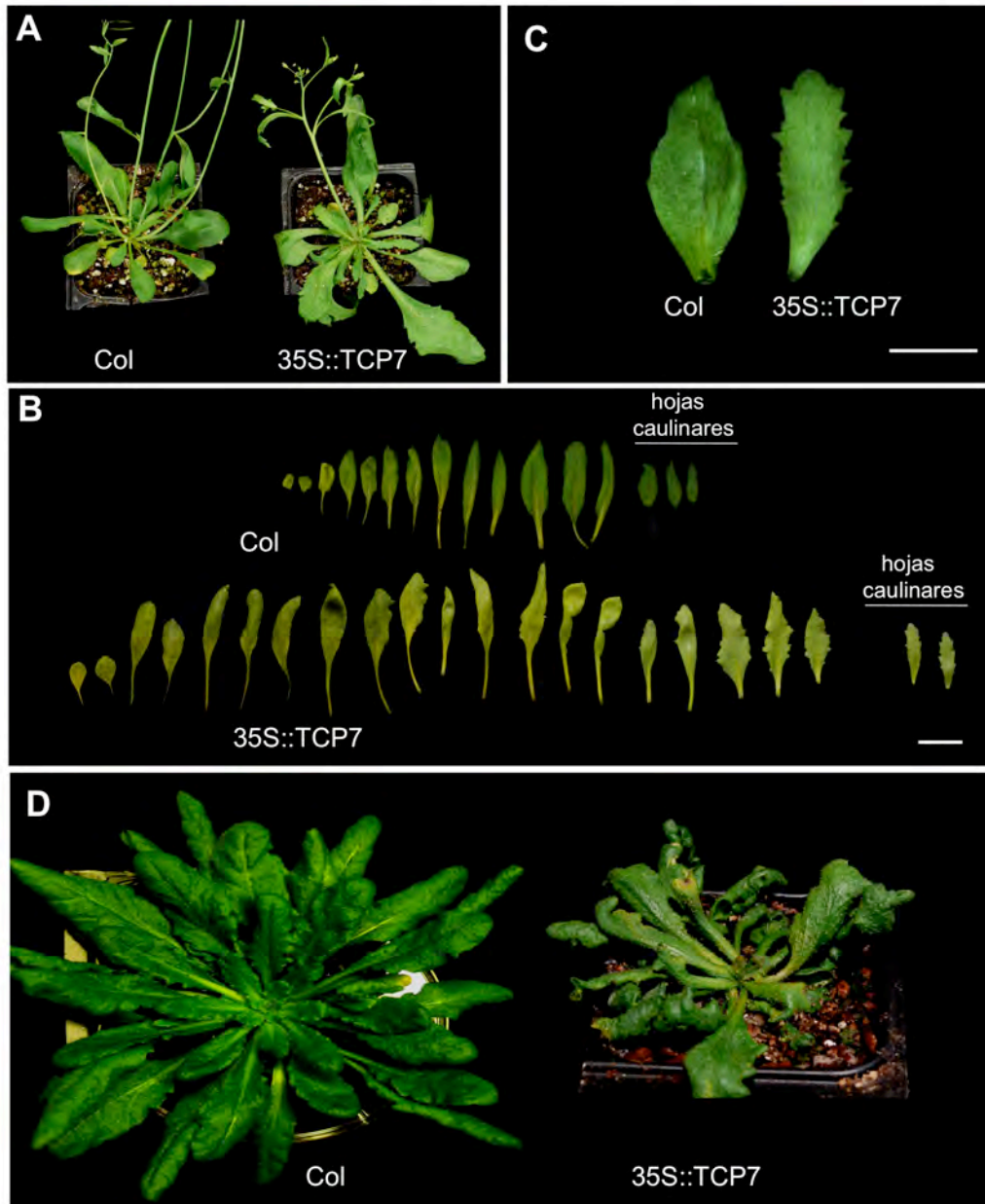
La construcción 35S::*TCP7* resultante se transformó en el fondo Col y, tras un escrutinio preliminar de la T1, donde se identificaron líneas que presentaban un cierto retraso en la floración, nos centramos en el análisis de los fenotipos de las poblaciones T2 procedentes de estas líneas. De esta manera identificamos 4 líneas que sobreexpresaban *TCP7* y que presentaban un fenotipo similar y heredable (Figura C3.11). Estas líneas destacaron a simple vista por el tamaño y morfología de sus hojas de roseta, más grandes y aserradas que las del silvestre (Figura C3.11 A), así como por presentar una serie de anomalías comunes en la arquitectura de su inflorescencia, llegando incluso a observarse, en algunos casos, la determinación de inflorescencias terciarias o cuaternarias (Figura C3.11 B). Todas estas líneas mostraron altos niveles de *TCP7* determinados por RT-PCR semicuantitativa (Figura C3.11 C). Para un análisis más detallado del efecto de la expresión constitutiva de *TCP7*, se decidió caracterizar individuos homocigotos de las líneas 90 y 118, ambas con la inserción del transgén en un único locus y para las que se volvió a comprobar, esta vez por RT-qPCR, que expresaban altos niveles de *TCP7* (Figura C3.11 D). A continuación se describe el fenotipo de estas líneas, a los que nos referiremos con el nombre genérico de plantas 35S::*TCP7*.



**Figura C3.11. Fenotipo líneas T2 35S::TCP7 en condiciones de día largo. A)** Plantas silvestre (Col) y 35S::TCP7 de las líneas 90, 115 y 118. Las hojas de los individuos 35S::TCP7 son mayores y más aserradas. **B)** Planta 35S::TCP7 de la línea 120. La flecha señala una inflorescencia lateral determinada. **C)** Niveles de expresión de *TCP7* determinados por RT-PCR semicuantitativa en muestras de RNA extraído de una mezcla de plántulas de dos semanas procedentes de poblaciones segregantes T2 de las líneas mostradas en A y B. El gen *UBQ10* se utilizó como gen constitutivo de referencia. Las cuatro líneas mostraron niveles elevados de *TCP7*. **D)** Niveles de expresión relativos de *TCP7* determinados por RT-qPCR en plántulas de dos semanas de las líneas 35S::TCP7 90 y 118 homocigotas para el transgén. El gen *UBQ10* se utilizó como gen constitutivo de referencia. Las barras muestran el error estándar.

Las plantas 35S::TCP7 se distinguieron por sus hojas alargadas y aserradas con una forma y curvatura muy irregulares debido al plegamiento de sus márgenes (Figura C3.12 A-C). Esta forma irregular y aserrada se acentuó en las últimas hojas producidas por el SAM,

especialmente en las hojas caulinares (Figura C3.12 B y C). Estas características se vieron aumentadas al cultivar las plantas en condiciones de día corto (Figura C3.12 D).



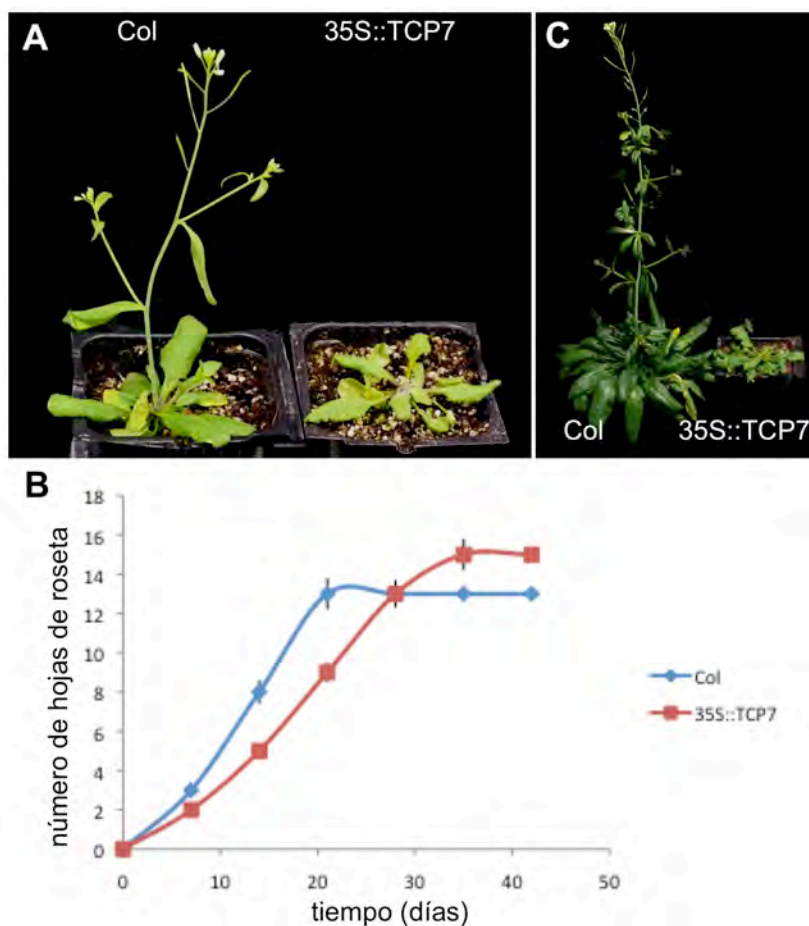
**Figura C3.12. Alteraciones del tamaño y morfología de la hoja de las plantas 35S::TCP7.** Hojas de plantas silvestre (Col) y 35S::TCP7 cultivadas en condiciones de en día largo o día corto. **A)** Comparación de las rosetas de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas en condiciones de día largo. Se observa cómo la roseta de las plantas 35S::TCP7 está formada por hojas de mayor tamaño y forma irregular debido al plegamiento de sus márgenes. **B)** Comparación de todas las hojas (de roseta y caulinares) de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas en día largo. Se pueden observar los rasgos descritos en (A). Además, las últimas hojas producidas por el SAM de las planta 35S::TCP7 son más aserradas, especialmente las caulinares. Barra = 2 cm. **C)** Morfología de la primera hoja caulinar en el mismo estadio del desarrollo de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas en condiciones de día largo. Se observa cómo la hoja 35S::TCP7 está más aserrada. Barra = 0.5 cm. **D)** Hojas de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas en condiciones de día corto. Se observa cómo en día corto se agrava el fenotipo de las hojas 35S::TCP7.

Otra característica de las plantas 35S::TCP7 fue un retraso en el tiempo de floración, tanto en el número de hojas (Tabla C3.5) como, sobre todo, en el número de días que tardan en hacer el *bolting*, presentando un desfase de dos semanas respecto al silvestre (Figura C3.13 A). Este retraso en el bolting refleja que el plastocrono de las plantas 35S::TCP7 también se halla afectado, siendo más lento que el de las plantas silvestres (Figura C13. B). De este modo, durante los primeros 23 días de su desarrollo, las plantas 35S::TCP7 produjeron una media de 0.30 hojas/día frente a las 0.52 hojas/día del silvestre (estos resultados incluyen tanto las hojas de roseta como las hojas caulinares producidas en ese periodo de tiempo). De nuevo, todos estos defectos se vieron aumentados al cultivar las plantas en condiciones de día corto, donde el meristemo de las plantas 35S::TCP7 no llegó a producir más de 8 hojas, momento en el cual dejó de generar cualquier órgano lateral, no llegando nunca a florecer (Figura C3.13 C).

**Tabla C3.5. Número de hojas e inflorescencias laterales de plantas silvestres y 35S::TCP7 en condiciones de día largo**

	Silvestre (Col)	35S::TCP7 #90	35S::TCP7 #118
Hojas roseta <sup>a</sup>	14.00 ± 0.30	17.78 ± 0.14	17.44 ± 0.17
Hojas caulinares <sup>b</sup>	3.60 ± 0.22	3.38 ± 0.24	3.67 ± 0.22
Hojas Totales <sup>c</sup>	17.60 ± 0.43	21.13 ± 0.31	21.11 ± 0.20
Inflorescencias de roseta <sup>d</sup>	4.30 ± 0.21	0.73 ± 0.32	1.31 ± 0.41

Cada valor representa la media ± error estándar. Para ambos genotipos se analizaron un total de 12 plantas cultivadas en día largo. Las plantas de las líneas 90 y 118 analizadas eran homocigotas. **a** Número de hojas de roseta. **b** Número de hojas caulinares de la inflorescencia principal. **c** Suma del número de hojas de roseta más caulinares. **d** Número de inflorescencias de roseta tras 45 días.



**Figura C3.13. Comparación del plastocrono de plantas silvestre y 35S::TCP7 en día largo y día corto. A)** Comparación plantas silvestre (Col) y 35S::TCP7 cultivadas durante cuatro semanas en día largo. **B)** Producción de hojas de roseta por el SAM de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas en día largo. Las barras muestran el error estándar. En el momento del bolting (día 21 para el silvestre y día 34 para 35S::TCP7) ya se habían formado todas las hojas de roseta. Puede observarse cómo las plantas 35S::TCP7 producen hojas un un ritmo menor que el silvestre. **C)** Comparación de plantas silvestre y 35S::TCP7 cultivadas durante 80 días en condiciones de día corto. Se observa que, mientras la planta silvestre ya ha florecido, la planta 35STCP7 todavía no ha hecho el bolting. Esta planta nunca floreció porque su meristemo dejó de producir nuevos órganos.

Las plantas 35S::TCP7 también mostraron defectos en la arquitectura de la inflorescencia (Tabla C3.6 y Figura C3.14 A-E). Estos defectos fueron más frecuentes cuanto mayor era el orden de ramificación de la inflorescencia, apareciendo más en las inflorescencias secundarias y terciarias que en la inflorescencia principal. Unas de estas anomalías fue la presencia de inflorescencias laterales no sustentadas por hoja caulinar (Figura C3.14 A y C). También aparecieron hojas caulinares en cuya axila no se formaba ninguna inflorescencia lateral (Figura C3.14 A y C). El análisis mediante SEM mostró que en ocasiones, estas hojas carecían de meristemo axilar asociado (Figura C3.14 D). La filotaxis de las plantas 35S::TCP7 también se vio alterada, presentando una gran variabilidad en la longitud de los entrenudos, especialmente entre las flores (Figura C3.14 A y B). Por último, en ocasiones, las inflorescencias laterales se determinaron formando una flor terminal (Figura C3.14 E). Esto se observó en un tercio de las plantas homocigotas para el transgén de la línea 90, aunque nunca en su inflorescencia principal.



**Tabla C3.6. Frecuencia de defectos en la arquitectura de la inflorescencia de plantas control y 35S::TCP7 cultivadas en condiciones de día largo**

	Silvestre (Col) (n=12)	35S::TCP7 #90 (n=12)	35S::TCP7 #118 (n=12)	
Inflorescencia principal	Flor terminal <sup>a</sup>	0.0 %	2.2 %*	0.0 %
	Rama sin hoja caulinar <sup>b</sup>	0.5 %	15.3 %	17.5 %
	Hoja caulinar sin rama <sup>c</sup>	4.3 %	45.1 %	47.5 %
	Filotaxis <sup>d</sup>	0.61	1.16	1.07
Inflorescencia de roseta	Flor terminal <sup>a</sup>	0.0 %	5.0 %*	0.0 %
	Rama sin hoja caulinar <sup>b</sup>	2.9 %	20.0 %	10.3 %
	Hoja caulinar sin rama <sup>c</sup>	10.5 %	55.5 %	63.8 %

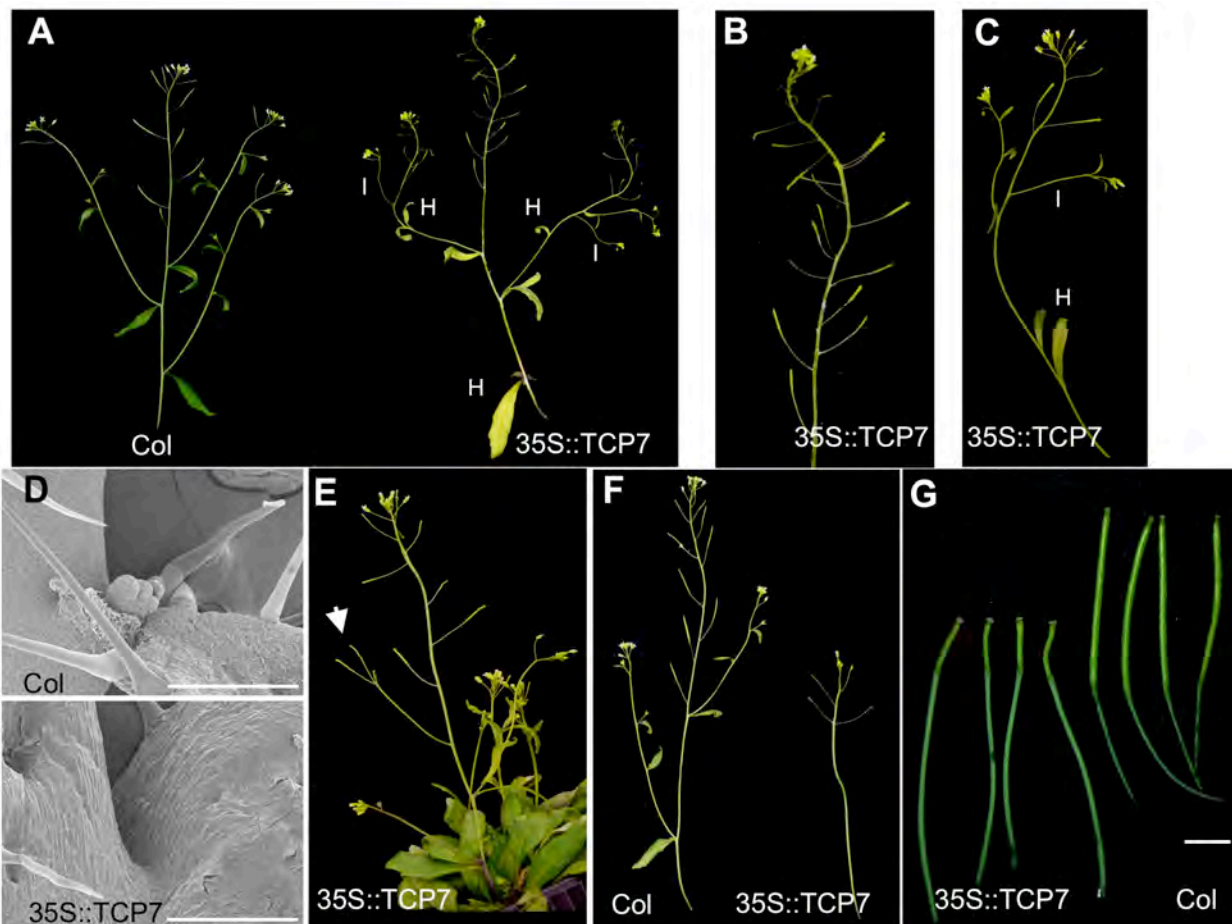
Las medidas se realizaron en plantas homocigotas tras 36 días de cultivo en día largo. Para la inflorescencia principal y las inflorescencias de roseta se contabilizaron todos los nudos no florales (hojas y ramas) que se desarrollaron en ellas y en sus inflorescencias secundarias, terciarias y cuaternarias. A partir de estos conteos se ha calculado la frecuencia con la que se determina una inflorescencia (<sup>a</sup>), aparece una rama (inflorescencia lateral) no sustentada por una hoja caulinar (<sup>b</sup>) o aparece una hoja caulinar que no sustenta ninguna inflorescencia (<sup>c</sup>). La medida de la filotaxis (<sup>d</sup>) se determinó midiendo la distancia entre las diez primeras flores de la inflorescencia principal de 12 plantas de cada genotipo y calculando la media de las desviaciones típicas. \* Cabe resaltar que las únicas inflorescencias determinadas fueron siempre inflorescencias laterales de la inflorescencia principal o de las inflorescencias de roseta.

Otro rasgo característico de las plantas 35S::TCP7 fue el menor desarrollo de inflorescencias de roseta (Tabla C3.6 y Figura C3.12 A). Adicionalmente, en las pocas inflorescencias de roseta que se desarrollaron, la frecuencia de las anomalías anteriormente descritas aumentó considerablemente (Tabla C3.6) y en la mayoría de los casos, las inflorescencias tenían una arquitectura muy simplificada, carente de ramas y con muy pocos órganos laterales (Figura C3.14 F). La dominancia apical es el efecto inhibitorio que el desarrollo de la inflorescencia principal ejerce sobre el crecimiento de las inflorescencias laterales (Cline, 1991). En *Arabidopsis*, esta inhibición es suprimida al decapitar la inflorescencia principal (Thimann, 1964; Hillman, 1975; Beveridge *et al.*, 2000; Tatematsu *et al.*, 2005). Sin embargo, la decapitación de la inflorescencia principal de plantas 35S::TCP7 no provocó el desarrollo de nuevas inflorescencias. Así, 12 de 15 plantas decapitadas no volvieron a desarrollar ninguna inflorescencia. Estos resultados indican un problema en el desarrollo de las

inflorescencias de roseta relacionado con la expresión constitutiva de *TCP7*.

Por último, las plantas *35S::TCP7* también presentaron frutos de menor tamaño, sujetos al tallo por largos pedicelos (Figura C3.14 G) y que contenían una menor cantidad de semillas (dato no mostrado).

En resumen, todos estos datos indican que la expresión constitutiva de *TCP7* provoca alteraciones en el desarrollo de, prácticamente, todos los órganos laterales de la planta.



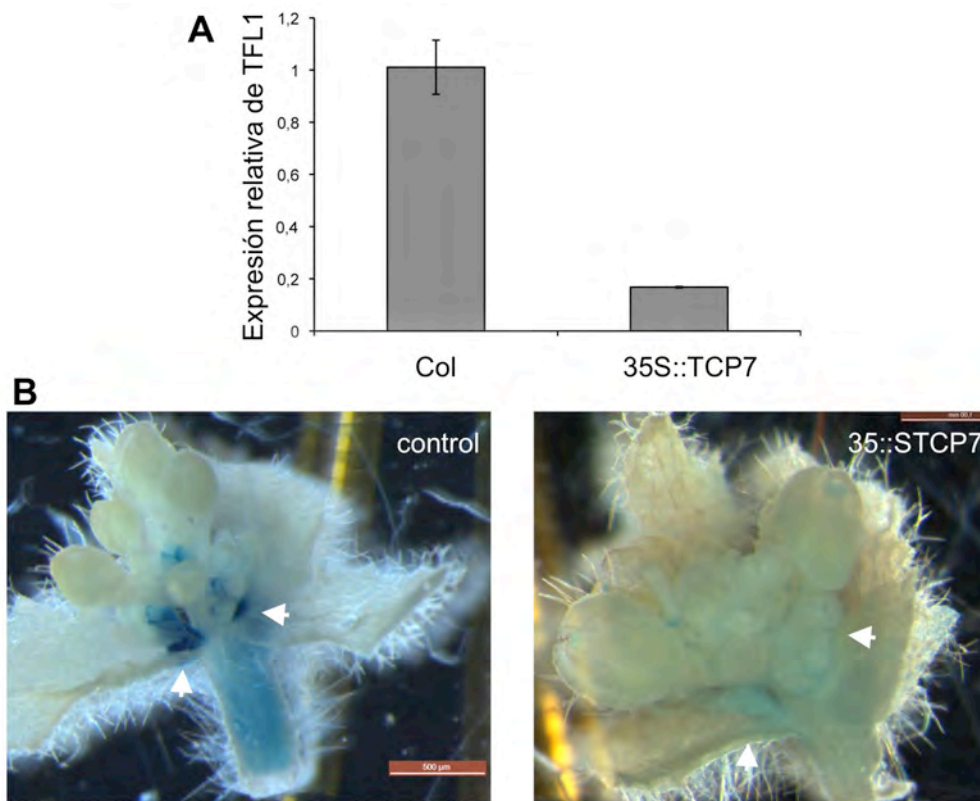
**Figura C3.14. Diferencias en la arquitectura de la inflorescencia entre plantas silvestre y *35S::TCP7* en condiciones de día largo.** **A)** Comparación de la inflorescencia principal de una planta silvestre (Col) y una planta *35S::TCP7*. En la planta *35S::TCP7* se observa la presencia de varias anomalías, como inflorescencias laterales no sustentadas por una hoja caulinar (señaladas por "I"), hojas caulinares de cuya axila no se desarrollan inflorescencias laterales (señaladas por "H") y una filotaxis alterada. **B)** Ampliación de la parte superior de la inflorescencia principal de la planta *35S::TCP7* de la figura (A). Puede observarse como existe una gran variación en la distancia entre las flores. **C)** Inflorescencia principal de una planta *35S::TCP7* donde se observa la presencia de una inflorescencia secundaria no sustentada por hoja caulinar y de dos hojas caulinares sin inflorescencia asociada. **D)** Observación por SEM de la axila de una hoja caulinar de una planta silvestre y de una planta *35S::TCP7*. En la hoja de la planta *35S::TCP7* no se observa la yema axilar. Barras = 300  $\mu$ m. **E)** Inflorescencia secundaria de una planta *35S::TCP7* que acaba en una flor terminal (señalada por la flecha). **F)** Inflorescencia de roseta de una planta silvestre comparada con una inflorescencia de roseta con fenotipo extremo de una planta *35S::TCP7*. Se observa cómo la arquitectura de la inflorescencia de roseta silvestre sigue el mismo patrón que la inflorescencia principal, con ramificaciones que dan lugar a inflorescencias secundarias y terciarias. En cambio, la inflorescencia de roseta *35S::TCP7* presenta una arquitectura muy simplificada, sin ninguna inflorescencia lateral. **G)** Comparación de los cuatro primeros frutos producidos por el SAM de plantas *35S::TCP7* y silvestre. Barra = 0.7 cm.

#### 2.4.2 Análisis de la expresión de *TFL1* en las plantas 35S::*TCP7*

Los resultados del híbrido simple mostraron una interacción de la proteína *TCP7* con el promotor de *TFL1*, lo que sugiere un posible papel de *TCP7* en la regulación de *TFL1*. Para ver si la expresión constitutiva de *TCP7* tiene un efecto en la expresión de *TFL1* se llevaron a cabo dos aproximaciones.

En la primera, mediante RT-qPCR, se compararon los niveles de expresión de *TFL1* en el ápice de la inflorescencia principal de plantas silvestre (Col) y 35S::*TCP7* cultivadas en condiciones de día largo, en el momento del bolting. El resultado obtenido fue que los niveles de expresión de *TFL1* en las muestras procedentes de plantas 35S::*TCP7* son más bajos que en el silvestre (Figura C3.15 A).

Por otra parte, mediante cruce, se introdujo el transgén *TFL1*pro::*GUS* de la línea delatora *LerPBG6* (Serrano-Mislata, 2010) en el fondo 35S::*TCP7*. La expresión de *TFL1*pro::*GUS* se vio reducida en el ápice de la inflorescencia de las plantas 35S::*TCP7* (Figura C3.15 B), especialmente en el caso de las inflorescencias laterales, que es donde más se expresa el transgén en el control (Figura C3.15 B). Estos resultados indican, por lo tanto, que la expresión constitutiva de *TCP7* reduce el nivel de expresión de *TFL1*.



**Figura C3.15. Expresión de *TFL1* en plantas *35S::TCP7* cultivadas en día largo. A)** Niveles de expresión relativos de *TFL1* medidos por RT-qPCR en el ápice principal de plantas silvestre (Col) y *35S::TCP7* al inicio del *bolting* (tallo de 0.5 cm de longitud). El gen *UBQ10* se utilizó como gen constitutivo de referencia. Las barras muestran el error estándar. **B)** Patrón de expresión *TFL1pro::GUS* en el ápice principal al inicio del *bolting* de plantas control y *35S::TCP7*. Se observa una mayor intensidad de la señal de *TFL1pro::GUS* en el ápice de la planta control, siendo más evidente en las inflorescencias secundarias (señaladas por flechas). Las muestras se incubaron con la tinción de GUS número 2 durante toda la noche y posteriormente se trataron con hidrato de cloral.

# DISCUSIÓN



## 1. Análisis del mutante *moss*. Papel de *AGO1* en la regulación de *TFL1*

### 1.1. El mutante *moss*, un nuevo alelo que permite estudiar el papel de *AGO1* durante el desarrollo

*AGO1* tiene un papel clave en el silenciamiento génico inducido por RNA. La caracterización de los diferentes alelos de *ago1* ha permitido determinar cuáles son los principales procesos de la planta regulados por este mecanismo (Morel *et al.*, 2002), siendo uno de ellos el desarrollo de los órganos laterales (Vaucheret *et al.*, 2004; Kidner y Martienssen, 2005). Debido a su función esencial, el estudio del papel de *AGO1* durante el desarrollo está limitado por la severidad del fenotipo causado por su mutación, ya que la pérdida completa de función de *AGO1* es letal (Vaucheret *et al.*, 2004), los alelos hipomorfos más fuertes apenas pueden pasar de las primeras etapas del desarrollo (Kidner y Martienssen, 2005; Vaucheret, 2008) mientras que los débiles en muchas ocasiones no llegan a mostrar un fenotipo evidente. En este trabajo hemos caracterizado un nuevo alelo hipomorfo de *AGO1*, el mutante *moss*, con un fenotipo relativamente moderado (la planta es capaz de completar a los estadios iniciales del desarrollo y hacer la transición floral) que le permite desarrollar la totalidad de las estructuras de un adulto aunque con importantes alteraciones. Esto hace del mutante *moss* un alelo especialmente útil para el estudio del papel de *AGO1* en el desarrollo, particularmente el de órganos laterales. A continuación se discuten algunas de las funciones de *AGO1* en el desarrollo que se ponen de manifiesto con el estudio del mutante *moss*.

### 1.2 El fenotipo del mutante *moss* sugiere un papel para *AGO1* en la actividad del SAM

El fenotipo del mutante *moss* está causado por una mutación hipomorfa moderada del gen *AGO1* que se hereda como un carácter recesivo. Sin embargo, para observar la segregación 1:4 típica de este tipo de mutaciones, hubo que favorecer al máximo las condiciones de cultivo de las plantas para que éstas pudiesen sobrevivir a las etapas iniciales del desarrollo. Así, hubo que sembrar las semillas en placas con medio de cultivo, ya que en condiciones estándar (siembra en tierra) las semillas mutantes mostraban problemas de germinación y/o supervivencia. Por otro lado, el mutante *moss* presenta una baja producción de hojas al inicio del desarrollo. Estas dos observaciones sugieren que el mutante *moss* presenta problemas en la actividad del SAM. Además, en la misma línea que nuestros resultados, existen alelos fuertes de *ago1* con bajas tasas de supervivencia y que en un alto porcentaje no llegan a desarrollar órganos aéreos (Kidner y Martienssen, 2005). Por lo tanto, *AGO1* podría tener un papel en la actividad del SAM. En concreto, los resultados de Kidner y Martienssen (2005) a partir de cruces entre diferentes alelos de *ago1* y mutantes de genes implicados en la función del SAM sugieren que *AGO1* participa en la regulación de la actividad del SAM a través de *STM*, e independientemente de la ruta *WUS/CLV*.

### 1.3 La pérdida de función de *AGO1* afecta a la identidad del meristemo floral

La mutación *moss* provoca un notable incremento en el número de inflorescencias, algo que también se observa en el mutante *ago1-26*. Las mutaciones que afectan a la identidad del meristemo floral provocan la transformación de las flores en estructuras inflorescentes. Esto sucede, por ejemplo, en los mutantes *lfy* y *ap1* y en los dobles mutantes *lfy ap1* (Schultz and Haughn, 1991; Huala and Sussex, 1992; Weigel *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993) y *ap1 cal* (Kempin *et al.*, 1995). Las transformaciones son más dramáticas cuanto mayor es el número de genes de identidad del meristemo floral afectados, como por ejemplo, en el caso del triple mutante *ap1 cal ful* (Ferrándiz *et al.*, 2000) que tras el *bolting* sólo produce meristemos axilares que dan lugar a nuevas ramificaciones, sin producir flores incluso seis meses después de haber germinado. Por lo tanto, el incremento en el número de inflorescencias observado en los mutantes *moss* y *ago1-26* sugiere que la pérdida de función de *AGO1* afecta a la identidad del meristemo floral.

En ocasiones, la pérdida de función de genes de identidad del meristemo floral va acompañada con la aparición de flores sustentadas por brácteas, como sucede en los mutantes de los genes *LFY* (Schultz and Haughn, 1991; Nilsson *et al.*, 1998), *UFO* (Hepworth *et al.*, 2006), *BLADE ON PETIOLE* (Norberg *et al.*, 2005) y *PUCHI* (Karim *et al.*, 2009). Tal como ocurre en esos mutantes, en la base de las flores del mutante *moss* aparecen órganos filamentosos que, por posición y presencia de tricomas, podrían ser brácteas modificadas. Indirectamente, esto también sugiere un defecto en la identidad del meristemo floral en este mutante. Es interesante mencionar que otros alelos mutantes de *AGO1* también presentan estos órganos filamentosos en la base de sus flores (Kidner and Martienssen, 2005).

Por último, al igual que en el mutante *moss*, en los alelos mutantes de *AGO1* analizados en el trabajo de Kidner y Martienssen (2005) también aparecen alteraciones en la propia flor, concretamente, la sustitución de órganos florales por filamentos. Esto sugiere que *AGO1* no sólo es necesario para la identidad del meristemo floral, sino que además, tiene un papel en la identidad de los órganos de la flor.

### 1.4 La alteración del patrón de expresión *TFL1* podría contribuir a los defectos relacionados con la identidad del meristemo floral en los mutantes *ago1*

Según lo discutido anteriormente, el aumento del número de inflorescencias secundarias observado en las plantas *moss* y *ago1-26* sugiere que la identidad del meristemo floral se ve afectada por la mutación en *AGO1*. La expresión constitutiva de *TFL1* provoca un aumento del número de inflorescencias secundarias (Ratcliffe *et al.*, 1998). El hecho de que *TFL1* se exprese fuertemente en el SAM de las plantas *moss*, sugiere que el aumento del número de inflorescencias secundarias en estas plantas está causado por el cambio en la expresión de *TFL1*. La reversión de este fenotipo al introducir la mutación *tfl1* en el fondo *moss*, indica que la alteración del patrón de expresión de *TFL1* causada por la pérdida de función de *AGO1*



contribuye al aumento del número de inflorescencias secundarias en el mutante *moss*.

Por otro lado, la aparición de órganos filamentosos tipo bráctea en las plantas *moss*, parece independiente de *TFL1*, ya que el doble mutante *moss tfl1-2* sigue presentando dichos órganos en la base de algunas de sus flores.

### 1.5. Posibles modelos para explicar la regulación de *TFL1* por *AGO1*

Nuestros resultados sugieren que *AGO1* regula la expresión de *TFL1*, pero desconocemos la manera en que lo hace. Se puede pensar en distintos modelos para explicar dicho control basados en el papel de *AGO1* como componente clave del complejo RISC que induce el silenciamiento génico mediado por sRNAs (Figura D.1).

En un primer modelo, *AGO1* podría regular directamente a *TFL1* a través de miRNAs que interaccionarían con el mensajero de *TFL1*, impidiendo su traducción o promoviendo su degradación. Este modelo choca con el hecho de que el mutante *moss* se identificó a partir de la mutagénesis de una línea con una construcción delatora *TFL1pro::GUS* en la que sólo está presente la 5'UTR del gen *TFL1*. Por lo tanto, este modelo sólo sería válido si en la 5'UTR de *TFL1* existieran dianas de miRNAs. Sin embargo, los programas informáticos de predicción de este tipo de dianas (Rusinov *et al.*, 2005) no encuentran buenas secuencias candidatas en la 5'UTR de *TFL1* (resultados no mostrados).

Esto abre la puerta a una segunda posibilidad, basada en que la construcción delatora de la mutagénesis sí contiene las regiones no codificantes que flanquean a *TFL1*. En este segundo modelo, *AGO1* podría silenciar la expresión de *TFL1* a través de su metilación mediada por sRNAs. De acuerdo con esta hipótesis, existe una región situada en el 5' no codificante de *TFL1*, a 700 pb de su inicio de transcripción, que se encuentra fuertemente metilada, según los datos de The Salk Institute Arabidopsis Epigenome (Lister *et al.*, 2008), y donde los programas informáticos antes comentados han predicho la existencia de sitios de reconocimiento de sRNAs. Esta región coincide con un elemento transponible del tipo hAT-MITE que aparentemente influye en la actividad del promotor de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010). En contra de este modelo, hay que mencionar que este elemento transponible se encuentra presente en el 5' del gen *TFL1* de *Col* pero no en el de *Ler*, ecotipo del cual procede el fragmento de DNA utilizado para generar la construcción delatora *TFL1pro::GUS* empleada en la mutagénesis.

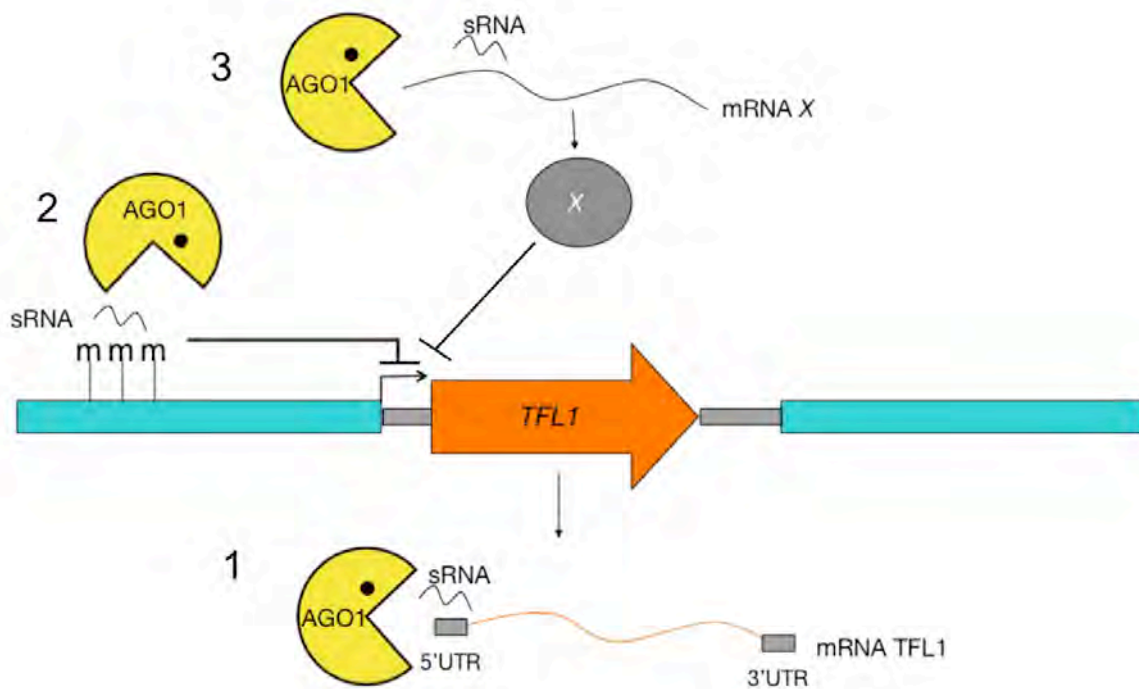
Estas consideraciones sugieren un tercer modelo, en el que *AGO1* controlaría la expresión *TFL1* de forma indirecta, al regular a genes que a su vez serían represores de *TFL1*. *LFY* y *API* son buenos candidatos a posibles intermediarios entre *AGO1* y *TFL1*, ya que son represores conocidos de *TFL1* que además, aparentemente están regulados por *AGO1*, hallándose su expresión fuertemente reducida en plantas con una pérdida parcial de función de *AGO1* (Kidner and Martienssen, 2005). En esta línea, se conoce la regulación de *LFY* por miRNAs a través de la ruta de inducción floral mediada por las giberelinas. Concretamente, las giberelinas promueven la expresión del miR159, que a su vez, controla los niveles del mensajero

del factor de transcripción GAMYB33, que directamente se une al promotor de *LFY* (Blázquez and Weigel, 2000; Gocal et al., 2001; Achard et al., 2004)

Además, este modelo también explicaría la expresión ectópica de *TFL1* observada en las flores de la plantas *moss*, ya que resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que *TFL1* se expresa en las flores de los mutantes *lfy* y *ap1* (Serrano-Mislata, 2010).

Pese a que *LFY* y *API* son buenos candidatos a actuar de intermediarios entre *AGO1* y *TFL1*, no podemos descartar la implicación de otros genes en ese proceso. Así, la activación temprana de *TFL1* observada en el SAM del mutante *moss* sugiere esta posibilidad, ya que durante el desarrollo temprano de *Arabidopsis* *API* no se expresa y *LFY* lo hace muy débilmente. Esto sugiere la existencia de otro regulador de *TFL1* cuya expresión requiere una proteína AGO1 funcional.

En resumen, la mutagénesis de una línea delatora del gen *TFL1* ha resultado ser una buena estrategia para la identificación de genes que, como *AGO1*, regulan la expresión de *TFL1* y, por lo tanto, la arquitectura de la inflorescencia.



**Figura D.1. Posibles modelos para la regulación de *TFL1* por AGO1.** (1) AGO1 podría regular directamente o la estabilidad o la traducción del mensajero de *TFL1*. (2) AGO1 podría metilar del promotor de *TFL1*. (3) La proteína AGO1 podría reprimir a *TFL1* de manera indirecta, a través de un gen intermediario.

## 2. Análisis comparativo de las secuencias no codificantes de ortólogos de *TFL1* en especies de brasicáceas

### 2.1. Conservación modular de las secuencias no codificantes de los genes *TFL1* de brasicáceas

Nuestro trabajo muestra cómo las regiones 5' y 3' que flanquean a los genes ortólogos de *TFL1* en cinco especies de brasicáceas contienen varias regiones de secuencia no codificante conservadas a las que hemos denominado módulos. En total, el número de módulos identificados ha sido de siete, localizándose en 5' dos de ellos y en 3', los cinco restantes.

La utilización de métodos de genómica comparativa para el análisis de promotores ha demostrado su validez en la identificación de elementos conservados que tienen una función reguladora (Asakura *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Picot *et al.*, 2010). Esto sugiere que las siete regiones conservadas que hemos identificado son importantes para la regulación de *TFL1*.

La estructura del promotor de un gen es compleja, siendo imposible esquematizarla en una estructura estándar que describa a la gran mayoría de los promotores (Wray *et al.*, 2003). Los sitios de unión a factores de transcripción comprenden una pequeña parte del promotor, no superior al 20% de su tamaño y normalmente se hallan dispersos entre regiones de secuencia que no contiene sitios de unión (Wray *et al.*, 2003). A menudo, varios sitios de unión a factores de transcripción aparecen agrupados en una región reguladora capaz de controlar parte del patrón de expresión de ese gen (Hoch *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 2005), formando lo que se conoce con el nombre de módulo regulador (Arnone y Davidson, 1997; Priest *et al.*, 2009). En principio, eliminando toda la secuencia sin función aparente que hay entre estos módulos reguladores, sería posible reproducir el patrón de expresión del gen. Trabajos como el de (Lee *et al.*, 2005) apoyan esta idea. Así, en ese trabajo se muestra cómo un promotor artificial construido con cinco módulos conservados entre ortólogos del gen *CRC* de *Arabidopsis* es capaz de reproducir su patrón de expresión y complementar el fenotipo de la pérdida de función de *CRC*.

En nuestro caso, recientemente hemos podido comprobar que los siete módulos conservados que hemos identificado en el promotor de *AtTFL1* son suficientes para regular su expresión (Serrano-Mislata, comunicación personal). De esta manera, hemos logrado reducir el promotor de *AtTFL1* de un tamaño cercano a las 7 Kb, suma de la 5' y 3' NCS, a tan sólo 2.8 Kb, que es la suma de los siete módulos. Del mismo modo, en el futuro sería interesante estudiar qué ocurre al dirigir la expresión de *AtTFL1* o *GUS* con módulos aislados o combinaciones de ellos. Esto permitiría elucidar qué parte del patrón de expresión total de *AtTFL1* está regulado por cada módulo. Finalmente, los resultados presentados en este trabajo muestran cómo la utilización de métodos de genómica comparada puede complementar el análisis funcional de promotores mediante abordajes más clásicos, facilitando el diseño experimental.

## 2.2. Posible papel de los módulos conservados en la regulación de *TFL1*

Una cuestión de interés es si los módulos conservados en el promotor de los genes *TFL1* de brasicáceas pueden considerarse verdaderos módulos reguladores. Como hemos explicado anteriormente, un módulo regulador posee dos características: tiene una función, al encargarse del control de una parte del patrón de expresión del gen y está formado por varios sitios de unión a factores de transcripción que se encuentran muy próximos en el genoma. A continuación, se usarán los resultados de este trabajo junto con los del análisis de deleciones realizado en la Tesis Doctoral de Antonio Serrano Mislata (Serrano-Mislata, 2010) para discutir el posible papel de los módulos conservados en la regulación de *TFL1*.

La primera conclusión del análisis por deleciones del promotor de *AtTFL1* fue la importancia de la región 3'NCS en la regulación de *AtTFL1*, al contener la mayoría de elementos reguladores. Así pues, del fragmento genómico del ecotipo *Ler* comprendido entre los dos genes que flanquean a *AtTFL1* (2.2 Kb de 5'NCS, el gen *AtTFL1* y 4.6 Kb de 3'NCS), la región mínima que resultó contener todos los elementos para complementar el fenotipo del mutante *tfl1-1*, incluyó 3.6 Kb de la 3'NCS y tan sólo 0.3 Kb de la 5'NCS. De acuerdo con esto, los resultados de este trabajo muestran que, entre los ortólogos de *AtTFL1* comparados, la 3'NCS está más conservada que la 5'NCS (Figura C2.7).

Asimismo, en el análisis de deleciones, se identificaron en el promotor de *AtTFL1* varias regiones reguladoras que controlan diferentes aspectos del patrón de expresión global de *AtTFL1*. Los módulos conservados número 2, 4, 5 y 6 solapan con esas regiones reguladoras del promotor de *AtTFL1*, indicando que dichos módulos tienen un papel en la regulación de *AtTFL1*.

Así pues, el módulo 2 corresponde a las -100 pb adyacentes al ATG de *AtTFL1* que se engloban en una región de -282 pb dentro de la 5'NCS que el análisis de deleciones mostró que es indispensable para la regulación de *TFL1*. Esta región parece contener, sobre todo, elementos reguladores del nivel de expresión, ya que su eliminación mantiene el patrón espacial y temporal pero a un nivel tan bajo que no es capaz de complementar al mutante *tfl1-1*.

El módulo 4 coincide con la región situada entre +1.0 Kb y +1.3 Kb de la 3'NCS y que, según el análisis de deleciones, es necesaria para la expresión de *AtTFL1* en el meristemo vegetativo, e inflorescente, además de contener elementos reguladores para el tiempo de floración y la identidad de los meristemos axilares, ya que la deleción de esta región produjo un adelanto de la floración, así como la sustitución de coflorescencias por flores axilares.

El módulo 5, entre +1.5 Kb y +2.0 Kb de la 3'NCS, está dentro de una región localizada entre +1.6 Kb y +2.2 Kb a la que el análisis de deleciones ha relacionado con la regulación de la expresión de *AtTFL1* en los meristemos axilares jóvenes y la represión en flores. La eliminación de esta región provoca principalmente la aparición de expresión ectópica en los receptáculos florales así como una bajada de la expresión en meristemos axilares jóvenes que coincide con una sustitución de inflorescencias terciarias por flores axilares.

Por último, el módulo 6 coincide completamente con otro elemento importante identificado en el análisis de deleciones del promotor de *AtTFL1*, localizado entre +2.8 Kb y +3.2 Kb de la 3'NCS, cuya eliminación provoca que la expresión desaparezca del meristemo inflorescente, con la consiguiente aparición de la flor terminal. Por otro lado, todas las especies de brasicáceas utilizadas en este estudio presentan la misma arquitectura (racimo simple) con excepción de *L. crassa*, que presenta una inflorescencia de roseta. Del mismo modo, este módulo se encuentra conservado en todas las especies excepto *L. crassa*, lo que sugiere la posibilidad de que contenga elementos reguladores importantes que contribuyan a la diferencia en arquitectura entre *L. crassa* y el resto de especies analizadas.

En conclusión, la mayoría de los módulos conservados entre las cinco especies de brasicáceas coinciden con elementos identificados experimentalmente que controlan diferentes aspectos del patrón de expresión de *AtTFL1*. Este resultado sugiere que los módulos conservados funcionan como verdaderos módulos reguladores. Además, como el tamaño de los módulos conservados suele ser menor que el de las regiones identificadas en el análisis de deleciones, nuestro trabajo es útil para refinar el análisis de estas regiones.

### **2.3. Utilidad de los módulos conservados para la predicción de dianas de factores de transcripción que regulan a *TFL1***

Siguiendo con la idea de que los módulos conservados identificados en este trabajo podrían funcionar como módulos reguladores, una vez que se ha propuesto un papel regulador para algunos de estos módulos, lo siguiente sería la identificación de sitios de unión a factores de transcripción en ellos. El rastreo efectuado para la búsqueda de estas dianas, ha permitido identificar un elevado número de posibles secuencias candidatas. Por supuesto, debido a que las secuencias de reconocimiento para la unión de factores de transcripción son cortas e imprecisas, en la mayoría de los casos, se pueden encontrar cientos de ellas en las inmediaciones de un gen (Wray *et al.*, 2003). Basándonos en la idea de que la selección natural actúa de distinta forma sobre regiones del promotor con un papel en el control de la expresión génica que sobre regiones sin función, con el fin de reducir el número de falsos positivos (Wasserman y Sandelin, 2004), se decidió tener en cuenta solamente aquellos sitios de unión que estuvieran dentro de los módulos conservados y que además tuvieran un alto grado de conservación entre las especies de brasicáceas empleadas en este estudio. Finalmente, el número de potenciales dianas de factores de transcripción se limitó a algo más de una treintena (Figura C2.7, Tabla C2.1 y alineamientos S2 y S3).

De entre todas ellos, el grupo más numeroso fue el de cajas CArG, a las que se unen factores de transcripción de la familia MADS (Riechmann *et al.*, 1996), lo que está en consonancia con el gran número de candidatos de esta familia de factores de transcripción a regular a *TFL1*. Un caso destacado es el de AP1, un factor de transcripción cuya relación

antagónica con *TFL1* en la identidad del meristemo es bien conocida desde mucho tiempo (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999; Ferrándiz *et al.*, 2000). La proteína AP1 se ha demostrado, mediante un experimento de CHIP-Seq, que interacciona con dos regiones de la 3'NCS de *AtTFL1* (Kaufmann *et al.*, 2010) que parecen coincidir claramente con dos cajas CArG identificadas en nuestro trabajo, concretamente las cajas localizadas en las posiciones +1008 pb y +1792 pb de la 3'NCS de *AtTFL1* y que se encuentran altamente conservadas dentro de los módulos 4 y 5 respectivamente (alineamiento S3). Teniendo en cuenta el posible papel que hemos discutido para estos dos módulos en la regulación de *AtTFL1*, la función de la unión de AP1 a estos dos sitios podría ser la represión de *TFL1* en las flores evitando así el desarrollo de las flores ramificadas típicas del mutante *apl-1* (Serrano-Mislata, 2010). Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de nuestra estrategia para la predicción de elementos reguladores clave en los promotores de los genes.

De acuerdo con los datos de expresión de líneas con la construcción *TFL1pro::GUS* en diferentes fondos genéticos mutantes para genes de la familia MADS (Serrano-Mislata, 2010), otros factores de transcripción MADS candidatos a unirse a otras cajas CArG predichas en este estudio serían FUL, AGL24, SOC1, SVP y FLC. Según ese análisis, FUL reprimiría la expresión de *TFL1* de los frutos, AGL24 y SOC1 podrían activar la expresión de *TFL1* en el meristemo inflorescente, mientras que SVP y FLC parece que reprimirían su expresión. Por otra parte, FLC es capaz de unirse a los módulos 4 y 6 en experimentos de híbrido simple (capítulo 3 de este trabajo).

Otro candidato a regular a *TFL1* es el gen *LFY*. Existen varios trabajos previos que apoyan la posible regulación transcripcional de *TFL1* por parte de *LFY* (Parcy *et al.*, 2002; Ratcliffe *et al.*, 1999). El análisis de Serrano-Mislata (Tesis Doctoral, 2010) sugirió que *LFY* regula la expresión de *TFL1* en el ápice de *Arabidopsis* a través de dos mecanismos distintos. Por una parte, *LFY* reprimiría la expresión de *TFL1* en las flores y, por otra, *LFY* podría activar la expresión de *TFL1* en el meristemo inflorescente. Además, recientemente se ha demostrado la unión *in vivo* de *LFY* al promotor de *TFL1* a aproximadamente +2.8 Kb del codón de parada (Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011). En el presente trabajo se han predicho dos potenciales sitios de unión de la proteína *LFY* que se encuentran conservados dentro del módulo 6 y cuya localización, a +2827 y +2855 pb en 3', concuerda con esos resultados.

En los módulos 3 y 4 se ha predicho la unión de factores de transcripción bZIP. Un miembro de esta familia, FD, interacciona con la proteína FT para activar la transcripción de *API* (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005). *FD* se expresa en el ápice inflorescente (Abe *et al.*, 2005), coincidiendo parte de su dominio de expresión con el de *TFL1*, lo que podría sugerir que *FD* quizás también regule la expresión de *TFL1*.

Por último, existen al menos otros cuatro potenciales sitios de unión detectados en nuestro estudio que también deben ser considerados. Los dos primeros se corresponderían con dos posibles elementos de respuesta a auxinas localizados en el módulo 2. Estos sitios ya habían

sido anteriormente señalados en un estudio que sugiere un posible papel para *TFL1* en la inducción de inflorescencias mediada por auxinas (Guan *et al.*, 2006).

El siguiente sitio es un elemento de respuesta a giberelinas situado en el módulo 6 y que sugiere que las giberelinas podrían regular la expresión de *TFL1*. De acuerdo con esta posible regulación, la aplicación exógena de GA3 a plantas mutantes en los tres receptores de giberelinas *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1)*, *gid1a gid1b gid1c*, incrementa el nivel de expresión de *TFL1* (Willige *et al.*, 2007).

El cuarto sitio, localizado en el módulo 6 se trata de una diana para factores de transcripción de la familia TCP. En el capítulo 3 se muestra cómo la proteína TCP7 es capaz de unirse específicamente a este sitio en ensayos de híbrido simple.

Como conclusión general, la comparación de las secuencias de los promotores de genes ortólogos entre especies cercanas (*phylogenetic shadowing*) es una potente herramienta para la identificación de regiones potencialmente importantes para la regulación de un gen. En este trabajo hemos podido comprobar cómo gran parte de las regiones detectadas con este método en el promotor de *TFL1* se corresponden con regiones reguladoras identificadas experimentalmente. Del mismo modo, esta estrategia también resulta útil para la predicción de sitios de unión a factores de transcripción. En este trabajo hemos identificado varios de ellos en el promotor de *TFL1*, muchos de los cuales son buenos candidatos a participar en la regulación de *TFL1*. Además, algunos de estos sitios solapan con regiones donde se ha demostrado la unión *n vivo* de AP1 y LFY. Para el resto de sitios de unión predichos, puesto que un fragmento de secuencia por sí sólo no es suficiente para revelar qué factor de transcripción se une a él, sería necesario determinar si la unión realmente se produce y si ésta tiene alguna consecuencia en el patrón de expresión final de *TFL1*, lo que nos permitiría dar un sentido biológico a estos posibles TFBSs identificados. La utilización de los módulos aquí identificados para llevar a cabo ensayos de híbrido simple con los que identificar los factores de transcripción que pueden interaccionar con ellos, así como el uso de técnicas *in vivo*, como la inmunoprecipitación de cromatina, para analizar la unión de aquellos factores de transcripción mejor valorados como candidatos a regular a *TFL1*, serían dos posibles vías con las que continuar este trabajo.

### 3. Nuevos posibles reguladores de *TFL1* identificados por híbrido simple

Los diferentes escrutinios de híbrido simple llevados a cabo sobre las regiones 1.0-1.3*TFL1*pro y 2.8-3.2*TFL1*pro han mostrado la unión al promotor de *TFL1* de tres factores de transcripción, VOZ1, TCP7 y FLC, que nunca antes habían sido propuestos como potenciales reguladores de *TFL1*. Este hallazgo supone dos implicaciones de interés. En primer lugar, un punto de partida para conocer nuevos factores de transcripción que controlan a *TFL1* de forma directa. Esto resulta de interés ya que se sabe muy poco acerca de qué factores de transcripción regulan a *TFL1*. Hasta la fecha sólo se tiene constancia de la regulación directa de *TFL1* por AP1 y LFY (Kaufmann *et al.*, 2010; Moyroud *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011), factores de

transcripción que ya se propusieron como reguladores de *TFL1* hace más de una década (Liljegren *et al.*, 1999; Ratcliffe *et al.*, 1999; Ferrándiz *et al.*, 2000; Parcy *et al.*, 2002). En segundo lugar, estos resultados validan la utilidad de la aproximación descrita en el capítulo 2 de este trabajo, ya que los dos fragmentos del promotor de *TFL1* utilizados para los ensayos de híbrido simple procedían de módulos conservados identificados por *phylogenetic footprinting*. De hecho, en el análisis informático llevado a cabo sobre esos módulos para predecir la existencia de sitios de unión de factores de transcripción, ya sugirió la posibilidad de que proteínas de la familia MADS o TCP, como FLC y TCP7 participaran en la regulación de *TFL1*.

Como se ha comentado, los resultados de híbrido simple obtenidos son el inicio de futuras investigaciones que permitan elucidar si VOZ1, TCP7 y FLC realmente son reguladores directos de la expresión de *TFL1*. En el presente trabajo, decidimos continuar con TCP7, pero no por eso consideramos menos importantes a los otros dos candidatos.

De hecho, en nuestro laboratorio, J.A. Zambrano ha empezado una nueva línea de trabajo, centrada en el análisis de la función del gen *VOZ1*, que está dando resultados muy prometedores. Hasta el momento, pese a no haberse encontrado ningún sitio de unión para la proteína VOZ1 en la región 2.8-3.2*TFL1*pro, se han obtenido nuevos datos que sugieren la unión *in vivo* al promotor de *TFL1*. Además, se ha podido observar que tanto las plantas con pérdida como con ganancia de función de VOZ1 presentan alteraciones en el tiempo de floración y la arquitectura de la inflorescencia que se correlacionan con alteraciones en la expresión de *TFL1* (Bradley *et al.*, 1997; Ratcliffe *et al.*, 1998).

Respecto a *FLC*, en nuestro grupo se han obtenido evidencias que sugieren una posible función represora sobre *TFL1* derivadas del análisis de la expresión de *TFL1*pro::GUS en plantas 35S::FLC (Serrano-Mislata, 2010). Además, existen varias posibles cajas CArG posibles conservadas en las dos regiones del promotor de *TFL1* a las que, según el híbrido simple, se une FLC. No obstante, su unión a esas regiones no ha podido confirmarse mediante ChIP. Ni a través de la colaboración del Dr. C. Helliwell, que intentó cuidadosamente, pero sin éxito, un experimento de ChIP para detectar la unión de FLC al promotor de *TFL1*. Ni tampoco recientemente, en el trabajo de Deng *et al.*, (2011) que describe las dianas de FLC en el genoma de *Arabidopsis* mediante una estrategia a gran escala como es el ChIP-Seq. Por este motivo, sería interesante estudiar con más detalle tanto la posible unión de FLC al promotor de *TFL1* (utilizando otras técnicas distintas al ChIP), como el efecto de la pérdida de función de *FLC* en la expresión de *TFL1*. La comparación de los niveles del mRNA de *TFL1* en plantas silvestres con *FLC* activo (como el ecotipo C24 de *Arabidopsis*) respecto al mutante *flc-20* (Finnegan *et al.*, 2004) sería un buen ejemplo para comenzar.



## 4. Función del gen *TCP7* en el control de la arquitectura de la planta a través de la regulación de *TFL1*

El hecho de que *TCP7* fuera el único gen, entre los tres candidatos a regular a *TFL1* identificados en este trabajo, del que se desconocía totalmente su función fue el principal motivo por el que decidimos profundizar más en su estudio. A menudo, la caracterización individual de genes pertenecientes a la familia TCP ha sido una ardua tarea debido al fenotipo poco o nada evidente de sus mutantes simples y de sus líneas de sobreexpresión, principalmente para los genes del clado PCF, al que pertenece *TCP7* (Li *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006; Tatematsu *et al.*, 2008; Pruneda-Paz *et al.*, 2009). Este hecho ha sido interpretado como indicativo de la existencia de una alta redundancia funcional entre los miembros de esta familia de genes (Martín-Trillo y Cubas, 2010). No obstante, nuestros resultados con las plantas *TCP7*-RNAi y sobre todo, con las 35S::*TCP7*, muestran que cambios en la expresión de *TCP7* causan alteraciones fácilmente reconocibles en los rasgos de la planta. Así, las plantas *TCP7*-RNAi y 35S::*TCP7* presentan problemas en los distintos tipos de órganos laterales, ya sean hojas, inflorescencias laterales (a nivel de desarrollo y complejidad de su arquitectura) o frutos, así como también, en la disposición (problemas de filotaxis) e identidad de estos (inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares o la formación de flores terminales). En el clado PCF sólo se había observado un fenotipo tan evidente para la expresión constitutiva de *TCP20* (Hervé *et al.*, 2009). Por lo tanto, el gran número de defectos originados por cambios en la expresión de *TCP7* sugiere que este gen tiene un papel importante en el control del desarrollo de los órganos laterales que es difícilmente sustituible por otros genes de la misma familia.

### 4.1. Papel de *TCP7* en la actividad del SAM y en la transición floral

El fenotipo de retraso en el plastocrono de las plantas 35S::*TCP7* podría indicar problemas en la actividad del SAM. Del mismo modo, las plantas 35S::*TCP7* presentaron un retraso en la floración, lo que sugiere una posible e interesante relación entre *TCP7* y los genes de tiempo de floración.

### 4.2. Papel de *TCP7* en el desarrollo de la hoja

La hoja es, quizás, uno de los órganos laterales que más claramente parecen estar relacionados con *TCP7*. Los resultados preliminares obtenidos con plantas, tanto *TCP7*-RNAi como 35S::*TCP7*, mostraron alteraciones en este órgano. Dentro del clado PCF, además de *TCP7*, *TCP20* se ha asociado al desarrollo de la hoja, ya que la alteración de su función provoca defectos en este órgano (Hervé *et al.*, 2009). Resulta particularmente interesante la similitud de las hojas de las plantas 35S::*TCP7* con las de las plantas con pérdida parcial de función de genes *TCP* del clado CIN (Palatnik *et al.*, 2003; Schommer *et al.*, 2008). En ambos casos se produce un aumento del tamaño y una proliferación irregular de los bordes de la hoja, confirmando a ésta

una forma aserrada. Los genes del clado CIN, particularmente los regulados por el miR319 (los genes *TCP2*, *TCP3*, *TCP4*, *TCP10* y *TCP24*) son clave en el desarrollo de la hoja y su pérdida total de función provoca un fenotipo mucho más extremo, con hojas aún mayores y aserradas. (Palatnik *et al.*, 2003; Schommer *et al.*, 2008; Efroni *et al.*, 2008). Las proteínas TCP del clado CIN inducen la diferenciación celular de la hoja al reprimir indirectamente a los genes *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* (Koyama *et al.*, 2007; Koyama *et al.*, 2010), que regulan positivamente la actividad de los genes *KNOX*, los cuales promueven un destino celular indiferenciado (Aida *et al.*, 1999; Hibara *et al.*, 2003). Los TCPs del clado CIN ejercen esta represión a través de la activación transcripcional de tres grupos de genes. Por un lado, *ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)* (Koyama *et al.*, 2010) que regula negativamente a los genes *CUC* (Hibara *et al.*, 2003). Por otro lado, MIR164 (Koyama *et al.*, 2010), que codifica el miR164, que marca específicamente los transcritos de los genes *CUC* para su degradación (Sieber *et al.*, 2007). Y por último, reprimiendo la transcripción de represores de las auxinas (Koyama *et al.*, 2010), hormonas que participan en el control del patrón de expresión de los genes *CUC* (Furutani *et al.*, 2004; Heisler *et al.*, 2005; Bilsborough *et al.*, 2011) (Figura D.2). Puesto que en el caso de *TCP7*, es su sobreexpresión lo que causa un fenotipo similar al de la pérdida de función de los TCPs del clado CIN, nuestros resultados sugieren que *TCP7* se comportaría de forma opuesta a los genes tipo CIN, impidiendo la diferenciación de la hoja. Esta posibilidad se ve de algún modo también apoyada por la idea de que ambos clados de genes TCP desempeñan funciones opuestas en lo que al crecimiento celular se refiere (Li *et al.*, 2005; Broholm *et al.*, 2008; Martín-Trillo y Cubas, 2010). Actualmente, se conoce la conexión entre genes del clado PCF y la inducción del crecimiento celular a través de la regulación positiva de genes de biosíntesis de proteínas y del ciclo celular (Kosugi y Ohashi, 1997; Trémousaygue *et al.*, 2003; Tatematsu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006; Tatematsu *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2009; Giraud *et al.*, 2010). Sin embargo, nuestros resultados abren la posibilidad de que un gen tipo PCF, como *TCP7*, pueda promover el crecimiento celular por otras vías, como, por ejemplo, a través de los genes *CUC*, la señalización de auxinas o, incluso, reprimiendo la acción de los genes tipo CIN (Figura D.2). Por tal motivo, sería interesante analizar los niveles de estos genes en las plantas 35S::*TCP7*. En este sentido, en la caracterización de las líneas *TCP7*-RNAi sería importante analizar con detalle el fenotipo de sus hojas.

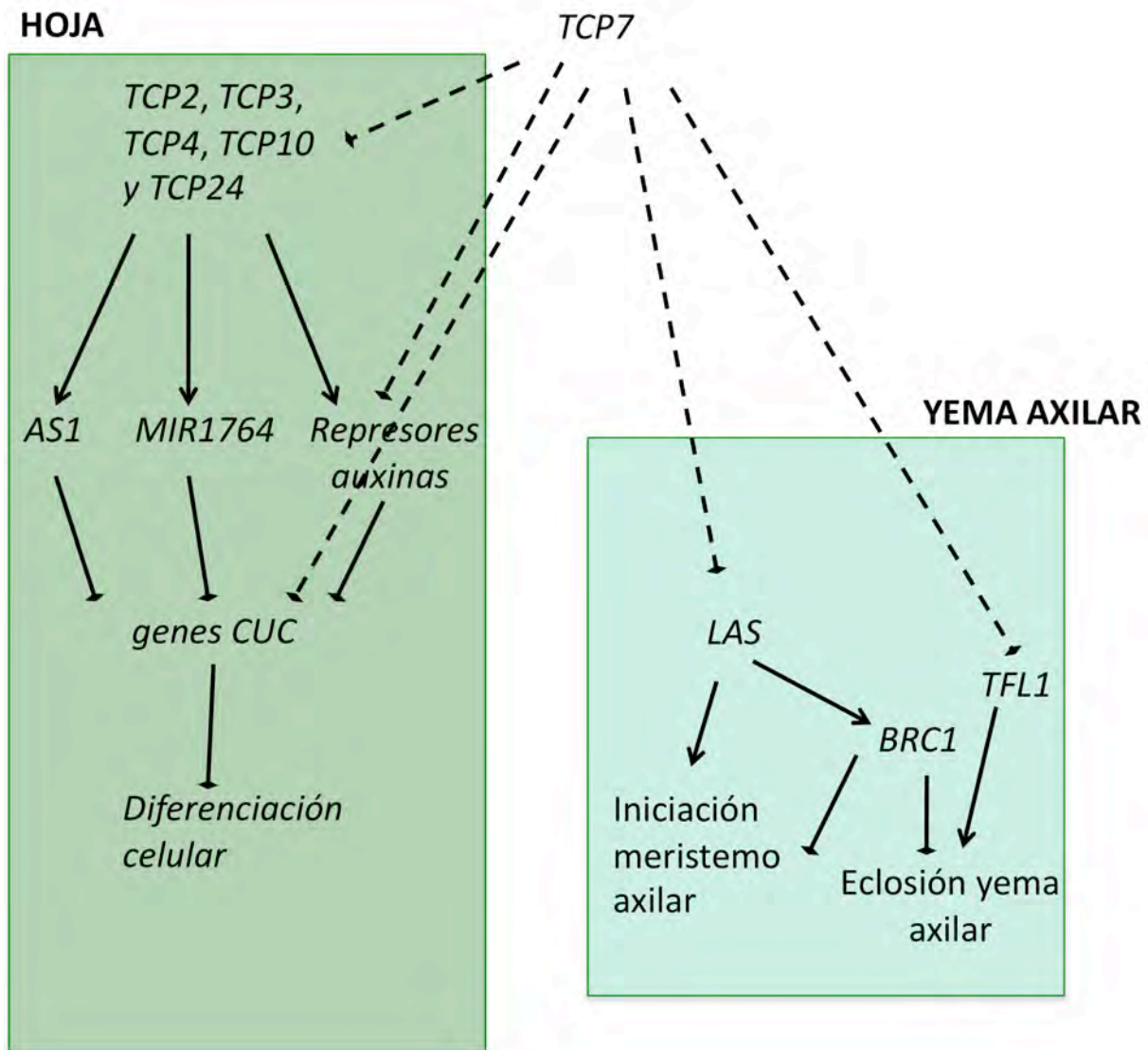
#### 4.3. Papel de *TCP7* en el desarrollo de las inflorescencias laterales

Otro de los aspectos que resultan interesantes de las plantas 35S::*TCP7* es su dominancia apical extrema, que relaciona a *TCP7* con el clado de la familia TCP que faltaba por comentar, el clado CYC/TB1, que en *Arabidopsis* está representado principalmente por *BRC1*. *BRC1* integra las señales que controlan la ramificación inhibiendo el desarrollo de las yemas axilares en *Arabidopsis* (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007). El bajo número de inflorescencias de roseta que se desarrollan en las plantas 35S::*TCP7* sugiere que *TCP7* podría actuar en el mismo sentido que

*BRC1*, inhibiendo el crecimiento de las yemas laterales (Figura D.2). Además, como en el caso del mutante *brc1*, las plantas 35S::TCP7 son insensibles a la decapitación. Si bien parece que pudiera existir relación entre *TCP7* y *BRC1*, más llamativa si cabe resulta la similitud entre el efecto de la expresión constitutiva de *TCP7* y el de la pérdida de función del gen *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)*, necesario para el establecimiento de los meristemos axilares que se forman en la base de las hojas (Greb *et al.*, 2003) y que parece actuar aguas arriba de *BRC1* (Aguilar-Martinez *et al.*, 2007) (Figura D.2). El mutante *las-4*, como las plantas 35S::TCP7, presenta una casi completa supresión de las inflorescencias de roseta, incluso tras decapitar la inflorescencia principal. Además, el parecido en este aspecto llega hasta el punto que ambas plantas tienen problemas en la ramificación de inflorescencias terciarias, es decir, en las inflorescencias secundarias de ambas plantas aparecen hojas caulinares sin meristemo axilar asociado (Greb *et al.*, 2003; este trabajo). Todo esto sugiere que *TCP7* y *LAS* tienen funciones opuestas en el control de los meristemos axilares. Finalmente, se ha descrito que *TCP7* se une al promotor de *LAS* en ensayos de híbrido simple (Eicker, 2005). En conjunto, estos datos sugieren que *TCP7* podría participar en el control de los meristemos axilares reprimiendo la expresión de *LAS*, y por lo tanto, actuando por encima de *BRC1* (Figura D.2). Para profundizar en esta posible e interesante conexión, sería importante analizar el patrón de expresión de *TCP7* en los meristemos axilares que se forman en la base de las inflorescencias de roseta de plantas silvestres, así como los niveles de *LAS* y del gen marcador de dormición de yemas *DRM1* (Stafstrom *et al.*, 1998; Tatematsu *et al.*, 2005) en plantas 35S::TCP7. En este sentido, en la caracterización de las líneas TCP7-RNAi sería importante analizar con detalle el desarrollo de las inflorescencias de roseta.

#### 4.4. Posible relación entre *TCP7* y las auxinas

Las auxinas son hormonas que promueven la dominancia apical (Cline, 1997; Napoli *et al.*, 1999) y además, en el SAM marcan los puntos donde posteriormente se desarrollarán los órganos laterales, controlando de esta manera la filotaxis (Stoma *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009). Por lo tanto, es fácil pensar que las auxinas pudieran estar involucradas en los fenotipos de menor desarrollo de inflorescencias de roseta de las plantas 35S::TCP7 y en los problemas en la filotaxis que presentan tanto estas plantas como también las plantas TCP7-RNAi. Adicionalmente, el fenotipo similar de las hojas de 35S::TCP7 con las del mutante en señalización de auxinas *auxin resistant1* (aunque este mutante tiene un fenotipo opuesto a 35S::TCP7 en lo que al desarrollo de inflorescencias de roseta se refiere; Lincoln *et al.*, 1990; Bilborough *et al.*, 2011) es otra evidencia que sugiere la relación entre las auxinas y *TCP7* (Figura D.2).



**Figura D.2. Modelo sobre el posible papel de TCP7 en los procesos del desarrollo de hoja y de la inflorescencia lateral.** →: interacción positiva. ⊥: interacción negativa. . Las líneas discontinuas indican relaciones hipotéticas.

#### 4.5. Participación de TCP7 en el control del reloj circadiano

El gen *TCP21* tiene un importante papel en el control del reloj circadiano a través de la regulación de *CCA1*, al unirse directamente a su promotor y reprimir su expresión (Pruneda-Paz *et al.*, 2009). Pese al alto grado de similitud entre las secuencias de *TCP7* y *TCP21*, los resultados del Giraud *et al.*, (2010) no apoyan la participación de *TCP7* en el control del reloj circadiano, ya que la proteína TCP7 no interacciona con ningún componente conocido de dicho reloj. Además, Pruneda-Paz *et al.*, (2009) ya descartó que otros TCPs diferentes a *TCP21* se unieran al promotor de *CCA1*. Por supuesto, estas observaciones no contradicen el hecho de que *TCP7* esté regulado por el reloj circadiano, tal como demuestra Giraud *et al.*, (2010). En nuestro caso, no se ha estudiado la relación de *TCP7* con el reloj circadiano, por lo que no podemos añadir nada nuevo en esta línea.

Por otro lado, el hecho de que los fenotipos de pérdida o ganancia de función de *TCP21* no causen ningún efecto en la arquitectura de la parte aérea de la planta (Pruneda-Paz *et al.*, 2009), al contrario de lo que pasa con *TCP7*, también sugiere que ambos genes realizan funciones distintas en Arabidopsis.

Las proteínas TCP a menudo interaccionan con otras proteínas (Martín-Trillo y Cubas, 2010). En las secuencias de las proteínas *TCP7* y *TCP21* se han predicho diferentes motivos que podrían tener una función de interacción proteína-proteína (Yao *et al.*, 2007). De esta forma, *TCP7* y *TCP21* podrían interaccionar con proteínas diferentes, lo que podría ser la causa del diferente papel biológico de *TCP7* y *TCP21*.

#### **4.6. *TCP7* reprime la expresión de *TFL1***

Dado que el objetivo general de este trabajo era encontrar nuevos reguladores de la expresión de *TFL1*, analizar si *TCP7* afecta a la expresión de *TFL1* ha sido uno de los principales objetivos. Debido al papel clave de *TFL1* en la arquitectura de la inflorescencia de Arabidopsis, algunos de los defectos en la arquitectura de las plantas 35S::*TCP7* posiblemente sean consecuencia de los cambios en la expresión de *TFL1*.

##### 4.6.1. Relación entre la disminución de los niveles de *TFL1* y los defectos en la arquitectura de las plantas 35S::*TCP7*

Nuestros resultados muestran que la expresión constitutiva de *TCP7* tiene un efecto negativo en la expresión de *TFL1* en el ápice inflorescente. Esta disminución en los niveles de *TFL1* podría explicar parte de los defectos en la arquitectura de la inflorescencia observados en las plantas 35S::*TCP7*.

Sin duda, el defecto que parece más relacionado con la disminución en la expresión de *TFL1* es la determinación de algunas inflorescencias laterales. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que los ápices de las inflorescencias presentan un umbral de expresión de *TFL1* por debajo del cual se determinarían, y que este umbral sería mayor cuanto más alto es el orden de ramificación (Serrano-Mislata, 2010). En esta línea, hemos visto que la reducción de la expresión *TFL1*pro::*GUS* en plantas 35S::*TCP7* es más acusada en las inflorescencias laterales que en la principal. Una mayor sensibilidad de las inflorescencias de mayor orden a disminuciones en los niveles de *TFL1* podría explicar porqué la determinación nunca se ha observado en la inflorescencia principal.

Sin embargo, otras anomalías presentes en la arquitectura de las plantas 35S::*TCP7* son difíciles de explicar, al menos aparentemente, basándose exclusivamente en una disminución de la expresión de *TFL1*. Así, el menor desarrollo de inflorescencias de roseta, la existencia de hojas caulinares sin inflorescencias asociadas en sus axilas, o la formación de inflorescencias laterales no sustentadas por hojas caulinares, son defectos que no se han observado en el mutante

*tfl1* o en el análisis de líneas con diferentes grados de complementación de la mutación *tfl1* llevado a cabo en nuestro laboratorio (Serrano-Mislata, 2010). Del mismo modo, el retraso en la floración de las plantas 35S::TCP7, es opuesto a lo que sucede en el mutante *tfl1* (Bradley *et al.*, 1997). Todos estos datos sugieren que *TCP7* podría participar en el control de la arquitectura de la planta de *Arabidopsis* tanto a través de mecanismos que implican a *TFL1*, como mediante mecanismos independientes de *TFL1*.

#### 4.6.2. *TCP7* podría regular a *TFL1* a través de la interacción con otros factores de transcripción

Las proteínas TCP pueden interactuar entre ellas (Kosugi y Ohashi, 1997; Aggarwal *et al.*, 2010) o con otras proteínas (Trémousaygue *et al.*, 2003; Weir *et al.*, 2004; Tatematsu *et al.*, 2005; Pruneda-Paz *et al.*, 2009). Estas interacciones pueden ser importantes para conferir a la proteína TCP afinidad por una determinada secuencia de DNA (Cubas, 2002; Martín-Trillo y Cubas, 2010), para que funcione como un activador o como un represor de la transcripción (Pruneda-Paz *et al.*, 2009; Hervé *et al.*, 2009) o incluso para delimitar el momento o lugar en el que el factor TCP debe actuar (Weir *et al.*, 2004). Por esto, no podemos descartar que *TCP7* necesite interactuar con otras proteínas para la correcta regulación de *TFL1*.

Entre los posibles candidatos a interactuar con *TCP7* proponemos varios factores de transcripción. Una primera posibilidad es que éste fuera otro TCP, dado que las proteínas TCP son capaces de formar homodímeros u heterodímeros entre ellas. Otros candidatos podrían ser los factores de transcripción tipo MADS, ya que estos pueden formar complejos con las proteínas TCP para unirse a los promotores de los genes a los que regulan (R. Immink, comunicación personal). En este trabajo hemos mostrado cómo cerca del posible sitio de unión de *TCP7* en el promotor de *TFL1* existen motivos que coinciden con cajas CARG, lo que apoyaría esta idea. Además, también hemos mostrado datos que indican la posible implicación de la proteína FLC, perteneciente a la familia MADS, en la regulación de *TFL1*. Por lo tanto sería interesante estudiar si FLC y *TCP7* pueden actuar de forma conjunta regulando a *TFL1*. Por último, el tercer candidato que nos parece interesante valorar es VOZ1. Resultados recientes han mostrado que VOZ1 es capaz de interactuar con *TCP7* en ensayos de BiFC (complementación bimolecular fluorescente; J.A. Zambrano y F. Madueño, comunicación personal), lo que sugiere que ambos factores de transcripción podrían actuar conjuntamente para regular a sus genes diana.

Por último, cabe la posibilidad de que *TCP7* no sea el único factor TCP que regula a *TFL1*. Es probable que los TCPs puedan competir entre ellos por la unión a una misma secuencia de DNA, especialmente si pertenecen a clases distintas de la familia TCP (Li *et al.*, 2005). Otro posible candidato de la familia TCP a regular a *TFL1* podría ser BRC1 (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007), ya que su expresión, en las yemas axilares, solapa con la de *TFL1*. Por este motivo, sería interesante analizar el patrón de expresión de *TFL1* en mutante *brc1* utilizando nuestra línea delatora *TFL1*pro::GUS. Del mismo modo, en colaboración con la Dra. P. Cubas (CNB, Madrid) se está analizando si BRC1 es capaz de unirse al promotor de *TFL1*.

Como conclusión final, los resultados discutidos en esta sección indican que *TCP7* reprime la expresión de *TFL1* y los datos de los que disponemos sugieren que la regulación es directa, mediante la unión a su promotor. Sin embargo, puesto que la interacción en híbrido simple no es una prueba fehaciente de unión *in vivo* al promotor, y ante el resultado no concluyente del retardo en gel, hacen falta más pruebas para confirmar la interacción directa de *TCP7* con el promotor de *TFL1*.





# CONCLUSIONES



Las principales aportaciones del presente trabajo al avance en el conocimiento sobre el control del desarrollo de la inflorescencia a través de la regulación de *TFL1* se resumen en las siguientes conclusiones:

PRIMERA: La mutagénesis de una línea delatora *TFL1pro::GUS* en la que la expresión del gen *GUS* se encuentra dirigida por las regiones reguladoras de *TFL1*, ha permitido la identificación de líneas mutantes con una expresión *TFL1pro::GUS* alterada y defectos en el desarrollo de la inflorescencia. Esto confirma la utilidad de esta mutagénesis para la identificación de genes candidatos a regular la expresión de *TFL1*.

SEGUNDA: La mutagénesis de la línea delatora *TFL1pro::GUS* ha conducido a la identificación del mutante *moss*, resultado de una mutación hipomorfa en el gen *AGO1*. La mutación *moss* causa un aumento de la expresión de *TFL1* en el SAM y su expresión ectópica en las flores, así como graves defectos en la arquitectura de la planta que, entre otras alteraciones, muestra un incremento en el número de inflorescencias secundarias. Nuestros resultados abren la puerta a la idea de que *TFL1* se halle regulado por pequeños RNAs.

TERCERA: El análisis de las regiones reguladoras de *TFL1* mediante *phylogenetic shadowing* ha llevado a la identificación de siete regiones conservadas en la región genómica de *TFL1*, dos de ellas en el 5' no codificante y cinco en el 3' no codificante. Estas regiones conservadas contienen potenciales sitios de unión de factores de transcripción y además, coinciden con regiones identificadas en un análisis funcional del promotor de *TFL1*, mediante deleciones, llevado a cabo en nuestro laboratorio. Nuestros datos indican que las regiones conservadas funcionan como módulos reguladores del promotor de *TFL1* y confirman la utilidad del *phylogenetic shadowing* para la identificación de regiones potencialmente importantes en la regulación de un gen.

CUARTA: Un escrutinio de híbrido simple utilizando como cebo uno de los módulos reguladores identificados en este trabajo ha permitido identificar a *TCP7*, un factor de transcripción de función desconocida, como proteína capaz de unirse al promotor de *TFL1*. Líneas en las que *TCP7* se encuentra sobreexpresado o silenciado muestran defectos en la arquitectura de la planta y niveles alterados de *TFL1*. Nuestros resultados sugieren que *TCP7* controla la arquitectura de la planta a través de la regulación de *TFL1*.



The main contributions of this study to the advance in the knowledge of the control of inflorescence development through *TFL1* regulation are summarized in the following conclusions:

FIRST: The mutagenesis of a *TFL1*pro::GUS reporter line, in which the regulatory regions of *TFL1* direct the expression of the *GUS* gene, has allowed the identification of several mutant lines that show defects both in the pattern of *TFL1*pro::GUS expression and in inflorescence architecture. Thus, this mutagenesis has proven a useful tool for the identification of potential regulators of *TFL1* expression.

SECOND: The mutagenesis of the *TFL1*pro::GUS reporter line has led to the identification of the *moss* mutant, whose phenotype is caused by a hypomorphic mutation in the *AGO1* gene. The *moss* mutation causes increased levels of *TFL1* expression, which is also ectopic in flowers, and dramatic alterations in the architecture of the plant that, among other defects, shows an increase in the number of secondary inflorescences. Our results suggest that *TFL1* expression is regulated by small RNAs through *AGO1*.

THIRD: The analysis of the *TFL1* promoter by phylogenetic shadowing, for the identification of regulatory regions, has identified seven conserved regions, two of them in the *TFL1* 5' non-coding sequence and five in its 3' non-coding sequence. These regions contain putative transcription factor binding sites and, moreover, most of them overlap with key regulatory regions identified in a deletion analysis of the *TFL1* promoter previously carried out in our lab. Our results indicate that these conserved regions act as regulatory modules in the *TFL1* promoter and confirm the phylogenetic shadowing as a useful approach for the identification of regions potentially important in the regulation of gene expression.

FOURTH: A yeast one-hybrid screening, using one of the regulatory modules identified in this work as bait, resulted in the identification of *TCP7*, a transcription factor of unknown function, as a protein able to bind to the *TFL1* promoter. Transgenic lines where *TCP7* is over-expressed or silenced showed phenotypes affecting inflorescence architecture and altered expression of *TFL1*. Our results suggest that *TCP7* controls plant architecture through the regulation of *TFL1*.



# MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. Materiales

### 1.1. Material vegetal

Las plantas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla M.1.

**Tabla M.1. Genotipos de Arabidopsis utilizados en este trabajo**

Línea	Fondo genético	Procedencia	Comentario/Referencia
35S::TCP7	Col	Este trabajo	contiene la construcción pKC5 para la expresión constitutiva de <i>TCP7</i>
<i>ago1-26</i>	Col	H. Vaucheret	(Morel <i>et al.</i> , 2002)
<i>ago1-52</i>	Ler	M.R. Ponce	(Jover-Gil, 2005)
Col WT	Col		
Ler	Ler		
<i>Ler gl1</i>	<i>Ler gl1</i>	C. Alonso Blanco	línea parental del TILLING
<i>moss</i>	<i>TFL1pro::GUS</i>	Este trabajo	alelo del gen <i>AGO1</i> obtenido por mutagénesis
LerPBG1	Ler	A. Serrano-Mislata	línea delatora con la construcción TFL1pro::GUS que contiene la versión incompleta del promotor de <i>TFL1</i> (2.2 Kb de la 5'NCS y 2.8 Kb de la 3'NCS). (Serrano-Mislata, 2010)
LerPBG6	Ler	A. Serrano-Mislata	línea delatora con la construcción TFL1pro::GUS que contiene la versión completa del promotor de <i>TFL1</i> (2.2 Kb de la 5'NCS y 4.6 Kb de la 3'NCS). (Serrano-Mislata, 2010)
RNAi-TCP7	Col	Este trabajo	contiene la construcción pFN92 para el silenciamiento de la expresión de <i>TCP7</i> mediante el mecanismo del RNA de interferencia.
<i>stop</i>	<i>Ler glabrous 1</i>	C. Alonso Blanco	alelo del gen <i>TCP7</i> obtenido por tilling
<i>tfl1-1</i>	Col	D. Bradley	(Shannon y Meeks-Wagner, 1991)
<i>tfl1-2</i>	Ler	D. Bradley	(Alvarez <i>et al.</i> , 1992)

## 1.2. Microorganismos

### 1.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se describen en la tabla M.2.

**Tabla M.2. Cepas de bacterias utilizadas en este trabajo**

Cepa	Uso	Origen/Referencia
<i>Escherichia Coli</i> DH5α	Transformación de bacterias	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia Coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
One Shot ccdB Survival 2T1R Competent Cells	Transformación de bacterias para replicar plásmidos con el gen ccdB del sistema Gateway	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	(Koncz, 1986)

### 1.1.1. Cepas de levadura

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) utilizadas en este trabajo se describen en la tabla M.3.

**Tabla M.3. Cepas de levaduras utilizadas en este trabajo**

Cepa	Genotipo	Procedencia
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, HIS3, ADE2, lacZ gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, (o MEL1) GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS- MEL1TATA-lacZ, MEL 1</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
PJ69-4a	<i>MATa trp1-901 leu2-3,u1r1a23-52 his3-200gag1a41A8LOYASZ::GALI-HIS3 GAL2-ADE2metZ::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
PJ69-4α	<i>MATa trp1-901 leu2-3,u1r1a23-52 his3-200gag1a41A8LOYASZ::GALI-HIS3 GAL2-ADE2metZ::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
Y187	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, lacZ, MEL1 leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, MEL1 URA3::GAL1 UAS-GAL1TATA-lacZ</i>	(Harper <i>et al.</i> , 1993)

### 1.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla M.4.

**Tabla M.4. Plásmidos utilizados en este trabajo**

Nombre	Uso	Procedencia
pADGAL4-MADS	Contiene el monómero MADS fusionado a Gal4-AD empleado como presa en el híbrido simple con una genoteca con dímeros de MADS	(Ciannamea <i>et al.</i> , 2006)
pB7GWIWG2(I),0	Vector de destino para generar construcciones RNAi empleando el sistema <i>Gateway</i>	Ghent University
pBSKTFL1	Plásmido que contiene el fragmento con la región genómica de <i>AtTFL1</i> ecotipo <i>Ler</i>	(Serrano-Mislata, 2010)
pCLD04541	Cósmido que contiene el fragmento con la región genómica de <i>CbTFL1</i>	(Bancroft, 1997)
pCR8/GW/TOPO	Clonación de productos de PCR en un vector de entrada del sistema <i>Gateway</i>	Invitrogen
pCUGIBACI	BAC que contiene el fragmento con la región genómica de <i>BrTFL1</i>	John Innes Center
pD108	pGEMTeasy con la región empleada como sonda de ISH de <i>TFL1</i>	D. Bradley
pEarleyGate 100	Vector de destino para generar fusiones al promotor 35S empleando el sistema <i>Gateway</i>	(Earley <i>et al.</i> , 2006)
pFN30	pGEMTeasy que contiene el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro para ser clonado en pFN37A	Este trabajo
pFN31	pGEMTeasy que contiene el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro para ser clonado en pFN37B	"
pFN37A	pHISi con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro en sentido directo.	"
pFN37B	pHISi con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro en sentido reverso.	"
pFN48B	pGEMTeasy que contiene el fragmento 2.8-3.1 <i>TFL1</i> pro con la caja TCP mutada para ser clonado en pFN50	"
pFN49B	pGEMTeasy que contiene el fragmento 3.1-3.2 <i>TFL1</i> pro con la caja TCP mutada para ser clonado en pFN50	"
pFN50	pGEMTeasy que contiene el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro con la caja TCP mutada para ser clonado en pFN51	"
pFN51	pHISi con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro con la caja TCP mutada	"
pFN53	pGEMTeasy que contiene el fragmento 1.0-1.3 <i>TFL1</i> pro para ser clonado en pFN55	"
pFN54	pGEMTeasy que contiene el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro para ser clonado en pFN56	"
pFN55	pINT-His-3b con el fragmento 1.0-1.3 <i>TFL1</i> pro	"
pFN56	pINT-His-3b con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro	"

pFN57	pCR8/GW/TOPO con la secuencia codificante de <i>TCP7</i>	"
pFN86 Rev	pGEMT easy con la región empleada como sonda de ISH de <i>TCP7</i>	"
pFN90	pCR8/GW/TOPO con el fragmento de <i>TCP7</i> utilizado para generar el RNAi	"
pFN92	Plásmido derivado de pEarleyGate 100 que contiene la construcción RNAi de <i>TCP7</i>	"
pGADT7rec	Vector presa empleado en el híbrido simple con una genoteca de cDNA de planta entera	Clontech
pGEMT easy	Clonación de productos de PCR	Promega
pHISi	Vector cebo empleado en el híbrido simple con la genoteca de cDNA de planta entera	Clontech
pINT-His-3B	Vector cebo empleado en el híbrido simple con la genoteca de dímeros de MADS	R. Immink
pKC5	Plásmido derivado de pEarleyGate 100 que contiene la construcción 35S:: <i>TCP7</i>	Este trabajo
pTFT1-MADS	Contiene el monómero MADS sin fusión a Gal4-AD empleado como presa en el híbrido simple con una genoteca con dímeros de MADS	(Ciannamea <i>et al.</i> , 2006)

## 1.4. Oligonucleótidos

Los cebadores utilizados en este trabajo se describen en la tabla M.5.

**Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo**

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilización
AGOF1	GTATGCAAGATTGTTGAAG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +2091 del ATG en dirección 3'
AGOF2	GGGTGGTTGTGTTATTTTCACAG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición -31 del ATG en dirección 3'
AGOF3	CTCCGGAAGTTACATCAAGGG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +733 del ATG en dirección 3'
AGOF4	ATCGACAGCCTTCATAGAGGC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +1488 del ATG en dirección 3'
AGOF5	GGCTAATATGAGTCTTCTCTGC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +3280 del ATG en dirección 3'
AGOF6	GTTGCTCATAGCCTTCCGTAG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +4388 del ATG en dirección 3'
AGOF8	AAATCTGCCACCCTACAGAGTTTG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +4930 del ATG en dirección 3'
AGOR1	GGAGGCAGTATACGAGCCTC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +2757 del ATG en dirección 5'
AGOR2	AAGATTGATTCTGAACTCCTTGG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +877 del ATG en dirección 5'

AGOR3	AAC TTGACACCTCTAAGAGCC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +1692 del ATG en dirección 5'
AGOR4	TCCAATTATTCACCGTTCCACC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +3316 del ATG en dirección 5'
AGOR6	GTCATAAAGATAGATAGAGGGTG	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +5615 del ATG en dirección 5'
AGOR8	CCATCCCTGTGCAGAATAACC	Secuenciación locus <i>AGO1</i> desde la posición +4518 del ATG en dirección 5'
BACE2F	AGCACTAATGTTGGAACGCTG	Secuenciación locus <i>BrTFL1</i> desde la posición +244 pb del ATG en dirección 3'
BACE4R	CTGCAGTTTCTCTCTGGGC	Secuenciación locus <i>BrTFL1</i> desde la posición +1029 pb del ATG en dirección 5'
BACF1	CTTCTCTCTCGGCGAACGTG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +383 pb del STOP en dirección 3'
BACF2	ACAAGTAGCGGTGACAACGC	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +876 pb del STOP en dirección 3'
BACF3	TGCAACTAAGTACTGGTACAC	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +1198 pb del STOP en dirección 3'
BACF4	TAATTACAAATTTGATAGTAACTG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +1707 pb del STOP en dirección 3'
BACF5	GTGTGATGAATAGTGTACACC	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +1912 pb del STOP en dirección 3'
BACF6	AACTACCATAATAAATGTATCC	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +2398 pb del STOP en dirección 3'
BACF7	ACACAGTACACCTACGTCGG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +2722 pb del STOP en dirección 3'
BACF8	GGTTAATATCATAAATGAAGTGG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +3105 pb del STOP en dirección 3'
BACF9	AAAGAGACGACCTGCCATG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +3587 pb del STOP en dirección 3'
BACF10	ACAAACGCTAGGGATGTTGG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +4109 pb del STOP en dirección 3'
BACF11	TACTTTGTTATGCAAACCTGCG	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +4539 pb del STOP en dirección 3'
BACF13	TATCGGGCCGGTTTGGGC	Secuenciación 3'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición +4956 pb del STOP en dirección 3'
BACR1	AAGCGCTCTCTCTCGTGTTG	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -173 pb del ATG en dirección 5'
BACR2	GGAGATTGTAATGATTTG	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -756 pb del ATG en dirección 5'
BACR3	TACGGTGGGGAGAAGCTAAG	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -1263 pb del ATG en dirección 5'

BACR4	TTATCCTTACACGTGCCGAG	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -1739 pb del ATG en dirección 5'
BACR5	GTAATGATATTCCGGTAAGTC	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -2268 pb del ATG en dirección 5'
BACR6	GGAGGGTGATGATGTACTG	Secuenciación 5'NCS de <i>BrTFL1</i> desde la posición -2555 pb del ATG en dirección 5'
COSF1	TCAGATCCTTCTTCACCTTG	Secuenciación locus <i>CbTFL1</i> desde la posición +194 pb del ATG en dirección 3'
COSF2	GTGGTGAGCTATGAGTTGC	Secuenciación locus <i>CbTFL1</i> desde la posición +807 pb del ATG en dirección 3'. También se utilizó para la secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +825 pb del ATG en dirección 3'
COSF3	TCACACACCAACCTATTCCAC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +257 pb del STOP en dirección 3'
COSF3-4	CCAGATACATGGCTGATAATG	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +549 pb del STOP en dirección 3'
COSF4	GCGATCATATTATCAATTCTATC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +716 pb del STOP en dirección 3'
COSF5	ACCAAAGTTCGTTACATTG	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +1381 pb del STOP en dirección 3'
COSF6	AGGCAAATGGATTGACTACC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +1997 pb del STOP en dirección 3'
COSF7	GAGTGGCCCTTGCAATTTAC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +2481 pb del STOP en dirección 3'
COSF8	AGAGTCTACCTGTCATGTTTC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +2981 pb del STOP en dirección 3'
COSF9	TCGTATCTTATGTTCTTGGTAG	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +3481 pb del STOP en dirección 3'
COSF10	ATTTCTAGGCGGCGTGATC	Secuenciación 3'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición +4090 pb del STOP en dirección 3'
COSR1	TTCCACCAAAGAGTTCAGAG	Secuenciación locus <i>CbTFL1</i> desde la posición +311 pb del ATG en dirección 5'
COSR2	GAGACAAAGAAGACGACCAAG	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -82 pb del ATG en dirección 5'
COSR3	CATAGCTAGATATCTCGGCG	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -539 pb del ATG en dirección 5'
COSR4	CTTATACATGGCTTGATGTC	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -1090 pb del ATG en dirección 5'
COSR5	AGGCTTGATGTTTCCTATAGC	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -1688 pb del ATG en dirección 5'
COSR6	AACCTTGCTTTAGGCCAAG	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -2330 pb del ATG en dirección 5'
COSR7	GATCAGGATCAGACCACTCG	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -2893 pb del ATG en dirección 5'

COSR8	AATCCCCACTTATGTCTAGC	Secuenciación 5'NCS de <i>CbTFL1</i> desde la posición -3452 pb del ATG en dirección 5'
LERF1	GTGAACCTTATATGATAAACGTG	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +319 pb del STOP en dirección 3'
LERF2	TATCTATATTCAACCGAATAACC	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +789 pb del STOP en dirección 3'
LERF3	AGCTCAATGACTAAAGGTATTG	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +1340 pb del STOP en dirección 3'
LERF4	GACTGGCCCCCTCGCGTTTG	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +1860 pb del STOP en dirección 3'
LERF5	TGCCAACTGCCAAGTACATG	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +2396 pb del STOP en dirección 3'
LERF6	AAGCAAGAAACATACTAACCC	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +2945 pb del STOP en dirección 3'
LERF7REP	TCGGATTGGTCCAGTTAGAAC	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +3455 pb del STOP en dirección 3'
LERF8	TGGGAGAGTCCAAGGGTTG	Secuenciación 3'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +3985 pb del STOP en dirección 3'
LERR0	CACTCTAGTCCCATATTCTCC	Secuenciación 5'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición +3 pb del ATG en dirección 5'
LERR1	CAGTAGAACATATAATTGGCCAAG	Secuenciación 5'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición -591 pb del ATG en dirección 5'
LERR2	TTAGAGAGTCTTGATTGATGC	Secuenciación 5'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición -1077 pb del ATG en dirección 5'
LERR3	CACTCGCTACAGTCTTAAGAC	Secuenciación 5'NCS de <i>AtTFL1</i> ( <i>Ler</i> ) desde la posición -1701 pb del ATG en dirección 5'
PEDROL14	TCTAGATAGTACAGCCTGAATGATAGACC	Cebador directo con diana XbaI para amplificar 1.0-1.3 <i>TFL1</i> pro
PEDROL16	GAATCCAATACCTTTAGTCATTGAGCAAC	Cebador reverso con diana EcoRI para amplificar 1.0-1.3 <i>TFL1</i> pro
PEDROL22	GAATTCGACTCTCGAGGACAAACCAAC	Cebador directo con diana EcoRI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro
PEDROL23	TCTAGAGACTCTCGAGGACAAACCAAC	Cebador directo con diana XbaI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro
PEDROL28	GAATTCATTATGGGTTAGCTATAAAGATGG	Cebador reverso con diana EcoRI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro
PEDROL29	TCTAGAATTATGGGTTAGCTATAAAGATGG	Cebador reverso con diana XbaI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro
PEDROL33	AAGTCGACTCTAGAGACTCTCGAGGACAAACCAAC	Cebador directo con diana Sall/XbaI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro
PEDROL34	AAGTCGACTCTAGAATTATGGGTTAGCCATAAAGATGG	Cebador reverso con diana Sall/XbaI para amplificar 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro

PEDROL35	ATGGTGGTTTCAACAATTGTCC	Cebador directo para el escrutinio (junto a Ve47) de más clones positivos de <i>TCP7</i> con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro invertido
PEDROL36	TCAGCTAACGAGAGAGCTTGG	Cebador directo para el escrutinio (junto a Ve47) de más clones positivos de <i>VOZ1</i> con el fragmento 2.8-3.2 <i>TFL1</i> pro invertido
PEDROL43	AAGCTTCACGACTCTTCGACACGTTAAC	Cebador Reverso que sustituye la caja TCP por sitio HindIII
PEDROL44	AAGCTTCATGTGTTAAGGTTTGATCCTCG	Cebador directo que sustituye la caja TCP por sitio HindIII
PEDROL54	TCTAGACAAGCCAAGTGAGAAAAAGAAAACACTAAACCC	Cebador directo para genotipado del alelo <i>stop de TCP7</i> por dCAP. También utilizado junto a PEDROL140 para el genotipado de la línea tilling 6509 de <i>TCP7</i>
PEDROL56	CATTGGTTTTTAACCCCTTTGTTAATTCTAG	Cebador directo para genotipado de <i>moss</i> por dCAP
PEDROL57	AGTAAAGTTGTTCTCATCCCAAAGAACGTG	Cebador reverso para genotipado de <i>moss</i> por dCAP
PEDROL58	GGATCCATGTCTATTAACAACAACAACAACAAC	Cebador directo para amplificar la secuencia codificante de <i>TCP7</i> . Cebador directo para RT-PCR de <i>TCP7</i> . También utilizado para el genotipado de la línea tilling 1309 de <i>TCP7</i>
PEDROL59	TCTAGATTAACGTGGATCTTCTCTCTTCCG	Cebador reverso para RT-PCR de <i>TCP7</i> . También utilizado para el genotipado de la línea tilling 1309 de <i>TCP7</i>
PEDROL60	TCTAGAACGTGGATCTTCTCTCTTCCG	Cebador reverso para amplificar la secuencia codificante de <i>TCP7</i>
PEDROL97	TCTGACTTATGACCAAGCTCTCTCGTCAGCT	Cebador reverso para genotipado del alelo <i>stop de TCP7</i> por dCAP
PEDROL98	CCGGCGAAAGATCGACATAGCAAAGTCATAT	Cebador directo para genotipado del alelo 955 de <i>TCP7</i> por dCAP
PEDROL99	TTTCCAAGTATAAACGGTGACGTAC	Cebador reverso para genotipado del alelo 955 de <i>TCP7</i> por dCAP
PEDROL102	TGAATGGTTACTTCGTCAAGCAGAGAATT	Cebador directo para genotipado del alelo 1222 de <i>TCP7</i> por dCAP
PEDROL103	AACTTGTCAAAATCCGGCCTCGCC	Cebador reverso para genotipado del alelo 1222 de <i>TCP7</i> por dCAP
PEDROL114	AAGCAAAGACGTGTTATCTTTCCTAAT	Cebador directo para RT-qPCR de <i>TFL1</i>
PEDROL115	GTTGAAGTGATCTCTCGAAGGGAT	Cebador reverso para RT-qPCR de <i>TFL1</i>
PEDROL118	CCTTGATAATCCCTGATGAATAAGTGT	Cebador directo para RT-qPCR de <i>UBQ10</i>
PEDROL119	AACAGGAACGGAAACATAGTAGAACA	Cebador reverso para RT-qPCR de <i>UBQ10</i>
PEDROL123	AAGCTGCAATGGGTGAAGCT	Cebador directo utilizado para el diseño del RNAi de <i>TCP7</i>



PEDROL125	TTGATTTGGTTTCAGAATCTCTGC	Cebador directo para la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de <i>TCP7</i> en diferentes órganos de plantas Col WT
PEDROL126	AAGCTAACGAAAACCTCTCAAATCACTT	Cebador reverso para la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de <i>TCP7</i> en diferentes órganos de plantas Col WT. También se utilizó como pareja de PEDROL123 para el diseño el RNAi de <i>TCP7</i>
PEDROL140	AAACACGAGCAGCACATATAATCGGCATACGGATTGAACTCC	Cebador reverso utilizado para el genotipado de la línea tilling 6509 de <i>TCP7</i>
PEDROL149	TCTAGAATGTCTATTAACAACAACAACAAC	Cebador directo para amplificar la región empleada como sonda de ISH de <i>TCP7</i> . Alinea con el ATG de <i>TCP7</i>
PEDROL151	GGATCCTAAACGGTGACGTACCACCAAG	Cebador reverso para amplificar la región empleada como sonda de ISH de <i>TCP7</i> . Alinea 400pb después del ATG de <i>TCP7</i>
PEDROL161	GGTAAAGATGAGACCTTTACGACAACA	Cebador directo para la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de <i>TCP7</i> en las plantas 35S:: <i>TCP7</i> y RNAi de <i>TCP7</i>
PEDROL162	AAACTCCAACTTGTCCTCAAATCC	Cebador reverso para la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de <i>TCP7</i> en las plantas 35S:: <i>TCP7</i> y RNAi de <i>TCP7</i>
PRAT118	AGGGATGTTTAATACCACTAC	Cebador directo comprobación levaduras transformadas con construcciones derivadas de pINT-His-3b
PRI846	CAAACCTCTGGCGAAGA	Cebador reverso comprobación levaduras transformadas con construcciones derivadas de pINT-His-3b
TFFW	GGAGAATATGGGAACTAGAGTG	Secuenciación del locus <i>AtTFL1</i> (Ler) desde la posición +1 ATG en dirección 3'
TFRV	CTTTTAGAAAGGGGTCCTAGG	Secuenciación del locus <i>AtTFL1</i> (Ler) desde la posición +276 ATG en dirección 5'
UBQ10-FW	GATCTTTGCCGGAAAACAATTGGAGGATGG	Cebador directo para RT-PCR semicuantitativa de <i>UBQ10</i>
UBQ10-RV	CGACTTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG	Cebador reverso para RT-PCR semicuantitativa de <i>UBQ10</i>
VE47	CTATTCGAT GATGAAGATACCCC	Secuenciación del inserto contenido en el plásmido pGADT74rec. Alinea con el extremo 3' del sitio de clonación múltiple
VE86	GCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	Cebador directo comprobación levaduras transformadas con construcciones derivadas de pHISi
VE91	CTTGCCTTCGTTTATCTTGC	Cebador reverso comprobación levaduras transformadas con construcciones derivadas de pHISi

### 1.5. Secuencias utilizadas

Los números de acceso de las secuencias utilizadas en este trabajo se encuentran recogidos en la Tabla M.6.

**Tabla M.6 Números de acceso de las secuencias utilizadas en este trabajo**

Gen/Proteína	Código	Especie
TFL1	At5G03840	<i>A. thaliana</i>
LcTFL1	No disponible. Cedida por D. Baum	<i>L. crassa</i>
AITFL1	Este trabajo	<i>A. lyrata</i>
CbTFL1	Este trabajo	<i>C. bursa-pastoris</i>
BrTFL1	Este trabajo	<i>B. rapa</i>
BoTFL1-1	AB017530	<i>B. oleracea</i>
BoTFL1-2	AB017531	<i>B. oleracea</i>
BnTFL1-1	AB017525	<i>B. napus</i>
BnTFL1-2	AB017526	<i>B. napus</i>
BnTFL1-3	AB017527	<i>B. napus</i>
BrTFL1-1	AB017528	<i>B. rapa</i>
BrTFL1-2	AB017529	<i>B. rapa</i>
TCP7	AT5G23280	<i>A. thaliana</i>
TCP21	AT5G038330	<i>A. thaliana</i>
AtAGO1	At1g48410	<i>A. thaliana</i>
AtAGO2	At1g31280	<i>A. thaliana</i>
AtGO3	At1g31290	<i>A. thaliana</i>
AtAGO4	At2g27040	<i>A. thaliana</i>
AtAGO5	At2g27880	<i>A. thaliana</i>
AtAGO6	At2g32940	<i>A. thaliana</i>
AtAGO7	At1g69440	<i>A. thaliana</i>
AtAGO8	At5g21030	<i>A. thaliana</i>
AtAGO9	At5g21150	<i>A. thaliana</i>
AtAGO10	ATG43810	<i>A. thaliana</i>
OsAGO1	Os02g0672200	<i>O. sativa</i>
HsAGO1	NP_036331.1	<i>H. sapiens</i>
SpAGO1	SPCC736.11	<i>S. pombe</i>

DmAGO1	Q9VUQ5.3	<i>D. melanogaster</i>
DmPIWI	NP_476875.1	<i>D. melanogaster</i>
ATC	AT2G27550	<i>A. thaliana</i>
BFT	AT5G62040	<i>A. thaliana</i>
FT	AT1G65480	<i>A. thaliana</i>
MFT	AT1G18100	<i>A. thaliana</i>
TSF	AT4G20370	<i>A. thaliana</i>
3' NCS de CEN	No disponible. Cedida por D. Bradley	<i>A. majus</i>
3' NCS de <i>VvTFL1</i>	GSVIVT00021628001	<i>V. vinifera</i>

---

## 2. Métodos

### 2.1. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de Arabidopsis

#### 2.1.1 Cultivo de Arabidopsis en invernadero

Las semillas de Arabidopsis se sembraron en alveolos, de 6.5 x 6.5 x 5 cm, o en macetas, de 11 ó 13 cm de diámetro, según el tipo de experimento a realizar, con una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita. Tras la siembra, los alveolos y/o las macetas se colocaron en bandejas que se regaron abundantemente y se cubrieron con un plástico para mantener una humedad alta durante la germinación y evitar contaminaciones de otras semillas. Las semillas se estratificaron durante 3-4 días en oscuridad a 4 °C para sincronizar la germinación, tras lo cual las bandejas se pasaron a la cabina de cultivo o al invernadero. Cuando las plántulas habían desarrollado el primer par de hojas, o la condensación era muy alta, se agujereó el plástico en varios puntos y 3-4 días después, se retiró completamente. Las plantas fueron regadas por inmersión una vez a la semana con agua potable y otra vez con solución Hoagland n° 1 suplementada con oligoelementos (John Hewitt, 1966).

Las plantas se cultivaron en invernadero o en cámaras de cultivo según el experimento. En cualquier caso, siempre, tanto el control como la planta problema se cultivaron en las mismas condiciones. Dentro de las cámaras de cultivo, la iluminación procedía de tubos fluorescentes *Sylvania Standard F58W/133-T8* que emitían luz blanca fría con un flujo de 4600 lm. Las plantas se cultivaron bajo dos fotoperiodos diferentes: día largo, 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, o día corto, 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. La temperatura se mantuvo estable entre 21 y 23 °C. En el caso de cultivarse en el invernadero, siempre fue bajo condiciones de día largo con luz natural, en ocasiones suplementada con luz artificial, y la temperatura se mantuvo estable entre 21 y 23 °C.

### 2.1.2 Cultivo de Arabidopsis *in vitro*

Para el cultivo *in vitro*, las semillas de Arabidopsis se esterilizaron, dentro de una campana de flujo laminar, con una solución compuesta por etanol al 70%(v/v) y Tritón-X-100 al 0.005% (v/v) durante 3 minutos con agitación. A continuación, la semillas se lavaron con etanol al 96% (v/v) durante 1 minuto con agitación, y se dejaron secar antes de distribuir las en cajas de Petri, de 15 cm de diámetro, con medio de selección. Estas cajas se sellaron con cinta *Micropore™ 3M Surgical Tape* para facilitar el intercambio de gases.

El medio de selección estaba compuesto por 2.2 g/L de sales MS (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L MES y 6.0 g/L de agar, pH 5.9. Además, en ocasiones se utilizó como medida profiláctica timentina (300 µg/L). Como agentes selectivos se utilizaron kanamicina (50 µg/L) o glufosinato de amonio (15 µg/mL), también conocido como *Basta* (Bayer CropScience).

Las semillas se estratificaron durante 3-4 días a 4 °C en oscuridad. A continuación, las cajas de Petri se trasladaron a cabinas de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo y temperatura constante de 24 °C. La luz fue proporcionada por tubos fluorescentes *Sylvania Gro Lux 36W* que emitían luz blanca fría con un flujo de 850 lm.

### 2.1.3 Fertilización cruzada

Para realizar cruzamientos entre los diferentes genotipos de Arabidopsis, se emascularon las flores receptoras con unas pinzas, retirando todos los órganos excepto el pistilo sobre el que se depositó el polen de las plantas donantes. Las futuras silicuas se recogieron una vez las valvas empezaron a abrirse.

### 2.1.4 Conservación de semillas

Una vez las plantas de Arabidopsis habían completado su ciclo vital, se recogieron las semillas que se dejaron secando durante 7 días a 37 °C. A continuación, se almacenaron estas semillas dentro de una cámara con una temperatura de 10 °C, una humedad aproximada del 25% y en oscuridad.

### 2.1.5 Generación de plantas transgénicas

#### 2.1.5.1 Transformación genética mediante infiltración al vacío

Para la generación de plantas transgénicas de Arabidopsis con las construcciones pKC5 y pFN92 se utilizó el ecotipo silvestre Col (Col WT). La transformación se realizó según el protocolo de infiltración por vacío descrito en Bechtold *et al.* (1993) con algunas modificaciones introducidas en Clough y Bent (1998).

Aproximadamente 60 semillas de *Arabidopsis* se cultivaron en macetas de 11 cm de diámetro en condiciones de día largo. Unas dos semanas después de la siembra, se eliminaron algunas plantas para facilitar el crecimiento homogéneo de la población. Cuando la altura de las plantas era de unos 10 cm, aproximadamente tras un mes de cultivo, se decapitó el ápice de la inflorescencia principal, induciendo de este modo la proliferación de las inflorescencias de roseta. Tras la decapitación del ápice, las plantas se cultivaron durante 4 días más en día largo antes de la infiltración.

Tres días antes de la infiltración, se inoculó la cepa de *A. tumefaciens*, en nuestro caso C58 pMP90 con la construcción de interés, en un tubo de 50 mL con 10 mL de LB más rifampicina y kanamicina o espectinomicina a las concentraciones indicadas en la Tabla M.7. Este precultivo se incubó durante toda la noche en oscuridad a 28°C con agitación de 200 rpm. A la mañana siguiente, se inoculó el precultivo en un matraz de 1 L que contenía 600 mL de medio LB con kanamicina o espectinomicina. Este cultivo se incubó en las mismas condiciones durante 48 horas. El día de la infiltración se centrifugó el cultivo, a 6000 rpm durante 15 minutos, y el sedimento obtenido se resuspendió en 200 mL de medio de infiltración (sales MS 2.2 g/L, sacarosa 5% (p/v), BAP 1.0 mg/L, MES 100 mg/L, pH 5.9) al que se le había añadido detergente *Silwet L.77* (Lehle Seeds), a una concentración final de 0.05% (v/v).

Antes de la infiltración, se eliminaron todas las flores abiertas y las silicuas fertilizadas de las plantas. Para llevar a cabo la infiltración, las inflorescencias se sumergieron durante 8 s en un recipiente con los 200 mL de la suspensión de *A. tumefaciens* en medio de infiltración. Inmediatamente después, se sometió a las plantas a un pulso de vacío de 1 minuto. A continuación, se secaron ligeramente las plantas con papel absorbente, se cubrieron con bolsas de plástico y se continuaron cultivando en condiciones de día largo. Durante los días siguientes se agujerearon las bolsas de plástico, permitiendo que las plantas se aclimataran gradualmente. Las plantas se cultivaron en el invernadero hasta que se obtuvieron las semillas maduras.

#### 2.1.5.2. Selección de plantas transgénicas

Para identificar transformantes primarios (T1), las semillas procedentes de las plantas transformadas se sembraron en cajas de Petri de 15 cm de diámetro, unas 3000 semillas por caja, con medio de selección con *Basta* (apartado 2.1.2). Tras unos 10 días de cultivo *in vitro*, las plantas resistentes, verdes y con raíces desarrolladas, se transplantaron a tierra y se cultivaron en el invernadero según las condiciones descritas en el apartado 2.1.1.

Para estimar, en las líneas transgénicas T1, el número de loci con integración del T-DNA, se sembraron unas 60 semillas T2 por línea en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de selección con *Basta* y timentina (apartado 2.1.2). Tras 12-15 días, se determinó el porcentaje de plantas resistentes al herbicida. Aquellas líneas T1 cuya progenie T2 segregaba en una proporción 3:1, aproximadamente 45 plantas resistentes y 15 plantas sensibles por placa, se consideraron como portadoras de la inserción en un único locus.

Para obtener líneas homocigotas, se transplantaron a tierra las plantas T2 resistentes a la selección con *Basta*. Estas plantas se cultivaron en el invernadero hasta obtener semillas T3. A continuación, se sembraron unas 60 semillas T3 por línea en cajas de Petri con medio de selección con *Basta*. Se consideraron homocigotas aquellas líneas T2 cuyos descendientes T3 eran 100% resistentes a la selección con *Basta*.

## 2.2. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de bacterias

### 2.2.1 Medios y condiciones de cultivo

Los cultivos líquidos de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) y *Agrobacterium tumefaciens* (*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*.

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (Luria-Bertani medium), compuesto por triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v), pH 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo agar 2% (p/v).

Los antibióticos selectivos y las concentraciones a las que se utilizaron se detallan en la Tabla M.7.

**Tabla M.7. Antibióticos y concentraciones de uso para la selección de bacterias transformadas**

Antibiótico	Concentración (µg/mL)	Bacteria
Ampicilina	100	<i>E. coli</i>
Kanamicina	50	<i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>
Espectinomicina	100	<i>E. coli</i>
Tetraciclina	10	<i>E. coli</i>
Cloranfenicol	33	<i>E. coli</i>
Rifampicina	100	<i>A. tumefaciens</i>

### 2.2.2 Transformación de bacterias

La preparación de células electrocompetentes para transformación se llevó a cabo según el protocolo descrito en el catálogo *Pulse controller, operation instructions y applications guide, accessory for bacterial and fungal electro-transformation* (Bio-Rad Laboratories, 1992).

Para llevar a cabo la transformación de bacterias por electroporación, se descongeló en hielo una alícuota de 40  $\mu$ L de células competentes a la que se añadió 1  $\mu$ L de la reacción de ligación o, aproximadamente, 100 ng de DNA en el caso de que se tratara directamente de un plásmido. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación, con 0.1 cm de separación entre los electrodos, de “Bio-Rad”, que previamente se había enfriado en hielo. El pulso eléctrico se aplicó con un aparato “GenePulser™” de “Bio-Rad” bajo las siguientes condiciones:

- Para *E. coli*: 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 1.8 kV.
- Para *A. tumefaciens*: 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 1.8 kV.

Tras el pulso eléctrico, las células se recogieron inmediatamente de la cubeta de electroporación con 1mL de medio LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 200 rpm para *E. coli*, y durante 3 horas a 28 °C y 200 rpm para *A. tumefaciens*. Finalmente, las células transformadas se sembraron en placas con medio selectivo.

## **2.3. Medios, condiciones de cultivo y manipulación de levaduras**

### 2.3.1 Medios y condiciones de cultivo

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías se utilizó medio YPD (extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), glucosa 2% (p/v)), con agitación a 200 rpm e incubación a 30 °C. Para el crecimiento en soporte sólido se utilizó el mismo medio YPD con agar 2% (p/v) y las placas se incubaron durante 24-72 h a 30 °C.

Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos fueron cultivadas en medio selectivo. Se utilizó medio mínimo SD (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico 0.17% (p/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5% (p/v), glucosa 2% (p/v)) suplementado con los aminoácidos requeridos en cada caso (uracilo (100 mg/L), leucina (100 mg/L), triptófano (20 mg/L), histidina (20 mg/L), adenina (100 mg/L)).

### 2.3.2 Transformación de levaduras

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio (Gietz *et al.*, 1995). A partir de cultivos de una noche en YPD, las células se diluyeron en 50mL de este mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600nm de 0.2-0.3. Tras alcanzar una absorbancia a 600nm de alrededor de 0.8, las células se recogieron y se lavaron una vez con agua destilada estéril y otra vez con LiAc 0.1 M. Seguidamente, se resuspendieron en 250  $\mu$ L de LiAc 0.1 M. Para cada transformación se

utilizaron 50  $\mu\text{L}$  de las células resuspendidas anteriormente y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. Después se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de DNA de esperma de salmón disuelto en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1.0 mM pH 8.0) a una concentración de 2 mg/mL y previamente desnaturalizado y 5-10  $\mu\text{L}$  conteniendo 100-200 ng (en el caso de plásmidos con origen de replicación autónomo) o 1-5  $\mu\text{g}$  (si se trataba de módulos de integración) de DNA transformante. A la mezcla se añadió 300  $\mu\text{L}$  de una solución de polietilenglicol (peso molecular medio 3350) 50% (p/v) : LiAc (1.0 M) : H<sub>2</sub>O en proporciones 24:3:3. El tubo que contenía la muestra se agitó de forma vigorosa, se incubó a 30 °C 30 minutos y seguidamente, se realizó un choque térmico a 42 °C durante 20 minutos. Como todas las transformaciones de este trabajo se realizaron con plásmidos que complementan auxotrofías de la cepa, tras el choque térmico la mezcla de transformación se plaqueó en medio mínimo selectivo.

## 2.4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

### 2.4.1 Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala, se partió de cultivos de 3 mL, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, incubados toda la noche a 37 °C con agitación. Las preparaciones se realizaron con el sistema *PowerPrep™ Express Plasmid MINIPREP Kit – Centrifugation Protocol* (Marligen Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a mediana escala, se partió de cultivos de 50 mL, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. Las preparaciones se realizaron con el sistema *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.4.2 Extracción de DNA de cósmidos o BACs de *E. coli*

Las extracciones de DNA del cósmido pCLD04541 y del BAC pCUGIBACI (Tabla M.4) se realizaron del siguiente modo.

Para las preparaciones a pequeña escala, se inoculó una colonia de cada clon en 4 mL de medio LB con tetraciclina (pCLD04541) o cloranfenicol (pCUGIBACI). Tras crecer los cultivos durante toda la noche, se recogieron las células por centrifugación a 14000 rpm. y se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de TE (EDTA 1.0 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8). Tras añadir 400  $\mu\text{L}$  de tampón NaOH 0.2 M, SDS 1% (p/v) se incubó en hielo 5 minutos y se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de tampón 3M acetato potásico pH 4.8. Tras esto, las muestras se incubaron 10 minutos a -70 °C y 20 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar durante 15 minutos a 14000rpm, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se precipitaron los ácidos nucleicos con 0.6% (v/v) de isopropanol frío, una incubación a -70 °C durante 10 minutos y una centrifugación a 4 °C de 20 minutos. Tras lavar el precipitado con etanol 70% (v/v), el DNA fue resuspendido con



50 µL de TE/RNase (50µg de RNase/mL).

Para las preparaciones a media escala, se siguió el sistema *QIAGEN Plasmid Midi Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante para plásmidos/cósmidos de muy bajo número de copias partiendo de cultivos de 250 mL de LB suplementado con el correspondiente antibiótico.

#### 2.4.3 Extracción de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*

Para las preparaciones a pequeña escala de DNA plasmídico de *A. tumefaciens*, se partió de cultivos de 3 mL, en medio LB suplementado con kanamicina o espectinomicina, incubados toda la noche a 28 °C con agitación. Las preparaciones se realizaron según el método de la lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.* (1989), precipitándose con etanol absoluto el sobrenadante obtenido tras el tratamiento con la solución III y posteriormente, resuspendiéndose en tampón TE (EDTA 1.0 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0). Como la pureza de la preparación de DNA obtenida de esta forma era muy baja, se utilizó 1 µL de la misma para transformar *E. coli* y a partir de dos clones recombinantes, se realizaron nuevas preparaciones de DNA plasmídico con una pureza adecuada para su análisis.

#### 2.4.4 Extracción de DNA de levaduras

Para extraer tanto el DNA genómico como el plasmídico de levadura, partió de cultivos de 4 mL en YPD crecidos durante toda la noche, a partir de los cuales se recogieron las células por centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm. Las células se lavaron con 500 µL de agua estéril y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Se aspiró el sobrenadante y sobre las células se añadieron 200 µL de tapón de rotura (Triton X- 100 2% (v/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1.0 mM pH 8.0), 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 y 200 µL de perlas de vidrio de 425-600 µm de diámetro. Se agitaron en vórtex durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente se añadieron 200 µL de tampón TE (EDTA 1.0 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) y se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y, tras añadir 2 volúmenes de etanol 96% (v/v) y agitar en vórtex, se volvió a centrifugar 15 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó 5 minutos en las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y cuando el precipitado estuvo seco, se resuspendió en un volumen de entre 50 y 100 µL de agua estéril. El DNA resuspendido se guardó a -20 °C.

#### 2.4.5 Extracción de DNA genómico de Arabidopsis

El DNA de Arabidopsis usado como molde en las PCRs se extrajo de la siguiente manera:

Se recogieron 2-3 hojas jóvenes y se congelaron con N<sub>2</sub> líquido. Posteriormente, se

homogeneizó el tejido congelado dentro de un tubo de 2 mL con la ayuda de bolas de acero de 2 mm de diámetro usando un homogeneizador mecánico a 30000 rpm durante 40 segundos. A continuación, se añadieron 200 µL de tampón de sacarosa (Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, Sacarosa 300 mM, pH 7.5), se homogeneizó la mezcla con la ayuda de un vórtex y se calentó a 99°C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 1.5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para ser almacenado a -20°C. Para una reacción de PCR se utilizó como molde 2 µL de esta extracción.

#### 2.4.6 Extracción de RNA total de Arabidopsis

Para la extracción de RNA total se partió, según el caso, de unos 15 ápices inflorescentes en *bolting* o 10 plántulas con una edad de 12 días. La homogeneización se llevó a cabo triturando el tejido previamente congelado con N<sub>2</sub> líquido de la misma forma que en el apartado 2.4.5. Las extracciones se realizaron con el sistema *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se trataron en su totalidad con DNasa utilizando el *Ambion's DNA free-kit* (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del RNA obtenido se determinó con un *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies).

### **2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT)**

#### 2.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR de este trabajo se han llevado a cabo en un volumen final de 50 µL utilizando 100 ng de DNA molde (2 µL en el caso de la extracción 2.4.5), 0.3 µM de cada cebador, 200 µM de dNTPs, 1.5-3 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampón de PCR *Netzyme* a 1X y 1.25 unidades de *Netzyme<sup>TM</sup> ADN polimerasa* (N.E.E.D). En el caso de que el producto de la PCR fuera subclonado en un plásmido, las 1.25 unidades de polimerasa estaban compuestas por una mezcla 1:3 de *Pfu Turbo DNA Polymerase* (Stratagene) con *Netzyme*. De este modo, se combinó la actividad correctora 3' → 5' exonucleasa de la *Pfu* con la alta capacidad de amplificación y procesividad de la *Netzyme*.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *PTC-150* (MJ Research) con una incubación inicial de 1-10 minutos a 95 °C (dependiendo de si el DNA molde era un DNA plasmídico o genómico) ; seguida de 35-40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 0.5 minutos a la temperatura de hibridación correspondiente a cada par de oligonucleótidos y 72 °C de extensión durante un tiempo variable dependiendo del fragmento a amplificar (generalmente 1 minuto por cada Kb). Al final, se incluyó un último paso consistente en una incubación de 5 minutos a 72 °C.

### 2.5.2 Transcripción reversa (RT)

Se incubaron a 65 °C durante 10 minutos 2 µg de RNA, con 3.6 µg de hexámeros aleatorios (*random hexamers* de Roche) y 2 nmol de MgCl<sub>2</sub> en un volumen final de 12 µL. Posteriormente, y hasta completar un volumen de 20 µL, se añadieron 0.5 mmoles, 40 unidades de inhibidor de RNase *Ribolock* (Fermentas) y 40 unidades de retrotranscriptasa *SuperScript II retrotranscriptase* (Invitrogen) con su correspondiente tampón a una concentración final 1X. Esta mezcla se incubó a 42°C durante 50 minutos, seguido de una desnaturalización a 75°C durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 70 µL de agua a cada reacción y se cuantificó utilizando un *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies). Finalmente, todas las muestras se ajustaron a una concentración final de 200 ng/µL antes de ser almacenadas a -20°C.

### 2.5.3 RT-PCR semicuantitativa

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se utilizaron 2 µL del cDNA 200 ng/µL obtenido en el apartado anterior como molde de la PCR. Con la excepción del número de ciclos, entre 20-25 ciclos dependiendo del gen a estudiar, las condiciones de la PCR fueron las descritas en el apartado 2.5.1.

### 2.5.4 RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Los experimentos de expresión génica realizados mediante ésta técnica se llevaron a cabo en un aparato *SDS 7000* (Applied Biosystems), utilizando el reactivo *Power SYBR Green* (Applied Biosystems). El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para todas las muestras biológicas se hicieron tres réplicas técnicas de PCR. Como molde, se utilizó en todos los casos 1.2 µg del cDNA sintetizado en el apartado 2.5.3. El procesamiento de los datos se llevó a cabo de la manera siguiente: se realizó inicialmente una qPCR con diferentes diluciones (1/1; 1/5; 1/25 y 1/125) de un cDNA genérico (ápices fluorescentes en bolting de Col silvestre) para cada par de oligonucleótidos que se iban a utilizar, con la finalidad de calcular la eficiencia de los mismos según se describe en (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando la expresión  $\text{Eficiencia} = 10^{-(1/\text{pendiente})}$ . Una vez comprobada que para todos los pares de oligonucleótidos la eficiencia estaba dentro del rango 1.8-2.2, se comenzó a trabajar con las muestras. El gen que se utilizó como normalizador fue *UBIQUITINA 10 (UBQ10)* y se utilizó el método de comparación de Ct para calcular las diferencias de expresión entre los pares de condiciones consideradas (Livak y Schmittgen, 2001; Schmittgen y Livak, 2008). Así, se calculó el  $\Delta\Delta\text{Ct}$  como  $(\text{Ct}_{\text{gen diana}} - \text{Ct}_{\text{gen de referencia}})_{\text{condición1}} - (\text{Ct}_{\text{gen diana}} - \text{Ct}_{\text{gen de referencia}})_{\text{condición2}}$

## **2.6. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis**

### 2.6.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0.8%-2.0% (p/v)) según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon en tampón TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA (pH 8.0) 1.25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), azul de xilencianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1x y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida. Además, los geles contenían 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, lo que permitió visualizar el DNA tras exponer el gel a luz ultravioleta. Las electroforesis se realizaron en sistemas horizontales *Sub-Cell GT* y *Mini-Sub Cell GT* conectados a una fuente de alimentación *PowerPack™ Basic* (Bio-Rad). Las electroforesis con fines preparativos se realizaron de manera análoga.

### 2.6.2 Electroforesis de RNA en geles de agarosa

La integridad del RNA obtenido tras las extracciones se comprobó mediante la visualización de 2 µg de RNA total en un gel de agarosa 1.25% (p/v) en tampón TBE 0.5X según lo descrito en el apartado anterior. En ocasiones se recurrió a analizar las muestras en condiciones desnaturalizantes, tal y como describe Sambrook *et al.* (1989).

## **2.7 Detección de DNA transferido a membrana mediante hibridación con una sonda**

### 2.7.1 Transferencia de DNA a una membrana

Aproximadamente 700 ng de las preparaciones a pequeña escala de DNA procedente de cósmidos de la genoteca de *C. bursa-pastoris* se digirieron con XbaI, XhoI o Xba/XhoI. Del mismo modo, para el control positivo, se digirió con NotI el plásmido pBSKTFL1. El DNA digerido se separó en un gel de agarosa 0.8% (p/v) y posteriormente se transfirió a membrana de nailon *Nylon Hybond N+* (Amersham) para su posterior hibridación. Previamente se sometió a diferentes tratamientos: 3 lavados de 2 minutos en agua para eliminar el exceso de bromuro de etidio, 30 minutos en solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5M), 2 minutos en agua y 2 lavados de 15 minutos en solución neutralizante (NaCl 1.5 M, tris-HCl 0.1 M pH 7.0). La transferencia se realizó por capilaridad en tampón 20X SSC según el procedimiento habitual descrito por Sambrook *et al.* (1989). La fijación del DNA a la membrana se realizó exponiendo la cara de la membrana que había estado en contacto con el gel a iluminación UV en un *Stratalinker UV1800* (Stratagene) y posteriormente introduciéndolo en un horno a 80 °C durante 30 minutos.

### 2.7.2 Marcaje de la sonda

La sonda radiactiva de DNA se sintetizó utilizando como molde el cDNA completo de *TFL1* mediante el sistema *Ready to go DNA Labelling Veda*s (-dCTP) (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.7.3 Hibridación, lavados y detección de la señal

La hibridación se llevó a cabo en tubos de hibridación dentro de un horno de hibridación *Roller-Blot hybridizer HB-3D* a 65 °C. La membrana se prehibridó durante 30 minutos en 20 mL de solución de hibridación (NaCl 0.6 M, TrisHCl 120 mM pH 8.0, EDTA 8 mM, SDS 0.1% (p/v), pirofosfato sódico 0.1% (p/v), sulfato de dextrano 10% (p/v), BSA 0.02% (p/v), Ficoll400 0.02% (p/v), PVP 0.02% (p/v)) que posteriormente fue desechada y reemplazada por 20 mL de la misma, conteniendo  $5 \times 10^6$  cpm de la sonda, desnaturalizada por ebullición durante 5 minutos. La hibridación se dejó transcurrir durante 16 horas, tras las cuales el filtro se lavó dos veces con SSC 2x, SDS 0.1% (p/v), dos veces con SSC 0.5x, SDS 0.1% (p/v) y tres veces con SSC 0.1x, SDS 0.1% (p/v); todos los lavados se realizaron a 65 °C, durante 15 minutos, controlando la radioactividad remanente en la membrana con un contador *Geiger*. Las autorradiografías se revelaron en una procesadora automática *M-35-X-OMAT* (Kodak).

## **2.8 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa, según se describe en el apartado 2.6.1. Los fragmentos de interés se recortaron del gel con ayuda de una cuchilla y el DNA se purificó con el sistema *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La elución del DNA se llevó a cabo en agua. Para la cuantificación del DNA resultante se utilizó un *ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies).

## **2.9 Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Para cada enzima se utilizó el tampón y las condiciones recomendadas por la casa comercial. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de 1.5 mL, con 5-10 unidades de enzima por  $\mu$ g de DNA, durante al menos 2 horas a la temperatura óptima en cada caso.

## **2.10 Tratamiento de DNA con enzimas modificadores**

### 2.10.1 Desfosforilación de extremos cohesivos

La desfosforilación de extremos cohesivos 5' protuberantes se utilizó para evitar la religación de vectores plasmídicos que, previamente, habían sido linearizados mediante

digestión con un único enzima de restricción. Para ello, tras la digestión, se añadió directamente a la mezcla de reacción 0.5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Roche) por cada  $\mu\text{g}$  de DNA, se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 min y se inactivó el enzima mediante incubación a 70 °C durante 10 minutos.

### 2.10.2 Ligación de fragmentos de DNA

Las ligaciones de fragmentos de DNA con extremos cohesivos se realizaron manteniendo una relación molar entre inserto y vector de, aproximadamente, 3:1. La mezcla de reacción se preparó en hielo y contenía, en un volumen final de 10  $\mu\text{l}$ , las cantidades apropiadas de inserto y vector (previamente purificados y cuantificados), 1  $\mu\text{l}$  de tampón de ligación 10x y 1 unidad de DNA ligasa del fago T4 (Roche). Las reacciones se incubaron en un baño a 16 °C toda la noche.

Por otra parte, para las ligaciones en los vectores pGEMT Easy y pCR8/GW/TOPO se utilizaron los kits respectivos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.10.2 Ligación de fragmentos de DNA mediante la tecnología Gateway

En aquellos casos en los que la ligación de fragmentos de DNA se realizó mediante el sistema Gateway (Invitrogen), en lugar del uso de DNA ligasas convencionales, se procedió a una reacción de recombinación LR catalizada por la enzima LR clonase (Invitrogen) entre un vector de entrada que contenía extremos *attL* y un vector de destino con extremos *attR*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.11. Hibridaciones *in situ* de RNA (RNA ISH)**

La fijación e inclusión en parafina de los tejidos para ISH está descrita en el apartado 2.13.3.

### 2.11.1 Síntesis de sondas de RNA marcadas con digoxigenina

Para todos los casos, se linearizaron con el enzima de restricción apropiado (Tabla M.8) 1.7  $\mu\text{g}$  de los plásmidos con el fragmento de cDNA del gen cuyo mRNA se pretendía detectar por ISH, dejando un extremo 5' protuberante en el sitio de corte. Los plásmidos así linearizados se utilizaron como molde para la transcripción *in vitro* de sondas de RNA de simple cadena, en sentido y/o antisentido, utilizando las RNA polimerasas indicadas en la Tabla M.8. Durante la transcripción *in vitro*, las sondas de RNA se marcaron con el ribonucleótido UTP conjugado a una molécula de digoxigenina. Finalmente, estas sondas de RNA se hidrolizaron en tampón carbonato (pH 10.2) a 60 °C durante el tiempo mostrado en la Tabla M.8. Todo el proceso de síntesis e hidrólisis de las sondas de RNA se realizó según Coen *et al.* (2008) y Brewer *et al.* (2009). Los plásmidos empleados para la síntesis de las diferentes sondas de RNA están incluidos en la Tabla M.4

**Tabla M.8. Sondas de RNA utilizadas en las ISH**

Gen	Sonda	Fragmento <sup>a</sup>	Plásmido	Digestión	RNA polimerasa	Tiempo de hidrólisis
<i>TCP7</i>	Antisentido	1-400	pFN86 Rev	Sph	T7	0 min
	Sentido	1-400	pFN86 Rev	Sal I	SP6	0 min
<i>TFL1</i>	Antisentido	1-500	pD108	Sal I	T7	30 min
	Sentido	1-500	pD108	Sph	SP6	30 min

<sup>a</sup> Fragmento del cDNA contenido en la sonda, considerando 1 el primer nucleótido del ATG.

### 2.11.2 Cuantificación de las sondas de RNA

Las sondas, previamente precipitadas con tRNA de levadura (1 µg/µL, Roche Diagnostics), acetato amónico 0.6 M y etanol absoluto, se centrifugaron a 4°C y 13000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol 70%, se dejó secar al aire y se resuspendieron en 10 µL de agua tratada con DEPC. Con 1 µL de esta disolución para cada una de las sondas, se prepararon las diluciones empleadas en la cuantificación (1/20, 1/250, 1/1.000 y 1/2500). Para ello, se aplicó 1 µL de cada una de las diluciones anteriores a una membrana de nailon *Hybond-XL* (Amersham Pharmacia Biotech) que, tras secarse, se irradió con luz UV. El revelado de esta membrana se realizó junto con una tira control con distintas concentraciones de RNA marcado con digoxigenina *RNA Scripts Test* (Roche Diagnostics). Se incubaron las tiras en TBS 1X (stock preparado a concentración 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 4 M; pH 7.5) durante 2 minutos, y a continuación se incubaron 10 minutos en TBS 1X con agente bloqueante 0.5% (p/v) (Roche Diagnostics). Se incubaron durante 15 minutos en TBS 1X con el anticuerpo anti-DIG-ab (1/3000, Roche Diagnostics), y se lavaron 1 minuto en tampón de detección 1X sin sustrato (stock preparado 10X: Tris-HCl 1 M; NaCl 1 M; MgCl<sub>2</sub> 0.5 M; pH 9.5). Por último, se reveló incubando con tampón de detección 1X con sustrato [150 µL de NBT (100 mg/mL) y 150 µL de BCIP (50 mg/mL) por cada 100 mL de tampón; Roche Diagnostics] durante el tiempo suficiente para que se viera el último punto de la tira control.

La concentración de sonda a utilizar en cada caso fue la que más se aproximó al penúltimo punto de la tira control.

### 2.11.3 Prehibridación, hibridación e inmunodetección colorimétrica de la señal

La preparación de las muestras, hibridación con las sondas de RNA, inmunodetección colorimétrica de la señal, tinción con calcoflúor y montaje de los portaobjetos se realizó según Weigel y Gazelbrook (2002).

En todos los ensayos realizados, como control positivo, se hibridaron algunas secciones con la sonda RNA antisentido del cDNA de *TFL1*. Asimismo, como control negativo, se hibridaron algunas secciones con las sondas de RNA sentido de los cDNAs de *TFL1* y *TCP7*. La temperatura de hibridación fue 53.5°C para todos los casos.

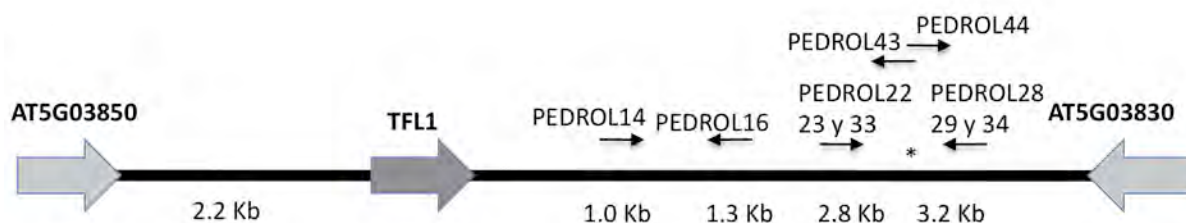
## 2.12. Construcción de los plásmidos

Todas las construcciones y vectores que se citan a continuación están recogidas en la Tabla M.4. Asimismo, todos los oligonucleótidos utilizados para el diseño de estas construcciones están en la Tabla M.5. Cabe indicar que todos los fragmentos amplificados por PCR y posteriormente clonados a los que nos referimos en este apartado se secuenciaron para comprobar que no había mutaciones (apartado 2.17.1.3).

### 2.12.1 Construcciones cebo para los ensayos de híbrido simple

Las construcciones utilizadas como cebo en los ensayos de híbrido simple contenían la región 1.0-1.3 Kb de la región 3' no codificante de *TFL1* clonada en el vector pINT-His-3B (construcción pFN55), la región 2.8-3.2 Kb del 3' de *TFL1* clonada en el vector pINT-His-3B (pFN56) o en pHISi (pFN37A) o esa misma región pero en sentido opuesto clonada en pHISi (pFN37B). La Figura M.1 informa de la posición en la región genómica de *TFL1* de los oligonucleótidos utilizados para amplificar esos fragmentos.

Para la construcción de pFN55 se procedió a clonar en pGEMT Easy el fragmento amplificado por la PCR con los oligonucleótidos PEDROL14 y PEDROL16, utilizando como molde una miniprep del plásmido pBSKTFL1, generando así la construcción pFN53. Posteriormente, este fragmento (correspondiente a la región 1.0-1.3 Kb del 3' de *TFL1*) se clonó como XbaI/SpeI en pINT-His-3B.



**Figura M.1. Diseño de las construcciones cebo utilizadas para los ensayos de híbrido simple.** Región genómica de *TFL1* en *Arabidopsis* y posición de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos 1.0-1.3 Kb y 2.8-3.2 Kb de la región 3' de *TFL1* que se utilizaron como cebo en los escrutinios de híbrido simple. El asterisco señala la posición del posible sitio de unión de *TCP7*.



Para la construcción de pFN56 se procedió a clonar en pGEMT Easy el fragmento amplificado por la PCR con los oligonucleótidos PEDROL33 y PEDROL28, utilizando como molde una miniprep del plásmido pBSKTFL1, generando así la construcción pFN54. Posteriormente, este fragmento (correspondiente a la región 2.8-3.2 Kb del 3' de *TFL1*) se clonó como XbaI/SpeI en pINT-His-3B.

Para la construcción de pFN37A se procedió a clonar en pGEMT Easy el fragmento amplificado por la PCR con los oligonucleótidos PEDROL22 y PEDROL29, utilizando como molde una miniprep del plásmido pBSKTFL1, generando así la construcción pFN30. Posteriormente, este fragmento (correspondiente a la región 2.8-3.2 Kb del 3' de *TFL1*) se clonó como EcoRI/XbaI en pHISi.

Para la construcción de pFN37B se procedió a clonar en pGEMT Easy el fragmento amplificado por la PCR con los oligonucleótidos PEDROL23 y PEDROL28, utilizando como molde una miniprep del plásmido pBSKTFL1, generando así la construcción pFN31. Posteriormente, este fragmento (correspondiente a la región 2.8-3.2 Kb del 3' de *TFL1*) se clonó como EcoRI/XbaI en pHISi.

Posteriormente, para eliminar el posible sitio de unión de TCP7 en la región 2.8-3.2 de la región 3' no codificante de *TFL1* y ensayar de nuevo la interacción por híbrido simple con el cDNA de *TCP7* se construyó el plásmido pFN51. Para ello, se procedió a clonar en pGEMT Easy, desde el principio de esta región hasta la caja TCP amplificando con los oligonucleótidos PEDROL22 y PEDROL43 (sustituye parte de la caja TCP por un sitio HindIII), utilizando como molde una miniprep del plásmido pBSKTFL1, generando así la construcción pFN48B. En paralelo se clonó, también en pGEMT Easy, desde la caja TCP hasta el final de la mencionada región, amplificando con los oligonucleótidos PEDROL44 (sustituye el resto de la caja TCP por un sitio HindIII) y PEDROL34 usando el mismo molde que anteriormente, generando así la construcción pFN49B. Posteriormente, con NcoI/HindIII a partir de pFN48B y pFN49B se construyó un plásmido derivado de estos dos que contenía la región 2.8-3.2 Kb con la caja TCP sustituida por un sitio HindIII (pFN50). Para finalizar, este fragmento (correspondiente a la región 2.8-3.2 Kb del 3' de *TFL1* sin la caja TCP) se clonó como EcoRI/XbaI en pHISi, dando lugar a la construcción pFN51.

#### 2.12.2 Construcción con el fragmento de cDNA a partir de la cual se sintetizó la sonda para la RNA ISH de *TCP7*

Los primeros 400 pb de la secuencia codificante de *TCP7* se amplificaron mediante una PCR con el par de oligonucleótidos PEDROL149 y PEDROL151, utilizando como molde una miniprep de pFN57, que contiene la secuencia codificante de TCP7. El producto final de la PCR se clonó en pGEMT Easy (pFN86 Rev). Esta construcción fue utilizada tal y como se indica en el apartado 2.10.1 para sintetizar la sonda utilizada para la RNA ISH llevada a cabo sobre ápices de plantas Col silvestre. Cabe mencionar que la región de 400 pb de la secuencia codificante de

*TCP7* empleada comparte un 60% de identidad en la secuencia de nucleótidos con *TCP21*.

### 2.12.3 Construcción 35S::TCP7

La región codificante de *TCP7* se amplificó por medio de una PCR con el par de oligonucleótidos PEDROL58 y PEDROL60 sobre el producto de una retrotranscripción procedente de RNA total de ápices inflorescentes en *bolting* de *Col silvestre* y se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO. Este plásmido (pFN57) se utilizó como vector de entrada para introducir la región codificante de *TCP7*, usando la tecnología *Gateway* descrita en el apartado 2.10.2, en el vector de destino pEarleyGate 100 (construcción pKC5), vector binario para la transformación de plantas que contiene el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Earley *et al.*, 2006).

### 2.12.4 Construcción TCP7-RNAi

Por medio de una PCR con los oligonucleótidos PEDROL123 y PEDROL126, usando como molde una retrotranscripción procedente de RNA total de ápices inflorescentes en *bolting* de *Col silvestre*, se amplificó un fragmento de 286 pb correspondiente a las últimas 124 pb de la secuencia codificante de *TCP7* y primeras 162 pb de la 3'UTR (Alineamiento S4, materiales suplementarios). Posteriormente, dicho producto de la PCR se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO, obteniendo así un vector de entrada (pFN90) con el que llevar a cabo una reacción de *Gateway* utilizando como vector de destino pB7GWIWG2(I),0. Este vector binario es un derivado adaptado al sistema *Gateway* del vector pHANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001; Wesley *et al.*, 2003) que contiene tras el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor dos sitios de clonaje *Gateway* invertidos (attR1-attR2 y attR2-attR1) separados por un intrón. Así, la región del cDNA de *TCP7* contenida en pFN90 se clonará en el vector pB7GWIWG2(I),0 dos veces, en forma directa e invertida, separadas por el intrón. La transcripción de esta construcción da lugar a un pequeño RNA de doble cadena con *hairpin* que induce el silenciamiento en la planta de los transcritos complementarios a la secuencia originalmente contenida en pFN90 (Wesley *et al.*, 2001).

## **2.13. Métodos de histología y microscopía**

Estos trabajos se realizaron en el Servicio de Microscopía del IBMCP (Valencia) con excepción de lo relativo a la microscopía electrónica que se realizó en el Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València.

### 2.13.1 Análisis de la actividad GUS

Las muestras, generalmente ápices vegetativos o inflorescentes, se recogieron con ayuda de unas pinzas, introduciéndolos en viales con solución de revelado (Tabla M.9). Tras la infiltración de los ápices con solución de revelado, aplicando vacío durante 5 minutos, se incubaron en esta solución durante 3 horas o toda la noche, según el caso, a 37 °C. Al día siguiente, los ápices se lavaron con concentraciones crecientes de etanol (v/v): etanol al 20%, etanol al 35%, etanol al 50%, FAE (50% etanol absoluto, 10% ácido acético glacial, 5% formaldehído (v/v)) y etanol al 70%. Cada lavado se realizó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez los ápices estaban en etanol al 70% se guardaron a 4 °C.

El ensayo de la actividad GUS es muy sensible y permite detectar la expresión de promotores débiles. Sin embargo, la alta estabilidad de la proteína GUS puede llevar a la obtención de artefactos (Jefferson *et al.*, 1987; Kavita y Burma, 2008). Por ello, durante la realización de este trabajo, se emplearon dos soluciones de revelado con diferentes concentraciones de ferro y ferricianuro (Tabla M.9). La solución de revelado 1, o condición de tinción GUS 1, es mucho más sensible y la intensidad de la señal generada es mayor. Esta tinción se utilizó para el escrutinio de la mutagénesis. La solución de revelado 2, o condición de tinción GUS 2, más astringente, conlleva menor actividad de la proteína GUS. De este modo, la intensidad de la señal obtenida es baja, generando patrones de expresión bien definidos en los que, generalmente, no se observa expansión de la señal a regiones donde el gen GUS no se está expresando (Sessions *et al.*, 1999). Esta tinción se utilizó para análisis más finos del patrón de expresión de TFL1pro::GUS, como por ejemplo, durante el desarrollo del SAM del mutante *moSS*.

**Tabla M.9. Soluciones de revelado utilizadas en las tinciones GUS**

	Condición 1	Condición 2
<b>Tampón fosfato sódico pH 7.0</b>	50 mM	50 mM
<b>Ferrocianuro de potasio</b>	2 mM	10 mM
<b>Ferricianuro de potasio</b>	2 mM	10 mM
<b>Triton-X-100</b>	0.2 % (v/v)	0.2 % (v/v)
<b>X-gluc</b>	1 mM	1 mM

### 2.13.1.2 Aclarado de muestras con hidrato de cloral

El aclarado de ápices y plántulas de *Arabidopsis* con hidrato de cloral se realizó según el protocolo *Cleared tissue for observation of vascular strands* descrito en Weigel y Glazebrook (2002), con algunas modificaciones.

Esta técnica se utilizó como una alternativa a la realización de cortes histológicos para analizar la expresión *GUS* a nivel tisular. Así, en primer lugar, se realizó la tinción GUS de las muestras según se describe en el apartado 2.13.1. A continuación, las muestras se pasaron a solución de hidrato de cloral (72% de hidrato de cloral y 11% de glicerol (v/v)). En el caso de los ápices inflorescentes, previamente se intentaba eliminar el máximo número posible de flores alrededor del meristemo. Las muestras en hidrato de cloral se incubaron durante 5-10 días a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual se dispusieron sobre un portaobjetos con 200  $\mu$ L de solución de hidrato de cloral. Para evitar aplastar las muestras con el cubreobjetos, se colocaron en los extremos del portaobjetos un par de etiquetas adhesivas, generando un hueco de unos 0.5 mm entre el cubreobjetos y el portaobjetos. Antes de observar las muestras en el microscopio, se sellaron los extremos del cubreobjetos con laca de uñas para evitar que la solución de hidrato de cloral dañara las lentes. Algunas de estas muestras se analizaron con microscopía interferencial Normarsky (Padawer, 1968), según se describe en el apartado 2.13.4.

### 2.13.2 Fijación e inclusión de muestras para RNA ISH

Una vez recogidas, las muestras de tejido se sumergieron inmediatamente en solución fijadora FAE (50% etanol absoluto, 5% ácido acético glacial y 3.7% formaldehído (v/v)) en hielo y se infiltraron al vacío durante, aproximadamente, 10 minutos, distribuidos en 2 pulsos de 5 minutos. A continuación, se sustituyó la solución de FAE por solución fresca y se fijaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron 2 veces con etanol al 70% (v/v) a temperatura ambiente y se guardaron, en etanol al 70%, a 4 °C hasta que se inició la inclusión en parafina.

Antes de la inclusión, las muestras se lavaron 2 veces con etanol al 90% (v/v) y se tiñeron con eosina al 0.2% (en etanol al 90%, p/v), primero durante 2 horas a temperatura ambiente y, a continuación, toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron lavados, de 1 h 15 minutos cada uno y a temperatura ambiente, en soluciones con concentración creciente de *Histo-Clear™ II* (National Diagnostics), y decreciente de etanol (v/v): 75%etanol:25%Histo-Clear, 50%etanol:50%Histo-Clear y 25%etanol:75%Histo-Clear. A continuación, se realizaron 3 lavados de 45 minutos con Histo-Clear tras los cuales las muestras se incubaron a 60 °C en una solución 50%Histo-Clear:50%parafina (v/v) durante toda la noche. En los dos días siguientes, se realizaron varios cambios de parafina a 60 °C, 2-3 por día. Al tercer día, tras comprobar que los viales con las muestras habían perdido el olor característico a Histo-Clear, se sacaron de la estufa a 60 °C, se dejaron atemperar y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

### 2.13.3 Obtención de cortes histológicos

Para la realización de cortes histológicos se utilizaron indistintamente los microtomos *Microm HM-330* y *Leica RM-2025* (Leica). Se realizaron secciones de 7-8  $\mu\text{m}$  de grosor para RNA ISH. Las tiras con los cortes se extendieron en un baño con agua destilada a 42 °C, se colocaron en portaobjetos *FisherBrand ProbeOn Plus Microscope Slides* (Fisher Scientific) y se dejaron secar sobre una placa calefactora a 40 °C durante una noche.

Si los cortes correspondían a muestras teñidas para GUS, se desparafinaron con 3 lavados de 3 minutos con Histo-Clear. A continuación, se dejó escurrir un poco el Histo-Clear de los portaobjetos y se distribuyeron 3 gotas de resina *Merckoglass*, (Merck), a lo largo de la región central. Al colocar el cubreobjetos, se presionó ligeramente para eliminar el exceso de resina, intentando evitar la formación de burbujas. Este montaje se dejó secando una noche a temperatura ambiente antes de observar los cortes al microscopio óptico.

Para las muestras de RNA ISH, el proceso de desparafinado y montaje se realizó según lo descrito en Weigel y Glazebrook (2002).

### 2.13.4 Observación y captura de imágenes con poco aumento

Para la obtención de imágenes de algunos detalles de las inflorescencias y de los ápices teñidos para GUS, se utilizó un microscopio estereoscópico binocular *Macro Fluo MZZ16F* (Leica) acoplado a una cámara digital *DFC300 FX* (Leica).

### 2.13.5 Microscopía óptica

Los cortes histológicos y, en general, las muestras dispuestas en portaobjetos (por ejemplo, algunas de las aclaradas con hidrato de cloral), se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico vertical *Eclipse 600* (Nikon) acoplado a una cámara fotográfica digital *DS-Fi1* (Nikon) y a un ordenador con el programa de análisis de imagen *Nis-Elements F 3.0* (Imaging Software). Las imágenes se obtuvieron con campo claro o mediante microscopía interferencial Normarsky.

### 2.13.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras vegetales se fijaron introduciéndolas en solución de fijación FAE inmediatamente después de su recolección. Posteriormente, fueron sometidas a 2-3 pulsos de vacío, de 3 minutos cada uno, se les cambió la solución fijadora por una fresca y se mantuvieron en ella durante 4-16 h a 4°C. Tras el proceso de fijación los tejidos se deshidrataron mediante una serie de lavados sucesivos, de 30 minutos, a 4°C, en soluciones crecientes de etanol (15%, 30%, 50%, 70% (v/v)); en este punto las muestras pueden ser almacenadas indefinidamente a 4°C hasta el momento en que vayan a ser analizadas por microscopía electrónica de barrido.

Posteriormente, las muestras previamente fijadas y almacenadas en etanol del 70%, se incubaron en etanol del 85% durante 30 minutos y luego en etanol absoluto durante al menos una hora. Posteriormente, las muestras se desecaron en CO<sub>2</sub> líquido, en un aparato secador de punto crítico *Polaron E300*, y se montaron en portaobjetos con cinta adhesiva de carbono activado sobre los que fueron orientadas y diseccionadas convenientemente. Después del montaje, las muestras fueron recubiertas con un sombreado de partículas de oro-paladio de 200 nm, en atmósfera de argón ionizado en un *Sputter Coater SCD005* (BALTEC).

Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma *ISIS* (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200 segundos por imagen, en un microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM-5410* operando bajo las condiciones de microanálisis de 10 kV y distancia de trabajo de 25 mm.

## **2.14 Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en fondos *moss*, *ago1-26* y *35S::TCP7***

### 2.14.1 Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en el mutante *moss*

El fondo genético original del mutante *moss* era *LerPBG1*. Por lo tanto, el mutante *moss* contenía una construcción delatora TFL1pro::GUS con una versión incompleta del promotor de *TFL1* (2.2 Kb en 5' y 2.8 Kb en 3'). Para analizar con detalle el patrón de expresión de TFL1pro::GUS en el mutante *moss*, hubo que sustituir el transgén TFL1pro::GUS con la versión incompleta del promotor de *TFL1* por otro transgén que contenía la versión completa del promotor de *TFL1* (2.2 Kb en 5' y 4.6 Kb en 3').

Para llevar a cabo este cambio, en primer lugar, fue necesario eliminar del fondo *moss* el transgén con la versión incompleta del promotor de *TFL1*. Para ello se cruzó un individuo heterocigoto para la mutación *moss* con una planta silvestre *Ler*. En la F<sub>2</sub> se seleccionó una línea heterocigota para la mutación *moss* (mediante el empleo de dCAPs, apartado 2.15) y que no contuviese el transgén (toda su descendencia resultó sensible a la germinación en placas de medio de cultivo con kanamicina, apartado 2.1.5.2).

Posteriormente, esta línea *moss* heterocigota sin transgén, se cruzó con la línea delatora *LerPBG6*, que contenía el transgén TFL1pro::GUS con la versión completa del promotor de *TFL1* (Serrano-Mislata, 2010). En la F<sub>2</sub> de este cruce se seleccionó una línea homocigota para el transgén y heterocigota para la mutación *moss*. El genotipado del transgén TFL1pro::GUS se llevó a cabo sembrando la descendencia de varias líneas F<sub>2</sub> en placas de medio de cultivo con kanamicina como se describió en el apartado 2.1.5.2. El genotipado de la mutación *moss* se realizó mediante dCAPS (apartado 2.15).

Para los experimentos de análisis de la expresión TFL1pro::GUS, se utilizaron las líneas *LerLPBG6* como control y esta línea *moss* que acabamos de describir.

Para el experimento de comparación del patrón de expresión TFL1pro::GUS durante el

desarrollo del SAM de plantas control y *moss* (Figura C1.10), se recogieron plántulas de diferentes edades de ambos genotipos. Para ello, estas plántulas se cultivaron en día largo en placas con medio de cultivo y se recogieron a distintos tiempos (desde el día 4 hasta el día 24 después de la estratificación). Para la tinción de GUS, todas las muestras se incubaron durante 3 horas con la condición 2 (apartado 2.13.1). Para la observación del patrón de expresión TFL1pro::GUS, las muestras se trataron con hidrato de cloral (apartado 2.13.1.2).

Para el experimento de comparación del patrón de expresión TFL1pro::GUS en el ápice inflorescente adulto de plantas control y *moss* (Figura C1.11 A), se recogió el ápice de la inflorescencia principal de plantas de ambos genotipos cultivadas durante 40 días en condiciones de día largo. Para la tinción de GUS, todas las muestras se incubaron durante toda la noche con la condición 2.

#### 2.14.2 Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en *ago1-26*

Para analizar el patrón de expresión de *TFL1* en el mutante *ago1-26*, se introdujo el transgén TFL1pro::GUS de la línea delatora *LerPBG6* (Serrano-Mislata, 2010) en el mutante *ago1-26* (fondo Col) mediante cruce. Debido al diferente fondo genético de ambas líneas, para su posterior uso como control del experimento, también se cruzó la línea *LerPBG6* con una planta Col silvestre.

El control utilizado para el análisis de la expresión de TFL1pro::GUS fue una línea F2 homocigota para el transgén TFL1pro::GUS procedente del cruce *LerPBG6* x Col. El genotipado previo de las líneas F2 del cruce *LerPBG6* x Col se realizó sembrando las descendencia de éstas en placas de medio de cultivo con kanamicina como se describió en el apartado 2.1.5.2.

Para el análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en fondo *ago1-26* se utilizaron dos líneas F3 homocigotas para la mutación *ago1-26* y al menos heterocigotas para el transgén TFL1pro::GUS. Para ello, se identificaron dos líneas F2 procedentes del cruce *LerPBG6* x *ago1-26* que segregaron en la siguiente generación tanto plantas resistentes a kanamicina como plantas con fenotipo mutante *ago1-26*.

Para el experimento final de análisis de la expresión TFL1pro::GUS en la línea control y en las dos líneas *ago1-26*, se seleccionaron plántulas de estas tres líneas resistentes a kanamicina y se transplantaron en tierra, cultivándose en condiciones de día largo. Tras el *bolting*, se recogieron ápices de las inflorescencias principales de las tres líneas para realizar la tinción de GUS. De las líneas *ago1-26*, sólo se recogieron ápices de aquellas plantas con fenotipo mutante. La tinción de GUS utilizada fue la condición número 1 (apartado 2.13.1), incubando la muestra durante toda la noche.

### 2.14.3 Análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en 35S::TCP7

Para analizar el patrón de expresión de *TFL1* en plantas con expresión ectópica de TCP7, se introdujo el transgén TFL1pro::GUS de la línea delatora *LerPBG6* (Serrano-Mislata, 2010) en la línea 35S::TCP7 #90 (fondo Col) mediante cruce. Debido al diferente fondo genético de ambas líneas, para su posterior uso como control del experimento, también se cruzó la línea *LerPBG6* con una planta Col silvestre.

El control utilizado para el análisis de la expresión de TFL1pro::GUS fue una línea F2 homocigota para el transgén TFL1pro::GUS procedente del cruce *LerPBG6* x Col. El genotipado de las líneas F2 del cruce *LerPBG6* x Col se realizó sembrando la descendencia de éstas en placas de medio de cultivo con kanamicina como se describió en el apartado 2.1.5.2.

Para el análisis de la expresión de TFL1pro::GUS en fondo 35S::TCP7 se utilizó una línea F3 doble homocigota para los transgenes TFL1pro::GUS y 35S::TCP7. El genotipado previo de las líneas F3 del cruce *LerPBG6* x Col se realizó sembrando la descendencia de éstas en placas de medio de cultivo con kanamicina y Basta como se describió en el apartado 2.1.5.2.

Para el experimento final de análisis de la expresión TFL1pro::GUS en la línea control y en la línea 35S::TCP7, se recogieron ápices de las inflorescencias principales de plantas procedentes de estas dos líneas cultivadas en condiciones de día largo. La tinción de GUS utilizada fue la condición número 2 (apartado 2.13.1), incubando la muestra durante toda la noche. Para la observación del patrón de expresión TFL1pro::GUS, las muestras se trataron con hidrato de cloral (apartado 2.13.1.2).

## **2.15 Genotipado por dCAPS**

El alelo *moss* del gen *AGO1* y algunas de las líneas procedentes del TILLING del gen *TCP7* se genotiparon mediante el diseño de dCAPS (*derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*; Neff *et al.*, 1998). Esta estrategia consiste en aprovechar el polimorfismo existente entre dos alelos de un mismo locus para originar un sitio de corte de una enzima de restricción en sólo uno de los dos alelos. Así, al amplificar el contexto del polimorfismo por PCR y digerir con la mencionada enzima, el tamaño de los fragmentos obtenidos variará en función del genotipo del individuo para ese par de alelos. En los dCAPS, uno de los dos oligonucleótidos utilizados para la PCR ha sido modificado en su secuencia con el fin de dar lugar, junto al polimorfismo existente, a un sitio de corte para un enzima de restricción. En la Tabla M.10 se describen los oligonucleótidos utilizados para el genotipado por dCAPS. La separación de los fragmentos tras ser sometidos a digestión con la correspondiente enzima de restricción se hizo en geles de agarosa 2% (v/v).

### 2.15.1 Generación de la línea empleada en la caracterización de la mutación *moss*

La línea utilizada para analizar el fenotipo del mutante *moss*, es una línea heterocigota



para la mutación *moss* obtenida tras cuatro retrocruces con la línea parental de la mutagénesis (*LerPBG1*). El genotipado de esta línea se hizo tanto por dCAPS, como por la segregación del fenotipo *moss*. Esta línea también se usó para el mapeo de la mutación (previo cruce con *Col silvestre*).

**Tabla M.10. Genotipado por dCAPS de algunos de los genotipos utilizados en este trabajo**

Alelo genotipado	Oligonucleótidos usados para la amplificación	Enzima de restricción empleado	Tamaño del fragmento silvestre	Tamaño del fragmento mutante
<i>moss</i> ( <i>AGO1</i> )	PEDROL56/ PEDROL57	XbaI	210 pb	237 pb
<i>stop</i> ( <i>TCP7</i> )	PEDROL54/ PEDROL97	PvuII	247 pb	275 pb
<i>línea 955</i> ( <i>TCP7</i> )	PEDROL98/ PEDROL99	NdeI	271 pb	300 pb
<i>línea 1222</i> ( <i>TCP7</i> )	PEDROL102/ PEDROL103	EcoRI	276 pb	301 pb
<i>línea 1309</i> ( <i>TCP7</i> )	PEDROL54/ PEDROL140	Asp700	241	201
<i>línea 6509</i> ( <i>TCP7</i> )	PEDROL58/ PEDROL59	RsaI	669	555

## 2.16 Ensayos de híbrido simple

### 2.16.1 Escrutinio mediante híbrido simple de una genoteca de dímeros de proteínas MADS

Este experimento se realizó en el laboratorio del Dr. G. Angenent en el Plant Research International (Wageningen, Países Bajos) bajo la dirección del Dr. R. Immink. La mayor parte de la metodología empleada está descrita en (de Folter *et al.*, 2005; Ciannamea *et al.*, 2006).

Los plásmidos utilizados como cebo en este ensayo fueron pFN55 y pFN56, en los que la expresión del gen delator *HIS3* (síntesis de histidina) estaba controlada por los fragmentos 1.0-1.3 Kb y 2.8-3.2 Kb de la región 3' no codificante de *TFL1*, respectivamente. El vector vacío pINT-His-3B se utilizó como control negativo. Todos ellos se digirieron con NcoI, previamente a la transformación, para permitir su integración en el genoma de la cepa de *S. cerevisiae* pJ69-4a tal y como se describe en el apartado 2.3.2.

Las colonias transformantes, crecidas en medio de selección SD sin histidina (SD-H), se comprobaron mediante PCR directamente de colonia con el par de oligos PRAT118 y PRI846. Posteriormente, se escogieron 6 colonias transformantes para cada construcción y se sembraron en medio sólido SD-H con concentraciones crecientes del inhibidor de la síntesis de histidina 3-amino-trizol (3-AT). Para cada transformación, se seleccionaron aquellas dos colonias cuyo

crecimiento era inhibido por concentraciones más bajas de 3-AT, asegurándonos así un bajo ruido de fondo en la expresión del gen delator *HIS3*, lo que ayuda a reducir el número de falsos positivos en el escrutinio final con la genoteca.

Las dos colonias de cada transformación seleccionadas en el paso anterior se conjugaron (*mating*) con levaduras de la cepa pJ69-4a que contenían la genoteca de dímeros de factores de transcripción MADS (seleccionable en medio SD -Triptófano -Leucina). Hay que indicar que esta genoteca se encontraba ordenada en placas de 96 pocillos, por lo que en todo momento se conocía a qué dímero correspondía cada pocillo. El escrutinio final se hizo incubando las levaduras diploides en medio SD-H-W-L y concentraciones crecientes de 3-AT durante una semana a temperatura ambiente. Sólo aquellas células en las que hubo interacción entre el dímero de factores de transcripción MADS y el fragmento del promotor de *TFL1* utilizado como cebo podían expresar *HIS3* a niveles lo suficientemente altos como para superar el efecto inhibitorio del 3-AT. Para la preparación de los medios de cultivo utilizados en el escrutinio se siguieron las instrucciones descritas en el apartado 2.3.1.

#### 2.16.2 Escrutinio por híbrido simple de una genoteca de cDNA de planta entera

Este experimento se realizó en el laboratorio del Dr. M. Kater en la Universidad de Milán (Milán, Italia) bajo la dirección de la Dra. S. Massiero y se siguió el protocolo descrito en el manual *MATCHMAKER one-hybrid sistem user manual* de Clontech.

Los primeros pasos fueron idénticos a los descritos en el apartado anterior pero usando plásmidos que derivaban del vector pHISi en este caso, concretamente pFN37A (fragmento 2.8-3.2 de la región 3' no codificante de *TFL1*) y pFN37B (el mismo fragmento invertido). Las transformaciones se hicieron en la cepa de levadura Y187 y previamente se digirieron los plásmidos con AflII para permitir su integración en el genoma de la levadura.

El *mating* en este caso se hizo con una genoteca de cDNA procedente de todos los tejidos y estados de desarrollo de una planta clonada en el plásmido pGADT7rec y con la que previamente se había transformado la cepa AH109 (seleccionable en medio SD-L). El escrutinio final de los diploides se hizo en medio SD-H-L en las mismas condiciones que el apartado anterior.

Puesto que en este caso se desconocía el cDNA contenido en los clones identificados como positivos, para cada clon hubo que extraer DNA plasmídico y secuenciar. La extracción del DNA plasmídico y de los clones positivos se realizó mediante el protocolo descrito en el apartado 2.4.4. Posteriormente se utilizó ese DNA para transformar *E. coli*, de donde se extrajo y secuenció con el oligo Ve47. Se determinó la secuencia de, aproximadamente, 80 clones positivos del escrutinio realizado con pFN37A como cebo. Las secuencias obtenidas se compararon por *BLAST* con a una bases de datos de cDNA de Arabidopsis (TAIR), identificando así el gen contenido en cada clon positivo.

Para analizar la posible existencia de más clones positivos para *TCP7* y *VOZI* en el escrutinio realizado con el plásmido cebo pFN37B, se realizaron ensayos de amplificación por PCR a partir de las extracciones de DNA de levadura de los clones positivos con el oligonucleótido directo Ve47 y utilizando como reversos oligonucleótidos internos diseñados a partir de la secuencia de los cDNA de *TCP7* (PEDROL35) y *VOZI* (PEDROL36).

Para analizar si tenía lugar la unión de *TCP7* al fragmento 2.8-3.2 de la región 3' no codificante de *TFL1* sin el posible sitio de unión de TCP (construcción pFN51), se procedió a transformar Y187 con pFN51 del mismo modo anteriormente explicado. Después, se evaluó de nuevo el ruido de fondo con 3-AT para levaduras transformadas con pFN37A, pFN51 o pHISi y las colonias seleccionadas se transformaron con los vectores presa extraídos de los clones 58 y 10, que habían resultado positivos para *TCP7* y *VOZI* en el escrutinio anterior. Para el escrutinio final se procedió según lo previamente descrito.

## **2.17 Determinación y análisis de secuencias de DNA**

### 2.17.1 Determinación de las secuencias de DNA utilizadas en este trabajo

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Valencia) con el sistema *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). La reacción de secuenciación se realizó en termocicladores *ABI GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) y la resolución y análisis de los productos se realizó en un secuenciador capilar *ABI 3100* (Applied Biosystems). Las muestras de DNA se prepararon según se indica en la página web del Servicio de Secuenciación del IBMCP ([www.ibmcp.upv.es](http://www.ibmcp.upv.es)). Para la lectura de las secuencias obtenidas se utilizó el programa *4Peaks* (Mek&Tosj).

#### 2.17.1.1 Secuenciación del gen *AGO1* del mutante *moss*

Para la secuenciación del gen *AGO1* en el mutante *moss*, se extrajo DNA genómico de dos plantas con fenotipo *moss* mediante el protocolo descrito en el apartado apartado 2.4.5. Utilizando este DNA como molde, se llevaron a cabo tres reacciones de PCR con las que se consiguió dividir el locus *AGO1* en tres fragmentos solapantes, amplificando con los pares de oligonucleótidos AGOF2/AGOR1; AGOF1/AGOR8 y AGOF6/AGOR6. Posteriormente se determinó la secuencia de cada fragmento. Los oligonucleótidos utilizados para desarrollar esta estrategia están recogidos en la Tabla M.5.

### 2.17.1.2 Secuenciación de las regiones genómicas de *TFL1* en *A. thaliana*, *C. bursa-pastoris* y *B. rapa*

Para la secuenciación de los ortólogos de *TFL1* y sus regiones intergénicas en *A. thaliana* (*Ler*), *C. bursa-pastoris* y *B. rapa*, se utilizaron como molde de DNA el plásmido pBSKTFL1, el cósmido pCLD04541 extraído del clon CT3F15 de la genoteca de *C. bursa-pastoris* y el BAC pCUGIBACI del clon KBrH 96B10 de la genoteca de *B. rapa*. Los oligonucleótidos utilizados para dichas secuenciaciones están descritos en la Tabla M.5. Para el ensamblaje de las secuencias generadas se utilizó el programa informático *SeqMan-DNASTAR* (Lasergene).

### 2.17.1.3 Secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR y clonados en las diferentes construcciones

La secuenciación de estas regiones sirvió para comprobar que la PCR no había introducido mutaciones durante la amplificación. Puesto que todos estos fragmentos procedían de reacciones de PCR y se clonaron en vectores comerciales como el pGEMT Easy o PCR8/GW/TOPO (apartado 2.12), para su secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos recomendados para tal fin por los fabricantes.

## 2.17.2 Análisis de las secuencias utilizadas en el análisis comparativo de la región genómica de *TFL1* en diferentes especies de brasicáceas

### 2.17.2.1 Predicción de genes

Para predecir la estructura de exones e intrones de los ortólogos de *TFL1* de las diferentes especies de brasicáceas se utilizaron los programas *GENSCAN* (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) y *GeneMark* (<http://opal.biology.gatech.edu/GeneMark/>)

Para identificar los genes situados en 5' ó 3' de los ortólogos de *TFL1* en estas especies, se compararon por *BLAST* los extremos de sus secuencias no codificantes con una base de datos de cDNA de Arabidopsis del TAIR.

### 2.17.2.2 Análisis comparativo de las secuencias

Todos los análisis realizados se han llevado a cabo utilizando las aplicaciones *mVISTA* (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) y *CHAOS-DIALIGN* (<http://dialign.gobics.de/chaos-dialign-submission>). En ambos casos se trata de un conjunto de programas capaces de comparar largas secuencias de DNA con aparentemente baja similitud, alineándolas de forma fiable. Por lo tanto, estos programas son ideales para el análisis de secuencias procedentes de genomas de especies diferentes, como es nuestro caso. La diferencia entre ambas herramientas difiere en el algoritmo que emplean para alinear las secuencias, así como en la forma de presentar los resultados (Brudno *et al.*, 2003; Brudno *et al.*, 2004; Frazer *et al.*, 2004). Mientras que *mVISTA*

es más gráfico y permite una visualización sencilla de la información, *DIALIGN* es menos intuitivo pero tiene la característica de dar una puntuación a la secuencia alineada, valorando si dicha coincidencia se debe a puro azar o no. Dado el alto grado de coincidencia entre los resultados de ambos programas, en este trabajo sólo hemos mostrado los resultados obtenidos a través de *mVISTA*.

Los parámetros utilizados para el análisis con *mVISTA* fueron un alineamiento *shuffle-LAGAN* (permite detectar reordenamientos genómicos) con una ventana de 100 pb y un porcentaje mínimo de identidad del 75%.

### 2.17.2.3 Predicción de sitios de unión a factores de transcripción

Se utilizaron, principalmente, dos recursos accesibles desde internet llamados *rVISTA* y *PLACE* (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html>), que comparan una secuencia dada contra bases de datos de secuencias conocidas a las que se unen factores de transcripción (Loots *et al.*, 2002; Higo *et al.*, 1999). La principal diferencia es que *PLACE* busca secuencias exactamente iguales a la introducida por el usuario mientras que *rVISTA* trabaja con matrices. Esto quiere decir que su búsqueda es más laxa, permitiendo variaciones entre la secuencia sometida a análisis y la registrada en la base de datos. Además, *rVISTA* permite ser utilizado directamente sobre los resultados obtenidos por *mVISTA*. También se procedió a la búsqueda de sitios de unión de factores de transcripción (TFBSs) de forma manual, buscando directamente en nuestras secuencias las secuencias consenso de TFBSs descritas en la bibliografía. Siempre que un TFBS fue predicho usando herramientas informáticas, se ratificó de forma manual evaluando el grado de concordancia con las secuencias publicadas para ese TFBS en la bibliografía (Tabla M.11). Por ejemplo, de entre todas las cajas CArG identificadas por estos programas, sólo se consideraron válidas aquellas que diferían como máximo en una base respecto al consenso CHW6DG y siempre que ésta estuviera dentro del núcleo central de 6 adeninas o timinas. En la Tabla M.11 se describe cómo se predijo cada TFBS anotado en los alineamientos S2 y S3.

Para la realización de la Figura C2.7 y los alineamientos S2-S3 se decidió tener en cuenta solamente aquellos TFBSs que estuvieran dentro de los módulos conservados, con excepción de los sitios de unión de factores de transcripción MADS, LFY, TCP y WUS que, dada su potencial importancia, sí aparecen representados en su totalidad.

**Tabla M.11. Metodología empleada para la predicción de sitios de unión de factores de transcripción**

Motivo <sup>a</sup>	Método de predicción <sup>b</sup>	Secuencia Consenso <sup>c</sup>	Referencia <sup>d</sup>
ABRE (elemento de respuesta a ABA)	rVISTA	CACGTGGC	(Guiltinan <i>et al.</i> , 1990)
AuxRE (elemento de respuesta a auxinas)	rVISTA	TGTCTC	(Ulmasov <i>et al.</i> , 1999)
Sitio de unión de ARR-B	rVISTA	NGATT	(Tajima <i>et al.</i> , 2004)
Sitio de unión de bZIP	rVISTA	ACGT	(Izawa <i>et al.</i> , 1993)
Caja CArG	rVISTA/manual	CHW <sub>6</sub> DG	R. Immink, comunicación personal
Sitio de unión de DOF	rVISTA/PLACE	AAAG	(Yanagisawa, 2002)
ERE (elemento de respuesta a etileno)	rVISTA	GCCGCC	(Solano <i>et al.</i> , 1998)
GARE (elemento de respuesta a giberelinas)	rVISTA/PLACE	TAACAAR	(Mikihiro Ogawa, 2003)
Caja SAM-L1	rVISTA/PLACE	TAAATGYA	(Abe <i>et al.</i> , 2001)
Sitio de unión de LFY	manual	CCANTG	(Busch <i>et al.</i> , 1999; Parcy <i>et al.</i> , 1998)
Sitio de unión de MYB	rVISTA/PLACE	WACCA	(Martin y Paz-Ares, 1997)
Sitio de unión de TCP	rVISTA/PLACE	GGNCCC	(Kosugi y Ohashi, 2002)
Sitio de unión de WUS	rVISTA/manual	TTAATGG	(Lohmann <i>et al.</i> , 2001)

<sup>a</sup> Nombre del sitio de unión. <sup>b</sup> Método con el que se predijo (rVISTA, PLACE o búsqueda manual). <sup>c</sup> Secuencia consenso para cada sitio de unión. <sup>d</sup> Referencia donde se describe. D=A/G/T; H=A/C/T; N=A/T/C/G; R=A/T; W=A/T; Y=C/T.

### 2.17.3 Otras herramientas informáticas utilizadas en este trabajo

Otros programas informáticos utilizados durante este trabajo han sido *VectorNTI* (Invitrogen) para el diseño de las construcciones, *Phylogeny* ([http://www.phylogeny.fr/version2\\_cgi/index.cgi](http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi)) para la construcción de árboles filogenéticos (Dereeper *et al.*, 2008), *PrimerExpress* (Applied Biosystems) para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR, BCM Search Launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>), para dar formato a las secuencias, o las herramientas de *Expasy* (<http://expasy.org/tools/>), para la predicción de dominios en proteínas. Del mismo modo, se han utilizado las bases de datos que aparecen descritas en la Tabla M.12.

**Tabla M.12. Bases de datos utilizadas en este trabajo**

<b>Base de datos</b>	<b>Dirección web</b>	<b>Utilidad</b>
TAIR (The Arabidopsis Information Resource)	<a href="http://www.arabidopsis.org">www.arabidopsis.org</a>	Cualquier tarea relacionada con Arabidopsis
BAR (Bio-Array Resource)	<a href="http://bar.utoronto.ca/">http://bar.utoronto.ca/</a>	Datos sobre la expresión de genes en Arabidopsis
AVT (AtGenExpress Visualization Tool)	<a href="http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp">http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp</a>	Datos sobre la expresión de genes en Arabidopsis
GeneInvestigator	<a href="https://www.geneinvestigator.com/gv/index.jsp">https://www.geneinvestigator.com/gv/index.jsp</a>	Datos sobre la expresión de genes en Arabidopsis
Salk Institute Arabidopsis Epigenome	<a href="http://neomorph.salk.edu/epigenome/epigenome.html">http://neomorph.salk.edu/epigenome/epigenome.html</a>	Datos sobre el estado de metilación del genoma de Arabidopsis
MicroInspector	<a href="http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/">http://bioinfo.uni-plovdiv.bg/microinspector/</a>	Predicción de sitios de reconocimiento de pequeños RNAs
Brassica Genome Gateway	<a href="http://brassica.bbsrc.ac.uk/">http://brassica.bbsrc.ac.uk/</a>	Obtención del BAC KBrH 96B10
Phytozome	<a href="http://www.phytozome.net/">http://www.phytozome.net/</a>	Obtención de secuencias de ortólogos de <i>TFL1</i> en <i>A. lyrata</i> y <i>V. vinifera</i>
PlantCARE (Plant Cis Acting response Elements)	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/</a>	Factores de transcripción de plantas





# BIBLIOGRAFÍA



- Abe, M., Takahashi, T., and Komeda, Y.** (2001). Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant Journal* **26**: 487–494.
- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Ichinoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., and Araki, T.** (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**: 1052–1056.
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., and Harberd, N.P.** (2004). Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* **131**: 3357–3365.
- Aggarwal, P., Das Gupta, M., Joseph, A.P., Chatterjee, N., Srinivasan, N., and Nath, U.** (2010). Identification of Specific DNA Binding Residues in the TCP Family of Transcription Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 1174–1189.
- Aguilar-Martinez, J.A., Poza-Carrion, C., and Cubas, P.** (2007). Arabidopsis BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *Plant Cell* **19**: 458–472.
- Ahearn, K.P., Johnson, H.A., Weigel, D., and Wagner, D.R.** (2001). NFL1, a Nicotiana tabacum LEAFY-like gene, controls meristem initiation and floral structure. *Plant Cell Physiology* **42**: 1130–1139.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., and Weigel, D.** (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J* **25**: 605–614.
- Aida, M., Ishida, T., and Tasaka, M.** (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during Arabidopsis embryogenesis: interaction among the CUP-SHAPED COTYLEDON and SHOOT MERISTEMLESS genes. *Development* **126**: 1563–1570.
- Alvarez, J., Guli, C., Yu, X., and Smyth, D.** (1992). terminal flower: a gene affecting inflorescence development in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **2**: 103–116.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant Journal* **61**: 1001–1013.
- Amaya, I., Ratcliffe, O.J., and Bradley, D.J.** (1999). Expression of CENTRORADIALIS (CEN) and CEN-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *Plant Cell* **11**: 1405–1418.
- Arnone, M., and Davidson, E.** (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* **124**: 1851.
- Asakura, A., Lyons, G.E., and Tapscott, S.J.** (1995). The regulation of MyoD gene expression: conserved elements mediate expression in embryonic axial muscle. *Developmental Biology* **171**: 386–398.
- Bancroft, I., Love, K., Bent, E., Sherson, S., Lister, C., Cobbett, C., Goodman, H.M. and Dean, C.** (1997) A strategy involving the use of high redundancy YAC subclone libraries facilitates the contiguous representation in cosmid and BAC clones of 1.7 Mb of the genome of the plant Arabidopsis thaliana. *Weeds World* **4** (ii) 1-9. URL: <http://arabidopsis.org/ww/Vol4ii/bancroft.html>.

- Banfield, M.J., and Brady, R.L.** (2000). The structure of Antirrhinum centroradialis protein (CEN) suggests a role as a kinase regulator. *Journal of Molecular Biology* **297**: 1159–1170.
- Bastow, R.M., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A., and Dean, C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* **427**: 164–167.
- Baurle, I.** (2005). Regulation of WUSCHEL Transcription in the Stem Cell Niche of the Arabidopsis Shoot Meristem. *Plant Cell* **17**: 2271–2280.
- Bayer, E., Smith, R., Mandel, T., Nakayama, N., Sauer, M., Prusinkiewicz, P., and Kuhlemeier, C.** (2009). Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. *Genes & Development* **23**: 373–384.
- Bechtold, N., and Ellis, J. and Pelletier G.** (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* **316**: 1194–1199.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A., and Madueño, F.** (2007). Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Annals of Botany* **100**: 659–676.
- Beveridge, C.A., Symons, G.M., and Turnbull, C.G.** (2000). Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes Rms1 and Rms2. *Plant Physiology* **123**: 689–698.
- Bilsborough, G., Runions, A., Barkoulas, M., Jenkins, H., Hasson, A., Galinha, C., Laufs, P., Hay, A., Prusinkiewicz, P., and Tsiantis, M.** (2011). Model for the regulation of Arabidopsis thaliana leaf margin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 3424–3429.
- Blanc, G., Hokamp, K., and Wolfe, K.H.** (2003). A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Research* **13**: 137–144.
- Blazquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M., and Weigel, D.** (1998). Gibberellins promote flowering of arabidopsis by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791–800.
- Blazquez, M.A., and Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in Arabidopsis. *Nature* **404**: 889–892.
- Boffelli, D., McAuliffe, J., Ovcharenko, D., Lewis, K.D., Ovcharenko, I., Pachter, L., and Rubin, E.M.** (2003). Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science* **299**: 1391–1394.
- Bowman, J.L.** (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Springer-Verlag, New York.
- Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., and Meyerowitz, E.** (1993). Control of flower development in Arabidopsis thaliana by APETALA1 and interacting genes. *Development*.
- Bowman, J.L., and Eshed, Y.** (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Science* **5**: 110–115.
- Bradley, D., Carpenter, R., Sommer, H., Hartley, N., and Coen, E.** (1993). Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the plena locus of Antirrhinum. *Cell* **72**: 85–95.

- Bradley, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Rothstein, S., and Coen, E.** (1996). Control of inflorescence architecture in *Antirrhinum*. *Nature* **379**: 791–797.
- Bradley, D.J., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., and Coen, E.** (1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science* **275**: 80–83.
- Brand, U., Fletcher, J.C., Hobe, M., Meyerowitz, E.M., and Simon, R.** (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* **289**: 617–619.
- Brand, U., Hobe, M., and Simon, R.** (2001). Functional domains in plant shoot meristems. *Bioessays* **23**: 134–141.
- Brewer, P.B., Dun, E., Ferguson, B., Rameau, C., and Beveridge, C.A.** (2009). Strigolactone acts Downstream of Auxin to Regulate Bud Outgrowth in Pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* .
- Broholm, S.K., Tähtiharju, S., Laitinen, R.A.E., Albert, V.A., Teeri, T.H., and Elomaa, P.** (2008). A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 9117–9122.
- Brudno, M., Malde, S., Poliakov, A., Do, C.B., Couronne, O., Dubchak, I., and Batzoglou, S.** (2003). Global alignment: finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics* **19 Suppl 1**: i54–62.
- Brudno, M., Steinkamp, R., and Morgenstern, B.** (2004). The CHAOS/DIALIGN WWW server for multiple alignment of genomic sequences. *Nucleic Acids Research* **32**: W41–4.
- Busch, M.A., Bomblies, K., and Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 585–587.
- Carroll, S.B.** (2005). Evolution at two levels: on genes and form. *PLoS Biology* **3**: e245.
- Castillejo, C., and Pelaz, S.** (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology* **18**: 1338–1343.
- Ciannamea, S., Kaufmann, K., Frau, M., Tonaco, I.A.N., Petersen, K., Nielsen, K.K., Angenent, G.C., and Immink, R.G.H.** (2006). Protein interactions of MADS box transcription factors involved in flowering in *Lolium perenne*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3419–3431.
- Clark, S.E., Jacobsen, S.E., Levin, J.Z., and Meyerowitz, E.M.** (1996). The CLAVATA and SHOOT MERISTEMLESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 1567–1575.
- Cline, M.G.** (1991). Apical dominance. *The Botanical Review* **54**: 318–346.
- Cline, M.G.** (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*. **84**: 1064.
- Clough S.J. and Bent A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 745–753.
- Coen, E.S., Romero, J.M., Doyle, S., Elliott, R., Murphy, G., and Carpenter, R.** (1990). *floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* **63**: 1311–1322.

- Conti, L., and Bradley, D.J.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a Mobile Signal Controlling Arabidopsis Architecture. *Plant Cell* **19**: 767–778.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G.** (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* **316**: 1030–1033.
- Cremer, F., Lönnig, W.E., Saedler, H., and Huijser, P.** (2001). The delayed terminal flower phenotype is caused by a conditional mutation in the CENTRORADIALIS gene of snapdragon. *Plant Physiology* **126**: 1031–1041.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E.** (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant Journal* **18**: 215–222.
- Cubas, P., Coen, E. and Zapater, J. M.** (2001). Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Current Biology* **11**: 1050–1052.
- Cubas, P.** (2002). Role of TCP genes in the evolution of key morphological characters in angiosperms. In *Developmental Genetics and Plant Evolution*. (Francis, T.& Quentin C.B. Cronk, Richard M. Bateman and Julie A. Hawkins), pp. 247–266.
- de Folter, S., Immink, R.G.H., Kieffer, M., Parenicova, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M., Davies, B., and Angenent, G.C.** (2005). Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS Box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424–1433.
- Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J., and Dennis, E.** (2011). FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 6680–6685.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., and Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**: W465–9.
- Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L.** (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488.
- Doebley, J., and Lukens, L.** (1998). Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* **10**: 1075–1082.
- Dubchak, I., Brudno, M., Loots, G.G., Pachter, L., Mayor, C., Rubin, E.M., and Frazer, K.A.** (2000). Active conservation of noncoding sequences revealed by three-way species comparisons. *Genome Research* **10**: 1304–1306.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant Journal* **45**: 616–629.
- Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., and Eshed, Y.** (2008). A protracted and dynamic maturation schedule underlies Arabidopsis leaf development. *Plant Cell* **20**: 2293–2306.

- Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., and Eshed, Y.** (2008). A Protracted and Dynamic Maturation Schedule Underlies Arabidopsis Leaf Development. *Plant Cell* **20**: 2293–2306.
- Eicker, A.** (2005). Studien zur Charakterisierung der regulatorischen Elemente des LATERAL SUPPRESSOR Gens in Arabidopsis thaliana. Tesis Doctoral. Univeridad de Köln 1–102.
- Ferrándiz, C., Gu, Q., Martienssen, R.A., and Yanofsky, M.F.** (2000). Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725–734.
- Finnegan, E.J., Sheldon, C.C., Jardinaud, F., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (2004). A cluster of Arabidopsis genes with a coordinate response to an environmental stimulus. *Current Biology* **14**: 911–916.
- Fletcher, J.C., Brand, U., Running, M.P., Simon, R., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**: 1911–1914.
- Fletcher, J.C.** (2002). Shoot and floral meristem maintenance in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 45–66.
- Font Quer, P.** (1953). Diccionario de Botánica. (Barcelona, Editorial Labor).
- Foucher, F.** (2003). DETERMINATE and LATE FLOWERING Are Two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS Homologs That Control Two Distinct Phases of Flowering Initiation and Development in Pea. *Plant Cell* **15**: 2742–2754.
- Frazer, K.A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E.M., and Dubchak, I.** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Research* **32**: W273–9.
- Furutani, M., Vernoux, T., Traas, J., Kato, T., Tasaka, M., and Aida, M.** (2004). PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in Arabidopsis embryogenesis. *Development* **131**: 5021–5030.
- Gallois, J.-L., Woodward, C., Reddy, G.V., and Sablowski, R.** (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. *Development* **129**: 3207–3217.
- Giraud, E., Ng, S., Carrie, C., Duncan, O., Low, J., Lee, C., Van Aken, O., Millar, A., Murcha, M., and Whelan, J.** (2010). TCP Transcription Factors Link the Regulation of Genes Encoding Mitochondrial Proteins with the Circadian Clock in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 3921–3934.
- Gocal, G.F.W., Sheldon, C.C., Gubler, F., Moritz, T., Bagnall, D.J., Macmillan, C.P., Li, S.F., Parish, R.W., Dennis, E.S., Weigel, D., and King, R.W.** (2001). GAMYB-like Genes, Flowering, and Gibberellin Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **127**: 1682–1693.
- Granovsky, A.E.y.R., M. R.** (2008). Raf kinase inhibitory protein: a signal transduction modulator and metastasis suppressor. *Cell Reserach* **18**: 452–457.
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K.** (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes & Development* **17**: 1175–1187.

- Guan, C.M., Zhu, S.S., Li, X.G., and Zhang, X.S.** (2006). Hormone-regulated inflorescence induction and TFL1 expression in Arabidopsis callus in vitro. *Plant Cell Rep* **25**: 1133–1137.
- Gultinan, M.J., Marcotte, W.R., and Quatrano, R.S.** (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**: 267–271.
- Gustafson-Brown, C., Savidge, B. y Yanofsky, M. F.** (1994). Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Cell* **76**: 131–143.
- Hagan, S., Garcia, R., Dhillon, A. y Kolch, W.** (2006). Raf kinase inhibitor protein regulation of raf and MAPK signaling. *Methods Enzymology*. **407**: 248–259.
- Hanada, K., Zhang, X., Borevitz, J.O., Li, W.H., and Shiu, S.H.** (2007). A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the Arabidopsis thaliana genome are transcribed and/or under purifying selection. *Genome Res* **17**: 632–640.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557–580.
- Hanzawa, Y., Money, T., and Bradley, D.** (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 7748–7753.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805–816.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M.** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the Arabidopsis inflorescence meristem. *Current Biology* **15**: 1899–1911.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., James Peacock, W., and Dennis, E.S.** (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant Journal* **46**: 183–192.
- Hepworth, S.R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., and Coupland, G.** (2002). Antagonistic regulation of flowering-time gene SOC1 by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *EMBO Journal* **21**: 4327–4337.
- Hepworth, S.R., Klenz, J.E., and Haughn, G.W.** (2006). UFO in the Arabidopsis inflorescence apex is required for floral-meristem identity and bract suppression. *Planta* **223**: 769–778.
- Hervé, C., Dabos, P., Bardet, C., Jauneau, A., Auriac, M.C., Ramboer, A., Lacout, F., and Tremousaygue, D.** (2009). In vivo interference with AtTCP20 function induces severe plant growth alterations and deregulates the expression of many genes important for development. *PLANT PHYSIOLOGY* **149**: 1462–1477.
- Hibara, K., Takada, S., and Tasaka, M.** (2003). CUC1 gene activates the expression of SAM-related genes to induce adventitious shoot formation. *Plant J* **36**: 687–696.



**Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., and Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* **27**: 297.

**Hillman, J.R.** (1975). Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L. Timing of bud growth following decapitation. *Planta* **2**: 137-143.

**Hisamatsu, T., and King, R.W.** (2008). The nature of floral signals in *Arabidopsis*. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3821–3829.

**Hoch, M., Schröder, C., Seifert, E., and Jäckle, H.** (1990). cis-acting control elements for Krüppel expression in the *Drosophila* embryo. *EMBO Journal* **9**: 2587–2595.

**Hong, R.L., Hamaguchi, L., Busch, M.A., and Weigel, D.** (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene AGAMOUS identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell* **15**: 1296–1309.

**Huala, E., and Sussex, I.** (1992). LEAFY Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate *Arabidopsis* Floral Development. *Plant Cell* **4**: 901–913.

**Imaizumi, T., Schultz, T.F., Harmon, F.G., Ho, L.A., and Kay, S.** (2005). FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 293–297.

**Imamura, A., Yoshino, Y. and Mizuno, T.** (2001). Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **65**: 2113-2117.

**Immink, R.G.H., Tonaco, I., de Folter, S., Shchennikova, A., van Dijk, A., Busscher-Lange, J., Borst, J., and Angenent, G.C.** (2009). SEPALLATA3: the ‘glue’ for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biology* **10**: R24.

**Irish, V.F., and Sussex, I.M.** (1990). Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* **2**: 741–753.

**Irish, V.F.** (2010). The flowering of *Arabidopsis* flower development. *Plant Journal* **61**: 1014–1028.

**Ito, Y., Nakanomyo, I., Motose, H., Iwamoto, K., Sawa, S., Dohmae, N., and Fukuda, H.** (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**: 842–845.

**Izawa, T., Foster, R., and Chua, N.H.** (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *Journal of Molecular Biology* **230**: 1131–1144.

**Jaeger, K.E., Graf, A., and Wigge, P.A.** (2006). The control of flowering in time and space. *Journal of Experimental Botany* **57**: 3415–3418.

**Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F.** (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **7**: 106–111.

**James, P., Halladay, J., and Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425–1436.

- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R.A., and Dean, C.** (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science* **290**: 344–347.
- John Hewitt, E.** (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Farnham Royal, Bucks. Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Jover-Gil, S.** (2005). Caracterización de genes implicados en la organogénesis foliar en Arabidopsis thaliana. Tesis Doctoral. Universidad Miguel Hernández.
- Jung, J.-H., Seo, Y.-H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.-H., and Park, C.-M.** (2007). The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2736–2748.
- Kardailsky, I., Shukla, V. K., Ahn, J. H., Dagenais, N., Christensen, S. K., Nguyen, J. T., Chory, J., Harrison, M. J. y Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**: 1962–1965.
- Karim, M.R., Hirota, A., Kwiatkowska, D., Tasaka, M., and Aida, M.** (2009). A role for Arabidopsis PUCHI in floral meristem identity and bract suppression. *Plant Cell* **21**: 1360–1372.
- Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J.M., Ferrier, T., Wuest, S.E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E.M., Angenent, G.C., and Riechmann, J.L.** (2010b). Orchestration of Floral Initiation by APETALA1. *Science* **328**: 85–89.
- Kavita, P., and Burma, P.K.** (2008). A comparative analysis of green fluorescent protein and beta-glucuronidase protein-encoding genes as a reporter system for studying the temporal expression profiles of promoters. *Journal of Bioscience* **33**: 337–343.
- Kelly, A.J., Bonnlander, M.B., and Meeks-Wagner, D.R.** (1995). NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* **7**: 225–234.
- Kempin, S.A., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1995). Molecular basis of the cauliflower phenotype in Arabidopsis. *Science* **267**: 522–525.
- Kidner, C.A., and Martienssen, R.A.** (2005). The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity. *Developmental Biology* **280**: 504–517.
- King, M.C., and Wilson, A.C.** (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* **188**: 107–116.
- 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**: 1960-1962.
- Koch, M.A., Haubold, B., and Mitchell-Olds, T.** (2000). Comparative evolutionary analysis of chalcone synthase and alcohol dehydrogenase loci in Arabidopsis, Arabis, and related genera (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* **17**: 1483–1498.

- Koncz, C. and Schell, J.** (1986). The promoter of T L-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**: 383-396.
- Kondo, T., Sawa, S., Kinoshita, A., Mizuno, S., Kakimoto, T., Fukuda, H., and Sakagami, Y.** (2006). A plant peptide encoded by CLV3 identified by in situ MALDI-TOF MS analysis. *Science* **313**: 845–848.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., and van der Veen, J.H.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* **229**: 57–66.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**: 1607–1619.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant Journal* **30**: 337–348.
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M.-A., and Goto, K.** (2003). *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER 2 gene encodes a heterochromatin protein 1 homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate flowering time and several floral homeotic genes. *Plant Cell Physiology* **44**: 555–564.
- Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., and Ohme-Takagi, M.** (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 473–484.
- Koyama, T., Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M.** (2010). TCP Transcription Factors Regulate the Activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 3574–3588.
- Kumar, S.V., and Wigge, P.A.** (2010). H2A.Z-Containing Nucleosomes Mediate the Thermosensory Response in *Arabidopsis*. *Cell* **140**: 136–147.
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., and Kyoizuka, J.** (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**: 652–655.
- Laux, T., Mayer, K.F., Berger, J., and Jurgens, G.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87–96.
- Lee, J.-Y., Baum, S.F., Alvarez, J.P., Patel, A., Chitwood, D.H., and Bowman, J.L.** (2005). Activation of CRABS CLAW in the Nectaries and Carpels of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 25–36.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., and Lee, I.** (2008). SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates leafy. *Plant Journal* **55**: 832–843.
- Lee, J.H., Yoo, S.J., Park, S.H., Hwang, I., Lee, J.S., and Ahn, J.H.** (2007). Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **21**: 397–402.

- Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**: 3195–3206.
- Lenhard, M. y Laux, T.** (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* **130**, 3163–3173.
- Levin, J.Z., and Meyerowitz, E.M.** (1995). UFO: an Arabidopsis gene involved in both floral meristem and floral organ development. *Plant Cell* **7**: 529–548.
- Li, C., Potuschak, T., Colón-Carmona, A., Gutiérrez, R.A., and Doerner, P.** (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 12978–12983.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Meyerowitz, E.M., and Yu, H.** (2008). A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental Cell* **15**: 110–120.
- Li, J.J., and Herskowitz, I.** (1993). Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262**: 1870–1874.
- Liljgren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G., and Yanofsky, M.F.** (1999). Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* **11**: 1007–1018.
- Lincoln, C., Britton, J.H., and Estelle, M.** (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* **2**: 1071–1080.
- Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H., and Ecker, J.R.** (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. *Cell* **133**: 523–536.
- Liu, C., Chen, H., Er, H.L., Soo, H.M., Kumar, P.P., Han, J.-H., Liou, Y.C., and Yu, H.** (2008). Direct interaction of AGL24 and SOC1 integrates flowering signals in Arabidopsis. *Development* **135**: 1481–1491.
- Liu, N., Sliwinski, M., Correa, R., and Baum, D.** (2010). Possible contributions of TERMINAL FLOWER 1 to the evolution of rosette flowering in *Leavenworthia* (Brassicaceae). *New Phytologist* **1–13**.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Methods **25**: 402–408.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C.** (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**: 2053–2056.
- Lohmann, J.U., Hong, R.L., Hobe, M., Busch, M.A., Parcy, F., Simon, R., and Weigel, D.** (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. *Cell* **105**: 793–803.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., and Barton, M.K.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**: 66–69.

- Loots, G.G., Ovcharenko, I., Pachter, L., Dubchak, I., and Rubin, E.M.** (2002). rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res* **12**: 832–839.
- López-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A., Beemster, G.T., Bögre, L., and Shanahan, H.** (2008). Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 947–968.
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., and Coen, E.** (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* **383**: 794–799.
- Maizel, A., Busch, M.A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M., and Weigel, D.** (2005). The floral regulator *LEAFY* evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* **308**: 260–263.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F.** (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA 1*. *Nature* **360**: 273–277.
- Mandel, M.A., and Yanofsky, M.F.** (1995). A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* **377**: 522–524.
- Martín-Trillo** (2004). Caracterización fisiológica y molecular de *ESD1* (*EARLEY BOLTING IN SHORT DAYS 1*), un locus regulador del tiempo de florecimiento en *Arabidopsis*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Martín-Trillo, M., and Cubas, P.** (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* **15**: 31–39.
- Martin, C., and Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* **13**: 67–73.
- Masuda, H.P., Cabral, L.M., De Veylder, L., Tanurdzic, M., de Almeida Engler, J., Geelen, D., Inzé, D., Martienssen, R.A., Ferreira, P.C., and Hemerly, A.S.** (2008). *ABAP1* is a novel plant Armadillo BTB protein involved in DNA replication and transcription. *EMBO Journal* **27**: 2746–2756.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., and Schmid, M.** (2007). Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Current Biology* **17**: 1055–1060.
- Mathieu, J., Yant, L.J., Mürdter, F., Küttner, F., and Schmid, M.** (2009). Repression of flowering by the miR172 target *SMZ*. *Plos Biology* **7**: e1000148.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux, T.** (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* **95**: 805–815.
- Mallory, A.C., and Bouché, N.** (2008). MicroRNA-directed regulation: to cleave or not to cleave. *Trends Plant Sci* **13**: 359–367.
- Martín, B., Ramiro, M., Martínez-Zapater, J., and Alonso-Blanco, C.** (2009). A high-density collection of EMS-induced mutations for *TILLING* in Landsberg erecta genetic background of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* **9**: 147.

- Meyerowitz, E.M., and Somerville, C.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Michaels, S.D., and Amasino, R.A.** (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949–956.
- Michaels, S.D., He, Y., Scortecci, K.C., and Amasino, R.M.** (2003). Attenuation of FLOWERING LOCUS C activity as a mechanism for the evolution of summer-annual flowering behavior in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 10102–10107.
- Michaels, S.D., Himmelblau, E., Kim, S.Y., Schomburg, F.M., and Amasino, R.A.** (2005). Integration of flowering signals in winter-annual *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 149–156.
- Mimida, N., and Motoyoshi, F.** (1999). TERMINAL FLOWER 1-like genes in Brassica species. *Plant Science* **142**: 155–162.
- Mimida, N., Goto, K., Kobayashi, Y., Araki, T., Ahn, J.H., Weigel, D., Murata, M., Motoyoshi, F., and Sakamoto, W.** (2001). Functional divergence of the TFL1-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells* **6**: 327–336.
- Mitsuda, N., Hisabori, T., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2004). VOZ; isolation and characterization of novel vascular plant transcription factors with a one-zinc finger from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **45**: 845–854.
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C.B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., and Lee, I.** (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **35**: 613–623.
- Morel, J.-B., Godon, C., Mourrain, P., Béclin, C., Boutet, S., Feuerbach, F., Proux, F., and Vaucheret, H.** (2002). Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell* **14**: 629–639.
- Moyroud, E., Minguet, E.G., Ott, F., Yant, L., Pose, D., Monniaux, M., Blanchet, S., Bastien, O., Thevenon, E., Weigel, D., Schmid, M., and Parcy, F.** (2011). Prediction of Regulatory Interactions from Genome Sequences Using a Biophysical Model for the *Arabidopsis* LEAFY Transcription Factor. *Plant Cell* **23**: 1293–1306.
- Napoli, C.A., Beveridge, C.A., and Snowden, K.C.** (1999). Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Current Topics in Developmental Biology* **44**: 127–169.
- Nath, U., Crawford, B.C., Carpenter, R., and Coen, E.S.** (2003). Genetic control of surface curvature. *Science* **299**: 1404–1407.
- Navaud, O., Dabos, P., Carnus, E., Tremousaygue, D., and Hervé, C.** (2007). TCP transcription factors predate the emergence of land plants. *Journal of Molecular Evolution* **65**: 23–33.
- Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., and Pepper, A.E.** (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant Journal* **14**: 387–392.

- Nilsson, O., Wu, E., Wolfe, D.S., and Weigel, D.** (1998). Genetic ablation of flowers in transgenic Arabidopsis. *Plant Journal* **15**: 799–804.
- Norberg, M., Holmlund, M., and Nilsson, O.** (2005). The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development* **132**: 2203–2213.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810–812.
- Ogawa, M., Hanada, A., and Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., and Yamaguchi, S.** (2003). Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591–1604.
- Padawer, J.** (1968). The Nomarski interference-contrast microscope. An experimental basis for image interpretation. *Journal of Royal Microscopical Society (Great Britain)*.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D., and Sundaresan, V.** (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development* **132**: 603–614.
- Palatnik, J., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J., and Weigel, D.** (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**: 257–263.
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M.A., Lee, I., and Weigel, D.** (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**: 561–566.
- Parcy, F., Bomblies, K., and Weigel, D.** (2002). Interaction of LEAFY, AGAMOUS and TERMINAL FLOWER1 in maintaining floral meristem identity in Arabidopsis. *Development* **129**: 2519–2527.
- Picot, E., Krusche, P., Tiskin, A., Carré, I., and Ott, S.** (2010). Evolutionary Analysis of Regulatory Sequences (EARS) in Plants. *Plant Journal* **64**: 165–176.
- Piñeiro, M., Gómez-Mena, C., Schaffer, R., Martínez-Zapater, J.M., and Coupland, G.** (2003). EARLY BOLTING IN SHORT DAYS is related to chromatin remodeling factors and regulates flowering in Arabidopsis by repressing FT. *Plant Cell* **15**: 1552–1562.
- Plasterk, R.H.** (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science* **296**: 1263–1265.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J.P., Ganai, M., Zamir, D., and Lifschitz, E.** (1998). The SELF-PRUNING gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of CEN and TFL1. *Development* **125**: 1979–1989.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., and Lifschitz, E.** (2001). Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**: 2687–2702.
- Priest, H.D., Filichkin, S.A., and Mockler, T.C.** (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 643–649.

- Pruneda-Paz, J.L., Breton, G., Para, A., and Kay, S.A.** (2009). A Functional Genomics Approach Reveals CHE as a Component of the Arabidopsis Circadian Clock. *Science* **323**: 1481–1485.
- Prusinkiewicz, P., Erasmus, Y., Lane, B., Harder, L.D., and Coen, E.** (2007). Evolution and development of inflorescence architectures. *Science* **316**: 1452–1456.
- Ratcliffe, O.J., Amaya, I., Vincent, C.A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E., and Bradley, D.J.** (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* **125**: 1609–1615.
- Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J., and Coen, E.** (1999). Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development* **126**: 1109–1120.
- Riechmann, J.L., Krizek, B.A., and Meyerowitz, E.M.** (1996). Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Proceedings of the National Academy of Science* **93**: 4793–4798.
- Rojo, E., Sharma, V.K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., and Fletcher, J.C.** (2002). CLV3 is localized to the extracellular space, where it activates the Arabidopsis CLAVATA stem cell signaling pathway. *Plant Cell* **14**: 969–977.
- Rusinov, V., Baev, V., Minkov, I.N., and Tabler, M.** (2005). MicroInspector: a web tool for detection of miRNA binding sites in an RNA sequence. *Nucleic Acids Research* **33**: W696–W700.
- Ruuska, S.A., Girke, T., Benning, C., and Ohlrogge, J.B.** (2002). Contrapuntal networks of gene expression during Arabidopsis seed filling. *Plant Cell* **14**: 1191–1206.
- Sablowski, R.** (2004). Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends Cell Biol* **14**: 605–611.
- Sablowski, R.** (2007). Flowering and determinacy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **58**: 899–907.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**: 1101–1108.
- Schommer, C., Palatnik, J.F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E.E., Nath, U., and Weigel, D.** (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *Plos Biology* **6**: e230.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer, K.F., Jurgens, G., and Laux, T.** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell* **100**: 635–644.
- Schultz, E., and Haughn, G.W.** (1991). LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**: 771–781.



- Schultz, E.A.a.H.G.W.** (1993). Genetic analysis of the floral initiation process (FLIP) in *Arabidopsis*. *Development* **119**: 745–765.
- Schwab, R.** (2006). Functions and target selection of *Arabidopsis* microRNAs. Tesis Doctoral. Fakultät für Biologie der Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., and Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **20**: 898–912.
- Serrano-Mislata, A.** (2010). Análisis de la regulación transcripcional del gen TERMINAL FLOWER 1 de *Arabidopsis*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.
- Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M.F.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant Journal* **20**: 259–263.
- Sessions, R.A., Yanofsky, M.F., and Weigel, D.** (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* **289**: 779–782.
- Shannon, S., and Meeks-Wagner, D.** (1991). A Mutation in the *Arabidopsis* TFL1 Gene Affects Inflorescence Meristem Development. *Plant Cell* **3**: 877–892.
- Sieber, P., Wellmer, F., Gheyselinck, J., Riechmann, J., and Meyerowitz, E.M.** (2007). Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* **134**: 1051–1060.
- Simon, R., Igeño, M. I. and Coupland, G.** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* **384**: 59-62.
- Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G., and Waterhouse, P.M.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319–320.
- Sohn, E.J., Rojas-Pierce, M., Pan, S., Carter, C., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Rojo, E., Surpin, M., and 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 Science* **104**: 18801–18806.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* **12**: 3703–3714.
- Stafstrom, J.P., Ripley, B.D., Devitt, M.L., and Drake, B.** (1998). Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta* **205**: 547–552.
- Stahl, Y., and Simon, R.** (2010). Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 53–58.
- Stoma, S., Lucas, M., Chopard, J., Schaedel, M., Traas, J., and Godin, C.** (2008). Flux-based transport enhancement as a plausible unifying mechanism for auxin transport in meristem development. *PLoS Computational Biology* **4**: e1000207.

- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 1116–1120.
- Sung, S., and Amasino, R.M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159–164.
- Tajima, Y., Imamura, A., Kiba, T., Amano, Y., Yamashino, T., and Mizuno, T.** (2004). Comparative studies on the type-B response regulators revealing their distinctive properties in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **45**: 28–39.
- Takada, S., and Goto, K.** (2003). Terminal flower2, an *Arabidopsis* homolog of heterochromatin protein1, counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *Plant Cell* **15**: 2856–2865.
- Takeda, T., Amano, K., Ohto, M., Nakamura, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C.** (2006). RNA Interference of the *Arabidopsis* Putative Transcription Factor TCP16 Gene Results in Abortion of Early Pollen Development. *Plant Molecular Biology* **61**: 165–177.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D.** (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* **17**: 49–63.
- Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2005). Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **138**: 757–766.
- Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2008). Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **53**: 42–52.
- Thimann, K.V.** (1964). Release of lateral buds from apical dominance. *Nature* **201**: 939-940.
- Thouet, J., Quinet, M., Ormenese, S., Kinet, J.M., and Périlleux, C.** (2008). Revisiting the involvement of SELF-PRUNING in the sympodial growth of tomato. *Plant Physiology* **148**: 61–64.
- Trémouyague, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Hervé, C., and Lescure, B.** (2003). Internal telomeric repeats and ‘TCP domain’ protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant Journal* **33**: 957–966.
- Tucker, M.R., Hinze, A., Tucker, E.J., Takada, S., Jurgens, G., and Laux, T.** (2008). Vascular signalling mediated by ZWILLE potentiates WUSCHEL function during shoot meristem stem cell development in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **135**: 2839–2843.
- Tucker, S.C. and G., James** (1999). The inflorescence: introduction. *The Botanical Review* **65**: 303-312
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant Journal* **19**: 309–319.
- Ureta-Vidal, A., Ettwiller, L., and Birney, E.** (2003). Comparative genomics: genome-wide analysis in metazoan eukaryotes. *Nature Reviews Genetics* **4**: 251–262.

- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., and Coupland, G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003–1006.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., and Bartel, D.P.** (2004). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes & Development* **18**: 1187–1197.
- Vaucheret, H.** (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science* **13**: 350–358.
- Voinnet, O.** (2009). Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell* **136**: 669–687.
- Wagner, D., Sablowski, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1999). Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**: 582–584.
- Wang, M.M., and Reed, R.R.** (1993). Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* **364**: 121–126.
- Wang, J.-W., Czech, B., and Weigel, D.** (2009). miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**: 738–749.
- Wasserman, W.W., and Sandelin, A.** (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet* **5**: 276–287.
- Weberling, F.** (1992). *Morphology of flowers and inflorescences*. Cambridge University Press.
- Weigel, D., Alvarez, J.P., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F., and Meyerowitz, E.M.** (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**: 843–859.
- Weigel, D., and Nilsson, O.** (1995). A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**: 495–500.
- Weigel, D., and Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Weigel, D. y Jürgens, G.** (2002). Stem cells that make stems. *Nature* **415**, 751-754.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., and Davies, B.** (2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in *Antirrhinum*. *Development* **131**: 915–922.
- Welchen, E., and Gonzalez, D.H.** (2006). Overrepresentation of elements recognized by TCP-domain transcription factors in the upstream regions of nuclear genes encoding components of the mitochondrial oxidative phosphorylation Machinery. *Plant Physiology* **141**: 540–545.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G., and Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**: 581–590.

- Wesley, S.V., Liu, Q., Wielopolska, A., Ellacott, G., Smith, N., Singh, S., and Helliwell, C. (2003). Custom knock-outs with hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods in Molecular Biology* **236**: 273–286.
- West, A.G., Causier, B.E., Davies, B., and Sharrocks, A.D. (1998). DNA binding and dimerisation determinants of *Antirrhinum majus* MADS-box transcription factors. *Nucleic Acids Research* **26**: 5277–5287.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., and Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056–1059.
- William, D.A., Su, Y., Smith, M.R., Lu, M., Baldwin, D.A., and Wagner, D. (2004). Genomic identification of direct target genes of LEAFY. *Proceedings of the National Academy of Science* **101**: 1775–1780.
- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 1209–1220.
- Winter, C.M., Austin, R.S., Blanvillain-Baufumé, S., Reback, M.A., Monniaux, M., Wu, M.F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J.E., Parcy, F., Jensen, S.T., Li, H., and Wagner, D. (2011). LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis Motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell* **20**: 430–443.
- Wolpert, L., and Tickle, C. (2010). *Principles of Development*. Oxford University Press. USA.
- Wray, G.A., Hahn, M.W., Abouheif, E., Balhoff, J.P., Pizer, M., Rockman, M.V., and Romano, L.A. (2003). The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **20**: 1377–1419.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.-W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell* **138**: 750–759.
- Xi, W., Liu, C., Hou, X., and Yu, H. (2010). MOTHER OF FT AND TFL1 Regulates Seed Germination through a Negative Feedback Loop Modulating ABA Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 1733–1748.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V. (2009). Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Science* **106**: 4941–4946.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., and Araki, T. (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) acts as a floral pathway integrator redundantly with FT. *Plant Cell Physiology* **46**: 1175–1189.
- Yamaguchi, A., Wu, M.-F., Yang, L., Wu, G., Poethig, R.S., and Wagner, D. (2009). The MicroRNA-Regulated SBP-Box Transcription Factor SPL3 Is a Direct Upstream Activator of LEAFY, FRUITFULL, and APETALA1. *Developmental Cell* **17**: 268–278.
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **7**: 555–560.
- Yang, L., Huang, W., Wang, H., Cai, R., Xu, Y., and Huang, H. (2006). Characterizations of a hypomorphic *argonaute1* mutant reveal novel AGO1 functions in *Arabidopsis* lateral organ development. *Plant Mol Biol* **61**: 63–78.

- Yanovsky, M.J., and Kay, S.** (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature* **419**: 308–312.
- Yant, L., Mathieu, J., and Schmid, M.** (2009). Just say no: floral repressors help Arabidopsis bide the time. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 580–586.
- Yao, X., Ma, H., and Wang, J. and Zhang, D.** (2007). Genome-wide comparative analysis and expression pattern of TCP gene families in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 885-897.
- Yeung, K., Seitz, T., Li, S., Janosch, P., McFerran, B., Kaiser, C., Fee, F., Katsanakis, K. D., Rose, D. W., Mischak, H., Sedivy, J. M., Kolch, W.** (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* **401**: 173–177.
- Yoo, S.J., Chung, K.S., Jung, S.H., Yoo, S.Y., Lee, J.S., and Ahn, J.H.** (2010). BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) has TFL1-like activity and functions redundantly with TFL1 in inflorescence meristem development in Arabidopsis. *Plant Journal* **63**: 241–253.
- Yoo, S.Y., Kardailsky, I., Lee, J.S., Weigel, D., and Ahn, J.H.** (2004). Acceleration of flowering by overexpression of MFT (MOTHER OF FT AND TFL1). *Molecular Cells* **17**: 95–101.
- Yoon, H.-S., and Baum, D.A.** (2004). Transgenic study of parallelism in plant morphological evolution. *Proceedings of the National Academy of Science* **101**: 6524–6529.



# MATERIALES SUPLEMENTARIOS





## ALINEAMIENTO S1

Alineamiento "shuffle-LAGAN" proporcionado por el programa VISTA de la secuencia de los exones e intrones de los genes ortólogos de *TFL1* en *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. bursa-pastoris*, *B. rapa* y *L. crassa*.

En letras azules aparecen los exones y en rojo los intrones. En amarillo se resaltan los posibles TFBSs predichos, encima y en mayúsculas, el nombre del TFBS, que aparece en **negrita** si está conservado en al menos 5 de las 3 especies comparadas. Los asteriscos indican residuos conservados

**LFY**

```

BrTFL1      ATGGAG---AATATGGGAGTTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGAAGAGTGGTAGGA 57
LcTFL1      ATGGAG---AATATGAGAAGTAGAGTGGCAGATCCATTGATAGTAGGTAGAGTGATAGGA 57
AtTFL1      ATGGAG---AATATGGGAAGTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGGAGAGTGGTAGGA 57
AlTFL1      ATGGAG---AATATGGGAAGTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGGAGAGTGGTAGGA 57
CbTFL1      ATGGAGATCAATATGGGAGCTAGAGTGATAGAGCCATTGATCGTGGGGAGAGTGGTAGGA 60
*****      ***** ** ***** * ** ***** * ** ***** *****

BrTFL1      GATGTTCTTGATTTCTTCACTCCAACAATTAATGAATGTGAGCTACAACAAGAATCAA 117
LcTFL1      GATGTTCTTGATTTCTTCACTCCAACGATTAAGATGCATGTTACTTATAACAAGAAACAA 117
AtTFL1      GATGTTCTTGATTTCTTCACTCCAACAAGTGAATGTTAGTTATAACAAGAAGCAA 117
AlTFL1      GATGTTCTTGATTTCTTCACTCCAACAATTAAGATGAACGTGAGTTATAACAAGAAGCAA 117
CbTFL1      GATGTTCTTGATTTCTTCACTCCAACAAGTGAATGTGAGTTATAACAAGAAGCAA 120
*****      ***** * ** * ** * ** * ** ***** **

                LFY

BrTFL1      GTCTCCAACGGCCATGAGCTTTTGCCCTCCTCTGCTCCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATC 177
LcTFL1      GTCTCCAATGGGCCATGAGCTCTTTCCTTCCTCAGTTTTCCTCCAACCTAGAGTTGAATC 177
AtTFL1      GTCTCCAATGGGCCATGAGCTCTTTCCTTCCTCTGTTTTCCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATC 177
AlTFL1      GTCTCCAATGGGCCATGAGCTCTTTCCTTCCTCTGTTTTCCTCTAAGCCTAGGGTTGAGATC 177
CbTFL1      GTCTCAAATGGGCCATGAGCTCTTTCCTTCCTTTGCTCCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATT 180
***** ** ***** * ** * ** * ** * ** ***** **

BrTFL1      CATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACCTTGGTATATATGCATATATTAAG----- 230
LcTFL1      CATGNGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACCTTGGTA---ATGTTTTGTTG----- 226
AtTFL1      CATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACCTTGGTAAATACATATATTTAAATTATTTTA 237
AlTFL1      CATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACCTTGGTATATACATATATTTAAACTATTTCA 237
CbTFL1      CATGGTGGTGATCTCAGATCCTTCTTCACCTTGGTATA----- 218
***** ***** *****

BrTFL1      -----ATTATCTGAAATTAGCACTAATGTTGGAACG 262
LcTFL1      -----TTTGTAGAAGTTTCCAATAT----- 247
AtTFL1      TAATAAT-----GTTGGTTTTATTATATTGTGCCAAAAAAA-----C 276
AlTFL1      TAATCATCAATAATGTTGAGGTTGCTGGATTGTATATATTGTGCCAAAAAAA----- 290
CbTFL1      -----ATATATACAGATTGTGCCAAAACATAT-----A 246
* * * * *
    
```

BrTFL1 CTGGTTGTTATGGTCAAAACATATAAAAGTCTCTTTTTTATCTTATATTTTTTACATGT 322  
 LcTFL1 CTGACTAATTGGAGAAAAGATAGAGAG---ACAAATCATAAATTATATACCTATCTTT 304  
 AtTFL1 CATATAAAACGTCTCACTTCCTTTTCTCTTACAAGTTTTCCA-TTTCTA-ACTCAATA 334  
 AlTFL1 CATATAAAACGTCTCACTTTCTTTTCTCTTATAAGTTTTCTACTTTCTG-ACTCAATTA 349  
 CbTFL1 TATATCAAACTTTTCATTTCTTTTTCTCTTACATGTTTTTCATTCTCTGAACCTCTTGG 306

\* \* \* \* \*

BrTFL1 TTTGTAAATAAC--ATGATGCTGTTATTTAAATTTTATCATTATTATTTAATATTT--- 377  
 LcTFL1 TGT-TAAAGAAT--ATGATGCT-----ATATATTATTCAGTTTTTATAAATTTCTT--- 351  
 AtTFL1 TCTTATAAAT-----TGTAGCTTTAGTTTTTATCATTCCCTTTTCCAGTCTTTTTTTT 389  
 AlTFL1 TCTTATAAATTAATTTGACCTTTAGTTTTTATCATTCCCTTTTCCAGTCATTTTTT--- 406  
 CbTFL1 TGGAAAAGAG-----ATCAATA-ATATTATAATTTCTACCTTTAGTTTTTATTT--- 355

\* \*\* \* \*\* \* \* \* \*\*

**WUS**

BrTFL1 ACTGATGGTAAACACAACCTTAATCGAAAACAGGTGATGATAGACCCTGATGTCCAGGTC 437  
 LcTFL1 ANTGATGGTT-----AAACAGGTGATGGTAGACCCTGATGTCCAGGTC 395  
 AtTFL1 AATGGTAAAACCTCAACCGAAATG-CAAAACAGGTGATGATAGACCAGATGTCCAGGTC 448  
 AlTFL1 -ATGGTAAAACCTCAACCGAAATG-CAAAACAGGTGATGATGATCCAGATGTCCAGGTC 464  
 CbTFL1 -----TTTACTTTGCCATTTTGTGAAAACAGGTGATGATAGACCAGATGTCCAGGTC 409

\*\*\*\*\* \* \*\* \* \*\*\*\*\*

BrTFL1 CTAGTGACCCTTTCTAAAAGAGCACCTGCATTGGTACGATCATTTCG-----TTTG 490  
 LcTFL1 CTAGTGACCCTTTCTAAAAGAACACTTGCATTGGTACCTTCAGTTTC----- 443  
 AtTFL1 CTAGTGACCCTTTCTAAAAGAACCTGCCTGACTGGTACGTTAATTT--ATTTATCTT 505  
 AlTFL1 CTAGTGACCCTTTCTAAAAGAACCTGCCTGACTGGTACGTTCAATTT--ATTTATCTT 521  
 CbTFL1 CTAGTGACCCTTTCTAAAAGAACCTGCCTGACTGGTMCCTCAATTTTGTATTGTTTT 469

\*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \* \*\*

BrTFL1 TCGTTTCAT---TTGGGCCAATATCAATATGTATTTTCATGAGAATTT-----TAA 540  
 LcTFL1 ---TTTAT---TTG-----TCTTCTTCA-----TAA 465  
 AtTFL1 TCTTTTCAT---TTGGGCCATATCCATATACATTGCATTTAAATCATTTTCGTTATAA 562  
 AlTFL1 TATTTTCAT---TTGGGCCATATCCATATGCATTGCATTTCAATAATTTTCGTGATAA 578  
 CbTFL1 TCTTTAATTATTTTGGCCCATATGTATTGGTATTGCATACCAATATTTCTTTACAA 529

\*\* \*\* \*\*\* \*\* \* \* \*\*

**CARg**

BrTFL1 CCCTAATGATGTTTTGTTTTTTTTGCTCTCGACTGATTTTATATGAACCTTGAGTTATT 600  
 LcTFL1 CCCTAATCAAGATTTTGTG----- 484  
 AtTFL1 CCCTAATAAAGTTTTTTTG-----GGTGAAGTTATATACATTTGA 604  
 AlTFL1 CCCTAATAAAGTTGTTTG-----TTTAGGTTTATACATTAAC 616  
 CbTFL1 CCCTGATTAATAAAGTTTG-----TTTCTTGGGTATACATTGAT 570

\*\*\*\* \* \* \* \* \*

Materialles Suplementarios

BrTFL1 TTGGTCAAATCTCTT-----CCATCACAACACGGGGATTTCCCTAAACTTTTTAGTAGA 655  
 LcTFL1 -----TAATAGCACTGG----- 496  
 AtTFL1 GTTGGTCAAAGATCTCCATCGCCATGAGTTCTCAGAACTTTTTCTGT----- 651  
 AlTFL1 TTG-----TTGATTTTCTATATTTTTCATAT----- 643  
 CbTFL1 TTGCATTTAAACTTG-----ACGATTTTCTAACTTTTCTTATG----- 608

\*

BrTFL1 AAGATAAAGAAATTAATTCTTTGTAATGTTGTTTTTCTTGTAATGTTTAAACAGGATA 715  
 LcTFL1 -----TTTTGTTG--AATGTTTCAACAGGATC 521  
 AtTFL1 -----AAAGTAATA----ATATTAGTAT-----TGTG--AATGTTTCAATAGGATC 692  
 AlTFL1 -----GAAATAATAGCATCAATTACTTT-----TGTG--AATGTTCTAATAGGATC 688  
 CbTFL1 -----AAAATAATAGCATTAAATTAATTTGTGTTGTTGTTG--AACGTTTCATCAGGCTC 660

\* \*\*\* \*\* \*\*\* \* \*\*\* \*

BrTFL1 GTAACAAACATCCCCGGTACAACCGATGCTACATTTGTACGGACTCGTCATG---AATT 772  
 LcTFL1 GTAACAAACATTCCCGGTACAACAGATGTTACATTTGTAAGGCTCATAATG---GATT 578  
 AtTFL1 GTTACAAACATTCCCGGCACAACAGATGCTACGTTTGTAAAGCCTCTTCATG---AATC 749  
 AlTFL1 GTTACAAACATTCCCGGCACAACAGATGCTACGTTTGTAAAGCCTCTTCAGG---AATC 745  
 CbTFL1 GTTACAAACATTCCCGGTACAACAGATGCTACATTTGTAAAGCCTCGTCATGATTAATT 720

\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*\*

BrTFL1 TTGCGA--TACATAACTTTTAGTAAATATTTTCACATATTCATTAAG-ACATTTGAA 829  
 LcTFL1 ATG-----TAATTTAAATACATATAT--ATATATTGAT--AG-ATCTTTGAA 620  
 AtTFL1 TTGTAA---TTTAAATACTTATACAT-ATATCATGTTATATAGAAATAAAAATATTTGCA 805  
 AlTFL1 TTGTAG---TCTAAATACTTGCAATAT-AATATATGTTAAATATAAATAAG---ATTTGCA 798  
 CbTFL1 TTGTAATATTATAAAAACTTACATATTTAAATTAATAAATAATATATATATG-TTTGATATA 779

\*\* \* \*\* \* \* \*\* \* \* \*

BrTFL1 TTGAAATA-----ATAGGAAAAGAGGTGGTGAGCTATGAGTTGCCAAGGCCATAGCAT 881  
 LcTFL1 CTGGAAT-----ATAGGAAAAGAGGTAGTGAGCTATGATTTGCCAAGGCCAAGTAT 671  
 AtTFL1 TTGTAAT-----ATAGGCAAAGAGGTGGTGAGCTATGAATTGCCAAGGCCAAGCAT 856  
 AlTFL1 TTGAAAT-----ATAGGCAAAGAGGTGGTGAGCTATGAATTGCCAAGGCCAAGCAT 849  
 CbTFL1 AAGTAATGCAAATACATTAGGAAAAGAAGTGGTGAGCTATGAGTTGCCAAGGCCAAGCAT 839

\* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*

BrTFL1 AGGGATACACAGGTTTCGTGTTTGTCTGTTCAAGCAGAAGCAAAGACGTGTTATCTTCCC 941  
 LcTFL1 AGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTATTTCAGACAGAAGCAAAGATGCGTTTACTTCC 731  
 AtTFL1 AGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTGTTTCAGCAGAAGCAAAGACGTGTTATCTTTCC 916  
 AlTFL1 AGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTGTTCAAGCAGAAGCAAAGACGCGTTATCTTCCC 909  
 CbTFL1 AGGGATACATAGGTTTGTGTTTGTCTGTTCAAGCAGAAGCAAAGACGCGTTATCTTCCC 899

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*

BrTFL1 AAACATTCCTTCGAGAGATAACTTCAACACTCGAAAATTTGCGATCGAGTATGATCTTGG 1001  
 LcTFL1 CAATATCACTTCGAGAGATCACTTCAACACTCGTAAATTTGCGACCGAGTATGATCTTGG 791  
 AtTFL1 TAATATCCCTTCGAGAGATCACTTCAACACTCGTAAATTTGCGGTCGAGTATGATCTTGG 976  
 AlTFL1 CAATATCCCTTCGAGAGATCACTTCAACACTCGTAAATTTGCGGTGGAGTATGATCTTGG 969  
 CbTFL1 AAACATCCCTTCTCGAGATCACTTCAACACTCGTAAATTTGCTGTGAGTATGATCTCGG 959

\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

BrTFL1 TCTTCCTGTCGCTGCTGTCTTCTTTAACGCCAGAGAGAACTGCAGCTCGAAGACGTTA 1061  
 LcTFL1 TCTTCCTGTTGCCGCTGTCTTTTAAACGCTCAAAGAGAACTGCTGCTCGCAAACGCTA 851  
 AtTFL1 TCTCCCTGTCGCGGCGTCTTCTTTAACGCACAAAGAGAAACCGCTGCACGCAAACGCTA 1036  
 AlTFL1 TCTCCCTGTAGCGGCTGTCTTCTTTAACGCACAAAGAGAAACCGCTGCTCGCAAACGCTA 1029  
 CbTFL1 TCTCCCTGTCGCGGCTGTCTTCTTTAACGCACAAAGAGAAACCGCTGCTCGCAAACGCTA 1019

\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

## ALINEAMIENTO S2

**Alineamiento "shuffle-LAGAN" obtenido mediante el programa VISTA de la secuencia 5' no codificantes de los genes ortólogos de *TFL1* en *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. bursa-pastoris*, *B. rapa* y *L. crassa*.**

Resaltadas en fondo gris aparecen los módulos conservados identificadas por VISTA. En amarillo se resaltan los posibles TFBSs predichos, encima y en mayúsculas el nombre del TFBS, que aparece en **negrita** si está conservado en al menos 5 de las 3 especies comparadas. Subrayada, la 5'UTR de *AtFL1*. Tras ella, en la posición 1958 de *Arabidopsis* empezaría el ATG de *TFL1*. Los asteriscos indican residuos conservados. At5: 5' NCS de *A. thaliana* (Ler); Al5: 5' NCS de *A. lyrata*; Cb5: 5' NCS de *C. bursa-pastoris*; Br5: 5' NCS de *B. rapa*; Lc5: 5' NCS de *L. crassa*.

At5	1	TATTCTCCATCTTGTCTACCTGAATCATGTGTTTTGGG-----TT	41
Al5	1	-----CTGTTCTTGTGTTTTCGG-----TT	21
Cb5	1	TGCTCTGCATTCCAAACT----AATTCTTGAGTCTGAGGGAACTACTTCTTTAGTCTTC	56
Br5	1	-----ATTCTGATTTTT--TTTTTCATGTTTGTG-----T	29
Lc5	1	----TCCCTTCACGGATTA--CAAATTTACATTTGTGG-----CT	35
		*                   * * *	
At5	42	ATGTTTA-----TAACTTGGGTAAGCAGTGTGTGGT-----	72
Al5	22	ATATTTG-----TAAC-----TGTGGC-----	38
Cb5	57	ACTTTTTTCT-----TAACTTGGATAAGCAGTTTGTGGT-----	90
Br5	30	ATATTGAATCAGAATGGATTCTCAGATCAAGCACGCCGTGGTGGTAAAAGTATGGGTCG	89
Lc5	36	ATTTTTANC-----TTATTGGATTAGTGAGATTGTGTT-----	68
		*   **                   *                   ***	
At5	73	-----	72
Al5	39	-----	38
Cb5	91	-----	90
Br5	90	TACTGGATCCAGGGTCCAGGTGACCCAGGTACGAGTGAAGTTTACAGACTCTGATCGTTA	149
Lc5	69	-----	68
At5	73	-----	72
Al5	39	-----	38
Cb5	91	-----	90
Br5	150	CATTATGAGGAACGTTAAGGGACCAGTGAGAGAAGGCGACATCCTCACCTTGCTCGAGTC	209
Lc5	69	-----	68
At5	73	-----	72
Al5	39	-----	38
Cb5	91	-----	90
Br5	210	TGAGAGAGAAGCTAGGAGACTTCGTTGATGCGTCTTGTCTTGTTCCTTCTCCACTAGTA	269
Lc5	69	-----	68
At5	73	-----	72
Al5	39	-----	38
Cb5	91	-----	90
Br5	270	GAAACAAGAAGACAGAACCATGTCTGCTTTTTCTCTTTTTTCTGTTTTCTGTGTCTGG	329
Lc5	69	-----	68
At5	73	-----CT----TGCCATCGAC-----	84
Al5	39	-----TTAAA--TCCATTGGAC-----	53
Cb5	91	-----TTTT----CCATCAACCCAAGTTCTGTTTAGTGGTTACAAAGTACAAACTT	137
Br5	330	ATTAGTGATTATGC----CTTCGAATTGAATTCGTTTTGCTATAAG-----	372
Lc5	69	-----TTATTGTTGCTTTTAAG-----	85
		*                   *   *	
At5	85	--ACAGATCTTGGATTTCGTAGAAGAATGGTTATATGGTTTGGTTTTTCCACTTGAAAAT	142
Al5	54	--ACAGAAC--AGACCC-----	66
Cb5	138	GTACCTATCACTGGTCCGGCG-----	158
Br5	373	--ACATTTTCATGGATTGATTTATGTTCTCGTCTTATCATATTTTTGTTTGAATCATCAG	430
Lc5	86	--AC-----	87
		**	



Materialles Suplementarios

---

At5	623	TAAGCTTC-----	630
A15	562	TAAGCCTCCTAAGAGAGACTTCATTGGAAATGCTCTAAGAGCATGTGTAATGGAGAGTTC	621
Cb5	436	TAATC-----	440
Br5	938	TAAAGCTTCATCA-----	950
Lc5	416	TAACCTTCC-----	424
		***	
At5	631	-----	630
A15	622	TCACATGGATTTTCAATAATTAATAAATAAGAAAATAATAAAAAGTGAGAGAGAAACCAGA	681
Cb5	441	-----	440
Br5	951	-----	950
Lc5	425	-----	424
At5	631	-----ACCT-----	634
A15	682	ATCGATTTCCATCTGAGAATACTTTGAGAGACTACCTTTACACATGTCAGAATATAATTG	741
Cb5	441	-----	440
Br5	951	-----	950
Lc5	425	-----	424
At5	635	-----AAGCTAAATAGCTAGTTGA-----	653
A15	742	ATTTTGTAGTTTCTTTGTTATTTAAATTAATAAATAACTGAATTAATGATATATATT	801
Cb5	441	-----	440
Br5	951	-----AGCTAATTGATAC-----	963
Lc5	425	-----TCAGATAAGTTATTGA-----	440
At5	654	-----	653
A15	802	AAAATAATATATTTGAGAGACTTGCAAAATTTTTATGTGCTGCACATGCTCTAAGAGCAT	861
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	441	-----	440
At5	654	-----	653
A15	862	AAACAGTAGAAGTCTCTTACTAAGACCATCCTCAATGAGGGGATATTAAGTTGGGATTCT	921
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	441	-----	440
At5	654	-----	653
A15	922	TCAGAATTGTTTAAATATTGATTTTGAAAAAGAGATTTTGTGCGCAAAAAAAAAAAGTC	981
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	441	-----CAAAAAAAAAACAT--	454
At5	654	-----	653
A15	982	GAAGAAAGAGAGAGAAACAGCACCTTTTTTTTGTGCGCAAAGATAAATACACTGAGACTT	1041
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	455	-----	454
At5	654	-----TACGTTGTCTA-----	664
A15	1042	TGTTTTCCTATCTTAGCAAAAAGCTTCAACCAATCTAATGTGCCACGTCATCGAGTCTT	1101
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	455	-----TCCTCGAG----	462
At5	665	-----	664
A15	1102	ATGGGCTCTATCAACTCCCATTTTAGAAGCGCTTCTTTATCTGTTAGACTGTTTTTGATT	1161
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	463	-----	462
At5	665	-----	664
A15	1162	ATTTTATGATCCAAAAATAATAAGAGCTCATGATAAGAATTGTTAGGAAGTGCCGTTGAG	1221
Cb5	441	-----	440
Br5	964	-----	963
Lc5	463	-----	462





Materialles Suplementarios

At5 831 ----- 830  
 Al5 1588 ----- 1587  
 Cb5 544 ----- 543  
 Br5 1328 CCGAGATACACCACCGGAGGCCAGGAGCTCGGACAAACCGCAAAGCCTCCATCAAGACCA 1387  
 Lc5 517 ----- 516

At5 831 -----TATATTT----- 837  
 Al5 1588 -----TCTCTTT----- 1594  
 Cb5 544 -----TCTATTT----- 550  
 Br5 1388 CCTCTTCTCTTTTACGCTTTGTTCTCGCTTCGGAGAGCATCATCGATCCGATCGAGAGCT 1447  
 Lc5 517 -----TGTCTTTA----- 524  
 \* \* \*\*

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1448 CCTCCGACAGCACAAAACCATTTACCCACTTGGGATCACGAACCAAAAGACCCCCACACAC 1507  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1508 ACCCAACACACACCCAACGAAATCAAAGACCGAACC AAAAGACTGGAGCAACAAACCGGC 1567  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1568 GACGCAAGGTTGAAGAAACCTTACCCCCCGGAGAACGAGACCGAAGGGGGAGCTGC 1627  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1628 AAAAGCCTCCCCTCCCGGAGACAAGAACCGGCGGCGACGAGCTGAAGGAGCCTCCATCT 1687  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1688 CCCGGAGAAGAAACATCCACTGGCTAAAAACCCCTTAGCTTCTCCCACCGTACCTTCACC 1747  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1748 CGACCGCTCTTGACTCCAAGACAGAACCTCCGACAGAGGAGCCTGAACCAGAGCTCAG 1807  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1808 ACAAGGCGGAAGACGGAGGTGACGAAGGAGAGACGCACGACCAACATCTTTAAAGCTACT 1867  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 837  
 Al5 1595 ----- 1594  
 Cb5 551 ----- 550  
 Br5 1868 CTAGGGGCTCCGGCGACGGCAGCAGCTCACGCGCCGGCCGCTCGCCGACCAACTTCA 1927  
 Lc5 525 ----- 524

At5 838 ----- 841  
 Al5 1595 ----- 1598  
 Cb5 551 ----- 554  
 Br5 1928 AGATCTACTTTCTCTCTCTACTTTCTCTCTCAGTCTAATCCGCTCCTGCTTAAACA 1987  
 Lc5 525 ----- 528  
 \*\*

DOF

TGCT 841  
 TACT 1598  
 CGCT 554  
 CGCT 1987  
 TGCT 528

MÓDULO1

	DOF	ARR-B	DOF	
At5	842	TTGTGCCTTTAT--TCTGATTAATTACCAAAATCTTAATAAAGCATCAATCAAGACTCTCT	899	
A15	1599	TTGTGCCTTTAT--TCTGATTAATTACCAAAATCTTAACAAGTAT-AATCAAGACTTGCT	1655	
Cb5	555	TTGTGCCTTTATTTCTCTGATTAATTACCAAAATTTGAATAAAGCATCAATCAAGAATTGCT	614	MÓDULO1
Br5	1988	TTGTGCCTTTAT--TCTGATCAATTTCCAAATATGATTAATTTCTCAATCAAATTTTCT	2045	
Lc5	529	TTGTGCTTTAT--TCTGATTCATTACCAA--NTTAGTAAAGTATCAATCAAAACTTGCT	584	
		*****		
At5	900	AATATAA---GAAAT---AAATAAA-TTATTATTTAGTGGAGAA-TCCATAATAAGTTA	951	
A15	1656	TCTATAA---GCAAAAT---AAATAAA-TTATTCTTTAGTGGAGAA-TCCATAATA----A	1703	
Cb5	615	TCTATAA---GAAATTA-AAATAAAGTTATTGTTTAGTGGAGAA-TCCATAATACGA--	667	MÓDULO1
Br5	2046	TCTATAA---GAAAAGTATATATAAA-CTCTTATTTGGAG-----TCTCCACTAAAAAA	2095	
Lc5	585	TCTATAACTNCAAAT---GAATAAT-TTGTCCACTAAAAAGAAGTCCATAATA----A	636	
		*****		
At5	952	ATAATCATTATATTCAATAGGCAAAACCTTTGGGTGTGTTTAT--ATTAGTCTACGGAT	1008	
A15	1704	CCATTAATTATATTCC----TCAAAAAGCTTTGGGTGTTTATTTATTTAGTCTACGGAT	1759	
Cb5	668	----ATTTATGTTCCAT----AAAACCTTTGGGTTT----ATTATATAGTCTAGGGAT	714	MÓDULO1
Br5	2096	GTAACAATTATATT-----TTTA-----TACGGCT	2120	
Lc5	637	CCATTATATATGT-----ATTCTTTATGTGTGT-TATATTATAGCCACGGATT	684	
		*** *		
At5	1009	TTTCTG--ATTTTTATAACACTTTTGGTATTTTCAGATTAATAGAGTATTATGG--TTGAA	1064	
A15	1760	TTTGTG--ATGTTTATAACACATTTGGTATTTTCAG-----AGTATGA--TT-AA	1803	
Cb5	715	TTTGTA--AT-TCCACAACACTTAAGGTAGTTCAG-----AGTATGA--TTAAA	758	MÓDULO1
Br5	2121	TTTATGTTGATTCATAAGACTTGTATTTTT-----GTATGATTTTCTA	2165	
Lc5	685	TTTGTG--ACTTGCAT-----TATTCAT-----AGTATGA--TTAAA	718	
		*** *		
At5	1065	ATA-----TGCAATTCGTAATAATCTTC-----GGAAGTTTTAAGGTTTTG	1103	
A15	1804	ACA-----TGCTTTGTAAATCTCCAACA----AGGAAGTTTTAAGGTTTTA	1847	
Cb5	759	ACAATT-----CATCTTCGTAATAATTTACATAATTTTTGAAGTTTTT---TTATA	806	
Br5	2166	ACGATTTTTGTGTTGTTTTGGTGGAACTCTTAAGGTTT----ACAAAATTACATTATA	2220	
Lc5	719	ACA-----TAT-----	724	
		*		
At5	1104	TAACATAAATCATATA-TAGAATCCCAATTTGAAGAATCGTTTCTTCACG-----TT	1155	
A15	1848	TAACCAATAATCATACA-TTCAATCCAGTTCTAAGAATCGTTTCTTCACGTAACCTCT	1906	
Cb5	807	TAACATA--AATCAGACA-TACAAGCCATGTATAAGGA-----	840	
Br5	2221	CATGTACAAATCATTACAGTACAATCTCCATTTAAGAATCGTTTCTTCACGTAAGTCT	2280	
Lc5	725	-----	724	
At5	1156	GGTTTTATTGA-TTCGATAAAAAAGAAG-----TTTTTTAAGAATCAATG	1199	
A15	1907	GGTTTTACTGATTTTCGATACATAAGATTTTTATCGATGTTTCTTTTTTAAGAATCAATG	1966	
Cb5	841	---TTTTACAGATTTTCGATAGATAAGATTTTTTCATCGATCTATCTTTCTGAAGAATCAAT	898	
Br5	2281	GGTTATAATGA-----TAATTAATGTTTTTATAACTAGTGTCTTTTGAAGATC---	2330	
Lc5	725	-----	724	
At5	1200	CGACAATGCGTTGTCGTTCCACG----AGCAAGGAGTCCCAATCTGCGATATGTTTCTT	1255	
A15	1967	CGACAATGCGTTGTCGTTCCACG----AGCGAGGAGTCCCAATTTGCGATATTTTTCTT	2022	
Cb5	899	CGACAATGAGTTGTCGTTCCACG----AGTGAGGAGTCCCAACTCTACGATAGTTTTCTT	954	
Br5	2331	---CAATGCGTTGTCGTTCCAGTAGTGGGAAGTCCCAAAATCTGCGATCGATTTTTT	2387	
Lc5	725	-----TACACCTCTC	734	
		* * *		
At5	1256	-----	1255	
A15	2023	-----	2022	
Cb5	955	TTTAACTCAAGTTATTGTTTCTTCT-----	981	
Br5	2388	TCTTTTAAACCATGGTATATTACTTTTTAATATCCTTTGCCATACGTTTACATCTTACT	2447	
Lc5	735	-----	734	
At5	1256	-----	1255	
A15	2023	-----	2022	
Cb5	982	-----	981	
Br5	2448	AAAATATGCCTTATACGATCTATGATTACTGGTATTATAAAAAATTCATAATAGTTACCAT	2507	
Lc5	735	-----	734	
At5	1256	-----	1255	
A15	2023	-----	2022	
Cb5	982	-----TTTCTTTTTGTTTGGTTCACAAAAAGAATTTGAATTGATTTTT	1026	
Br5	2508	CCGTTTTTAATTATGTTTATTCTTAAT-----	2534	
Lc5	735	-----	734	

Materialles Suplementarios

At5 1256 ----- 1255  
 A15 2023 ----- 2022  
 Cb5 1027 ACTTCTACCACCTTTATTACAGTCCATATATTTATAATAATATGCCTTTGTTGTACAGT 1086  
 Br5 2535 ----- 2534  
 Lc5 735 ----- 734

At5 1256 ----- 1255  
 A15 2023 ----- 2022  
 Cb5 1087 ATGATCTATGATTAGTACCTTAGTGGTATTTAAATTCATGGTTACTATAAAAAATAAAAA 1146  
 Br5 2535 ----- 2534  
 Lc5 735 ----- 734

At5 1256 -----TCAA 1260  
 A15 2023 -----TTAA 2027  
 Cb5 1147 ATTAGCTTTTATAGTCTATAATGAAAAGGACAAAAAACCATCTTACGACAGTGAA 1206  
 Br5 2535 -----GCAAAAAGAACAACAAAATCCCACCTTAGGACAATGAAG 2572  
 Lc5 735 -----TC--- 736  
 \*

At5 1261 TAGCTTCTGAGCAATAATGTATCCGTAGTTGTAATAGAATCAAAGTACGATAAGAGTGT 1320  
 A15 2028 TTACCTCTGAGCAATAATGTATCCGT-----AGTACGATGAGAGTGT 2070  
 Cb5 1207 TGACCTTTGAGCAATAATTTTATCCGTAGTTGTAATAGAATCAAAGTACGATGACACTGT 1266  
 Br5 2573 TGACCTTTGGGCAATAATTTTATCCGTAGTTGTAATAGAATC----- 2614  
 Lc5 737 ----- 736

**CArG**

At5 1321 TTTTATGACAAATATCT-----TAATCTGGCC**CAATTATATG**TTCTACTGAAATCTTTT 1375  
 A15 2071 TTTTATAACAAAATTCC-----TAGCTAGAG-----TGTT 2100  
 Cb5 1267 TAATATAACAAAATTCC**TTAATTT**TTCTAGTGAAAATATTAT 1326  
 Br5 2615 ----- 2614  
 Lc5 737 ----- 736

At5 1376 TGAATTC--ATGGACATGTGAGACTTAAAAATAGCTCTTTTAT-----TCGCCGAGG 1425  
 A15 2101 TGAATTC--ATGGCCAATGAGAGTAAAGAATAGCTCTTTTAT-----TCGCCGAGG 2150  
 Cb5 1327 TGAATTCATATGGACCAATGAGTAGTAAAAATAGCTCTTGAGTTAATTTATTCGCCGAGA 1386  
 Br5 2615 -----ATGTACGACGAGTGAAGAGCTCCTGAGTTCATTTA--TTCAGAGA 2659  
 Lc5 737 ----- 736

At5 1426 TATATATAGCTA--GGAATTTTGTGCGAAATTTAGACGTTAG--TGGT--TTTGTCTCTCGT 1481  
 A15 2151 --TATCTAGCTA--GGAATTTTGTCAAAATTTAGACGTTAATTAGTGGTTTTGTTCTTGGT 2207  
 Cb5 1387 T--ATCTAGCTATGGAATTTTGTGCGAATTTGGACTTCAGTGGTTTTTGTCTTAGTGCA 1444  
 Br5 2660 GATATCTAGCTA--GGATTT-----TTGGTCCGACTTTAATGGTTTTGTTCTTGAC 2709  
 Lc5 737 --TATCTCTCTA--TAAATTTT-----AAATTT----- 760  
 \*\* \* \*\*\* \*\*\*\* \*\*

At5 1482 GACACAAAAGATTATATAGGATCTATATA-----TTAATG 1517  
 A15 2208 GACACAAAAGA--TAT--TAGGATCTATATA-----TTAAGC 2241  
 Cb5 1445 TGACTCAAAGATTTTATAGGATTCGATATAGATTAATTAATGATCTCAATTATTGATT 1504  
 Br5 2710 GCCGCTAAAGATTATAT--GATTCTGTAAAT-----TAATG 2743  
 Lc5 761 -----TCAACA 766  
 \*

At5 1518 AAATCTAGCGATCCATATGGTTTTTATATTACGTCTTGGTCATAGATAGGGGT----- 1570  
 A15 2242 AAATCTAGCGA-----TCATAGATAGGGGT----- 2266  
 Cb5 1505 AAATGTAGCGATTTGGCTGATATATA-----TAAATAAAGTCTTGGTC 1548  
 Br5 2744 GAGT----- 2747  
 Lc5 767 AAA-----ATAAATAG----- 777  
 \*

**LFY**

At5 1571 ----TGAACCATGATATG**CCAATG**TTGCTGAAGAAGTCAA----- 1607  
 A15 2267 ----TGACACCATGATATG**CCAATG**TTGTTGAAGCAGTCAATAAACCTCAAGTTGTAT 2322  
 Cb5 1549 ATCTTGAAAACATGATGTG**CCAAT**CTTGTCTGAAGCAGTCAATA----- 1591  
 Br5 2748 -----CAGTTATTTGATTGGTTTAAAGACT----- 2772  
 Lc5 778 ----TGAAG-----**AATG**TTNCTGAA----- 794  
 \*\* \*\*\*

At5 1608 -----ACTTAATTAT----- 1617  
 A15 2323 ATACTATTTACACAAATATCATGTATTTTTTTTTTATTCAAATCATATTTAATTTTGTAGCA 2382  
 Cb5 1592 ----- 1591  
 Br5 2773 ----- 2772  
 Lc5 795 ----- 794

At5	1618	-----	1617
Al5	2383	CTTCACATATTATATGTAATTGAAATCTATTGAATATTGTATTTTTAATATTTGGATTA	2442
Cb5	1592	-----	1591
Br5	2773	-----	2772
Lc5	795	-----	794
At5	1618	-----	1617
Al5	2443	TCTTCTGTCAGTCTTATAGTTAAAAGCAGTGAGCAAACATCATGGTCATGTGTGATAACT	2502
Cb5	1592	-----	1591
Br5	2773	-----	2772
Lc5	795	-----	794
At5	1618	-----ATAGTGAATAACAAAA-AGTGATATTTCTTA	1648
Al5	2503	ATACTTATTTTTAATATATGCAAGTGGACAGTGAATAACAAAAACATTGATATTTCTTA	2562
Cb5	1592	-----AAAATCTTAATATTGGCC-	1609
Br5	2773	-----	2772
Lc5	795	-----AAAAATATTA-----	804

		WUS	CArG		
At5	1649	ATTCCATTAAATATAATTATAGTTTTAAATCACCTAAAATAAGTTACTTAGCTTATTTAAA	1708		
Al5	2563	ATTCAATTAGAAATAA---AGCTTTAAATCACCTAAATTCATTACTTATTTGAT---	2614		
Cb5	1610	-----TCTACTCATATTGTTGTTTTGTCTCGGGACTACATCTGTCT-----	1651		
Br5	2773	-----AGTAACAATAAACAATATTA-----	2791		
Lc5	805	-----TAAACATAAG-----	814		
At5	1709	ACCCCCCAAATTTACTTAGTATTAGAAATAATGTAGTTAGTGTACGTACATGTTTGAGAC	1768		
Al5	2615	GCCCCCAAATTTAATTCCTACTATGAAAAATGAGGTTA-----GTACATGTTTGAGAC	2668		
Cb5	1652	-----ACTCAAATTAAGTATTTTAGT-----	1674		
Br5	2792	-----GTTATAAATGTCTTAATACA-----	2811		
Lc5	815	-----TTGATAC	821		
At5	1769	AGCAAAAAAAAAATAAAAGAAAGAAAGAAAAAGGTTAGTACACATAATGGGAATTAATG	1828		
Al5	2669	-----AAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG---AGAGGTTAGTACACATAATGAGAATTGATG	2720		
Cb5	1675	-----AAAATGATAAAGGGT---GAGGTTAGAATACGTAATTAGGAGTTGATG	1719		
Br5	2812	-----ACACGAGAGAGAG-----CGCTTGCCCTAAAGTG---	2841		
Lc5	822	TACAAAAATAAAAA-----TATTACAC-----	843		

At5	1829	TCTATTGAT-----TCTTTTATCTTTCT	1851		
Al5	2721	TCGACCAA-----TCTCT	2733		
Cb5	1720	ATGTCTATTGATTCTTTTAGGTTGCCCTAATCTCTCTCAGACTCTCTCTCTCTCTCT	1779	MÓDULO2	
Br5	2842	-----TCT	2844		
Lc5	844	-----CTCT	847		

		CArG	AuxRE		
At5	1852	CTCTCTCTC-----TCTAAGATGGAAAAC---CCCTATAAAATAGATGTCT	1893		
Al5	2734	CTTTCTCTC-----TCTAAGTTGCAAAACCCCTCCCTATAAAATAGATGTCT	2779		
Cb5	1780	CTCTCTCTCTTTCTCTCTCAGTCTAAGTTGGAAAAGC---CTATAAAATAGATGTCT	1835	MÓDULO2	
Br5	2845	CTCTCTC-----CCAAGTTGGAAAACCC---CTATAAAATAGATGTCT	2883		
Lc5	848	CTCTCTATC-----TCT-----CTATAAAATAGATGTAT	875		

		AuxRE	DOF		
At5	1894	CGGTCGTC-TCTTTGTCTCCACAT--CACTACAAA-TCTCTCTTTT-CCTCTAAGTTAA	1948		
Al5	2780	CGGTCGTC-TCTTTGTCTCCACAT--CACTACAAA-TCTCTCTTTT-TCTCCAAGTTCA	2834		
Cb5	1836	TGGTCGTCCTTTCTTTGTCTCCACAA--CACTACAAAGTCTCTTTTTCCTGCAAGTTCA	1893	MÓDULO2	
Br5	2884	TGGTCATCTTTGTAAACCACAC---CACTACAAA-TCTCTCCCTT-----AGCTCA	2931		
Lc5	876	TGGTCATCTTTCTTATCTCACACATCACACTACAAA-TCTCTCTTTT-TCCTAAGTTCA	933		

At5	1949	C-----AAAA	1953		
Al5	2835	CTAAAATAAATAGAAAGAAAGAAATTTGACA-----AAAA	2872		
Cb5	1894	CCTAAACCCAAAAATATAATAGAAAGAAAGAAACTTAACCAAAAAACAAAACAAAAA	1953	MÓDULO2	
Br5	2932	CTTTAAATCCACATTTAGTTAGAAGCAGAAAGAACTTAATA-----AGTT	2978		
Lc5	934	CTTAAACCCATAATTAAGTAGAG-----AGAA	961		

At5	1954	GAAA	1957		
Al5	2873	AAAA	2876		
Cb5	1954	AAGA	1957	MÓDULO2	
Br5	2979	AAAA	2982		
Lc5	962	AAAG	965		

## ALINEAMIENTO S3

**Alineamiento "shuffle-LAGAN" obtenido mediante el programa VISTA de la secuencia 3' no codificantes de los genes ortólogos de *TFL1* en *A. thaliana*, *A. lyrata*, *C. bursa-pastoris*, *B. rapa* y *L. crassa*.**

Resaltadas en fondo gris aparecen los módulos conservados identificadas por VISTA. En amarillo se resaltan los posibles TFBSs predichos, encima y en mayúsculas, el nombre del TFBS, que aparece en **negrita** si está conservado en al menos 5 de las 3 especies comparadas. Marcada con una @ se indica una secuencia también conservada con la 3'NCS de *Antirrhinum majus* y *Vitis vinifera*. Subrayada, la 3'UTR de *AtTFL1* y en rojo la sORF AT5G03837. Los asteriscos indican residuos significativamente conservados. La posición 0 pb correspondería al último nucleótido del codón de STOP de *AtTFL1*. At3: 3' NCS de *A. thaliana* (Ler); Al3: 3' NCS de *A. lyrata*; Cb3: 3' NCS de *C. bursa-pastoris*; Br3: 3' NCS de *B. rapa*; Lc3: 3' NCS de *L. crassa*.

At3	1	TTTCATGATTGT-----CATAAA-CTGCAAAAATGAAA-----GAAG	36	
Al3	1	TTTCATTATTGTC-----CATCGA-ATGCCAAAACGAAA-----GAAG	37	
Cb3	1	TTTCATCACTATTACTGTCCTTCATCATCAG-ATGCAAAAACAAAAACTATGATGAAG	59	<b>MÓDULO3</b>
Br3	1	--TCACGTTTATGCC-----TATCAA-ATGCAAAAACAAAAATTA---TAAA	43	
Lc3	1	-----ATTAT--T-----TAACAATTGCAATATTAATTTCTTAT---TAAT	37	
		* * * * *		
At3	37	A-----AAATTTGCATGTAATCT--CATG-TT-TATTTGTGTTCTGAATTTCC----	80	
Al3	38	A-----AAAAAT---TGTAATCT--CCTG-TT-TATTTATGTTCTGAATTTCCC----	78	
Cb3	60	ATG-----AAGATCATTGTAATCCA-CATGTTT-TATTTATGTTCTGAATTTCC----	107	<b>MÓDULO3</b>
Br3	44	ATGTTTATTTCTGTTCTAAATAATTAGCCATGTTTGTFTTTTATGTTCTGAATTTCT----	99	
Lc3	38	ATGTTATTTTACATCATATGTAACCA--CATGT---TATTAATGTTGTAATTTTCTCTAC	92	
		* ** * * * * * * * * *		
At3	81	GTACTCTGAATAAAAAC TGCCAAGATGAGTTGAATC-----	117	
Al3	79	GTACTTTGAATAAAAAC GCCTTCAGATGAGTTGAATC-----	115	
Cb3	108	GTACGTTGAATAAAGACTTCCAAGATGAGTTGAATCTGAATCTGATTTATAAATTATA	167	<b>MÓDULO3</b>
Br3	100	GTACTTTGAATAAAGACTGACAAAAATGAGTTGAATC-----	136	
Lc3	93	GTACTTTGAATAAAG-----AACATGAGTTGAATC-----	122	
		**** * * * * * * * * *		
At3	118	-----	117	
Al3	116	-----	115	
Cb3	168	ATATAATTGTTGTTTGATAAACATGTTTTTGTTTTATTCTTCAGCACCTTCATATACGAT	227	<b>MÓDULO3</b>
Br3	137	-----	136	
Lc3	123	-----	122	
At3	118	-----	117	
Al3	116	-----	115	
Cb3	228	AAAAGACAATATAGAAGCCAAACAATTATTTACACACCAACCTATTCCACTTTTCATCAT	287	<b>MÓDULO3</b>
Br3	137	-----	136	
Lc3	123	-----	122	
At3	118	-----	117	
Al3	116	-----	115	
Cb3	288	GTAAAGATATAATTAATGATCATCAGTATAAAAAATATGGAATTAATTACCTTTAACGT	347	<b>MÓDULO3</b>
Br3	137	-----	136	
Lc3	123	-----	122	
At3	118	-----	117	
Al3	116	-----	115	
Cb3	348	TCATATTTTATTCTTTTATTGAATTACTCTATAAGACTATAACCAACTTTATAATTAA	407	<b>MÓDULO3</b>
Br3	137	-----	136	
Lc3	123	-----	122	
At3	118	---CGAAATATCAATTGAGTTTACAGAA---GTATTGATAACGATCTGTCGATTATCAG	170	
Al3	116	---CGAAATATCAGTTTGTAGTTAACAAAA---GTATTGATAACGAC-----ACTATCAC	162	
Cb3	408	ACTCGAGATATCAATTTAGTTTACGGAAC--GTGTTGATAAC--CTTACTAGCTATCAC	462	<b>MÓDULO3</b>
Br3	137	---CGACAAAGTGAATCTTTATTAGAACATGATTT	169	
Lc3	123	---CGAATAA-----ATAT-----	133	
		*** * * * *		

At3	171	AATAAAAACTAGATTAATTCATATCATGTTTAGCA--TTGTAATACTACAAAAATAGTA	228	
Al3	163	AATAAAAACTAG----ATTGCATATCATGTTTCGCATCTTGTACCCTAAATAAATAGTA	218	
Cb3	463	AATACAAACTTAAT---TTGCATATCATGTTTTC---TTGGTTAGTACACAAGTAG--	513	<b>MÓDULO3</b>
Br3	170	-----ATTTGTAATACTACAAAAATAGTA	186	
Lc3	134	-----ATAGTAAATAAATCGAA	150	

\* \* \* \* \*

At3	229	AACTCTTGATTAATTAATAAAATCTAAGTTGCTGTAGTATATAAATCATTAAATCCTC--	286	
Al3	219	AACTCTTGAGTAATTAATAAAATCTAAGTTATTAAGTATA-----AATCCTTT--	267	
Cb3	514	-----TAATTAATAAAATCTAAGTTGTTGAATTA-----AGATTCTCCA	552	<b>MÓDULO3</b>
Br3	187	ACATGATTTATTTGTATACACAGTATACAGTA-----AACCTTA-	225	
Lc3	151	-----TGTATACACCAATTAAT	168	

\* \* \* \* \*

At3	287	-ATACATGGCT-----TGATAGGTCACATCACATGTAGTGAACC-----TTA	327	
Al3	268	-ATACATGGCT-----TGATAGGTCACATC-----	291	
Cb3	553	GATACATGGCTGATAATGATAGGTCACATCATATGTAGTGAACCTT-----ATTA	602	<b>MÓDULO3</b>
Br3	226	---TTTATGGTTT-----AATAGGTCACGTCGAGTTGATTTAGCTTGTCTTATA-TGATA	277	
Lc3	169	-----TAGCTTTTCTTTCATTGACG	189	

**bZIP**

At3	328	TATGATAAACGTGGAGATACGGAAAAGGATAGTTAAACGATGAAA-----ACTT	376	
Al3	292	-----ACTT	295	
Cb3	603	TATGATAAATGTGGAAATACGGAAAAAACGAAAAAATAAAGCAAACTTTTCTTTT	662	<b>MÓDULO3</b>
Br3	278	TATGATAAACGTGGAAACAGAGAAAAAT-----TATA---AAAAGACAA---ATAA	324	
Lc3	190	TTGTAATTGACATGTACACAGTAAAGCTGAATATATCTATAACTACAATACGA-----ACTA	244	

**CArG @ AuxRE CArG**

At3	377	TTTTTAGTTCT--GGTCAAAGTGACAAAGACCTTGATGACCATCTAAAATATGATCCTCTC	434	
Al3	296	TTTTTAGTTCT--GGTCAAAGTGACAAAGACCTTGATGACAAATCTAAAATAGGATCCTCTC	353	
Cb3	663	TTTTTTTCT--GGTCAAAGTGACAAAGACCTTGATGAGCCTCTTAAACAGGATCCTCTC	720	<b>MÓDULO3</b>
Br3	325	TTTTTAGTTCTTTGGTCAAATTGACAAAGAGTTTGATGACCCGCTAAAACCTGGACGCTTCT	384	
Lc3	245	TTTTTATTTT-----ATTTTACAGGTTTCAATTACTAAAAAAGACGAAGTAT	297	

\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

At3	435	CTCTTCTTACTCGGCGATCATA-----TTCATATCTATT-----	468	
Al3	354	C---TCTTACTCGGCGATCATAATT-----TTCATATCTATT	388	
Cb3	721	T---TCTTACTCGGCGATCATAATT-----ATCAATTCTATCTACTTCATGTG	764	<b>MÓDULO3</b>
Br3	385	---TCTCTCTCGGCGAACGTGATATATCATCAGTTTCAATTTTCTTGAATGACTGT	440	
Lc3	298	---ATTT-----TGATATATT-CAAATACATAATATATATAAATAAAT	340	

\* \* \* \* \*

At3	469	-----TTCAC-----GGCTGGTATTGTGACA	489	
Al3	389	-----TTACT-----GTTTGGTTTGTGACA	409	
Cb3	765	T-----TCATT-----GTTTGGTATTGNGACA	786	<b>MÓDULO3</b>
Br3	441	TAAATT--TATTCAGATCAGAAAACTTTTTTACAATTTGTGTGACTTGGTTTGTGAAA	498	
Lc3	341	TAAGTTGGTATTC-----ATTTGAATTTACTAAA	369	

\* \* \* \* \*

At3	490	AACAACCACCT-----	500	
Al3	410	AAAAAAAATAC-----	420	
Cb3	787	AAAAAAGTACTCTGCTCGG-----	806	<b>MÓDULO3</b>
Br3	499	AATAAATACTCAAACACTGAAACTTCTTCCAGATATCTATCGTGAAGCAAACCATATC	558	
Lc3	370	TTTAATAGCTGAATAT-----TATT	390	

\*\*

At3	501	---TTTATT-----TTCAA-----AAAAATCTA---ATAGGC	528	
Al3	421	---TTTGCTGCAAGTCGTAGTACAACCTCTGA-----GAAATGTATA---GTGAAT	465	
Cb3	807	---TTTGCTACAAGTTTGTAGTACTTGAGA-----AATTACGTATAGNGATAATT	856	
Br3	559	TATTCATATCATATATATGTTTCAGTG-TTTGATATTTGAAAATGTATATACAAATATAT	617	
Lc3	391	TATATTTATTATATAAATTTTGATGCTCTAAT-----AAGATATATCAACATGTGTTA	444	

\* \* \* \* \*

**TCP**

At3	529	ATAT-----GTATATTTCTCTATAGGGACCT-----	555	
Al3	466	AAATCAAATGTAAAACATATAACTACAACAGCTTCT-----	503	
Cb3	857	AAATCAAATG-----ATATAGTACTACAATTGATTTTTC-----	890	
Br3	618	ACGT-----TGATGCTAGTGCAAACCTTGTGTATATTTGAAAATGGGTATA	663	
Lc3	445	AAAT-----TATAACTAGTTAAAACCTCA-----	467	

\* \* \* \* \*

At3	556	-----	555	
Al3	504	-----	503	
Cb3	891	-----	890	
Br3	664	TGTAGTGAATTTATCCAAGGTCCTAGTACAATAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATAA	723	
Lc3	468	-----AA	469	

At3 556 -TTCTCTATATATATATTTATTA--CATTCCAAAATTCACGTCAAAAATATAGATTTAT 612  
 Al3 504 -TTTTCTGTG---AAATCTAATAGCCATTTTC---TTTCAATGTCACAAAAT-TAGATTTAT 555  
 Cb3 891 -TTTTCTAGTAT-----TGTCACACAT-TAGATTTAT 919  
 Br3 724 TCTCCTAGTACAATAGTTTTCT-----TTCAATATCGTGTTTTGTAGTTTTAT 770  
 Lc3 470 TCTC-----ATCAAGTGTCAAATTT--- 489  
 \* \*\* \* \* \*\*

At3 613 TGGGTATAAATCCCTCACTAGC--GTA----GACATGTCGCGGTAACAAAAATGTC 665  
 Al3 556 TGGTTAT--ATCCCTCACCAT--GTAGTATCGACATGTCGCGAGTAAACAAAAATGTATC 611  
 Cb3 920 TGGTAATA----CCGACCGACATGTA-----CTCCGCGGTG-----TTA 954  
 Br3 771 TGGGTATTAT---GTCACATTA----- 790  
 Lc3 490 --GATATTATA--ATCACAA----- 505  
 \* \*\* \*\*

At3 666 TCTGCCTACAACTA-TATA-----ATTCAAAACATATTAGATAGAAAAG-- 709  
 Al3 612 TTTGACTACAACTACTATATTAATTATCACATATTTAAAACATATGAGATC-AGAAG-- 668  
 Cb3 955 TCTGAC-----ATGCATATTCAAAATGCATAAAATTTGAAATGAA 993  
 Br3 791 -----TGCCTAAGTACGTCATGGTATAAGGGACGT 822  
 Lc3 506 -----AAAATAAAATACTCTATATGAAAAACCA 533  
 \* \*\* \*\*

At3 710 -----TCAGT--CTTCAATAAAATATTT-ATTATATGTATATATGAGGTATGA 754  
 Al3 669 -----CCAGT--CTTCAATAAAATATTTAACTATATGTGGATATGAGGTATGA 714  
 Cb3 994 ATATCAAAGTGATCAGT--CTTCAATAGAATA----- 1023  
 Br3 823 ATAATT-----TCAACTGATCAAATGAAGTA----- 848  
 Lc3 534 ATAATT-----TAAAT--ATCAAACATATCAAT----- 559  
 \* \* \*\* \* \*

WUS

At3 755 GATATAGTTTTTTGTCAAGAGTTTTAAGAAAAATATCTATATTCACCCGAATAA **CCATT** 814  
 Al3 715 GAATTATATTTTTGTCAAGAGTTTCAAGAAAGCATATCAATATTCAGCCGAATAA **CCATT** 774  
 Cb3 1024 -----CGTTAATAATCTATAAAAACATAT----- 1048  
 Br3 849 -----GCGGTTATTTTGCAAAAAA-----AAAAACAAGTAG **GGTG** 888  
 Lc3 560 -----GAGAATAATTTGCTAA----- **TGTT** 579  
 \* \* \*\* \*

CaRG

At3 815 **AA**ATAACAAG----TCTTAAT **CATTA**--AAATGCTTACAATA---TTTTCATATTTTTA 864  
 Al3 775 **AT**ATTACAAG----TCTTAAT **CATTA**--AAATGCTTACAATA---TTT----- 814  
 Cb3 1049 --ATTACAAC----TCGTAAT **CATTA**--GTTTGCTTACAGCAAGCATCTCATATTTATA 1100  
 Br3 889 **ACA**ACGCAATTACA-AAATTAGAAAT **CAT**AAAATGCTTTAAAAA----- 930  
 Lc3 580 **AT**ACAACAATGATACAAAT **TAC** **CATTAT** **ACAT**ACTTTGAATC----- 621  
 \* \*\* \* \* \* \*\* \* \* \*\* \*

At3 865 CTTAAGATTTTACTTTTTGCTACCTTGCAAGTTGCAAAAGTAT-----AA 909  
 Al3 815 -----ATAT-----AA 820  
 Cb3 1101 -----TAATTTTCAAAAATCTTTTTTTTCTGAAAAA 1133  
 Br3 931 -----AGAAAAAATATATATATATATA--TA 956  
 Lc3 622 -----ATAAAAAAGAT-----TA 634  
 \* \*

At3 910 TTAAGTAATTAACA-----GTCTAGTTTTTG--ACAACAAGAAGAAA----TTAGCA 955  
 Al3 821 TTAAGTAATTAACA-----TTCTAGTTTTTGACAACAACAACAACA---ATAGCA 869  
 Cb3 1134 TATGATAATTAATG-----GTTTACT-----AACACCACAAATT--TTAGCA 1174  
 Br3 957 TATAATAATGGTTATATATATGTAAAGTTCTACTAATTCACGTAAGATTAATTTACA 1016  
 Lc3 635 TGTAACNA-----GTTTAGATTTTAAACNG---ACAAAAATTCAAATTATA 677  
 \* \* \* \* \* \* \* \*

MÓDULO4

At3 956 TTCTACATGATTCAGTGTTCAAATGGAGAAAAG-----TTTTTTTAAAATGGATT 1006  
 Al3 870 AACTAC---ATTCAGTGTTCACATGGAGAAAGGATTTTTTTTTTTTTTAAATGAATT 925  
 Cb3 1175 TTCTAC---ATTCATGTTTAAATTTTATAA-----AATAGATT 1210  
 Br3 1017 T-CTAC---ATCCAGTGTTCAAATAAAGAAAAG-----AAATATAAAATGGATT 1062  
 Lc3 678 CACTAT---AA---TGTTGCAATAGAGAAAAT-----AGTTTTTAAAATGTATA 720  
 \*\*\* \* \*\*\*\* \* \* \*\*\* \*\* \*\*

MÓDULO4

CaRG

At3 1007 **GGCCA**-TT-----TTGGGTGTATAA-----AGAATATAGTACAGCCTGAATG 1047  
 Al3 926 **GGCCATTT**-----TTGGTTTATACAGAATAATAGAATATAGTACAGCATGAATG 975  
 Cb3 1211 **AGCCA**-TT-----TTGGGTATTTAC-----ACAGTAAAAAATAATG 1246  
 Br3 1063 **GGCCATTT**---TGGGTCA **TTGGG**TGCATAGT-----AGTACTGCGGCATAGATATG 1110  
 Lc3 721 **GA**CCATTTTGTGGGTAAC **TG**TATGCATGA-----ATG 753  
 \*\*\* \*\* \* \* \*

MÓDULO4

At3	1048	ATAGACCCATCTTTGAGAAATGAGAGATGCAAGTGGG-AAATATTAATTTCAACGGTAAA	1106
A13	976	AT-----TTCGAGAGGTGCAACA--CAAGTGGC-AAATATTACTTTCAACGGTAAA	1023
Cb3	1247	ATAGAGCCATGTTTGAAGATTG-----CAAGTGGGAAAATACTACTTTCAACGGTAAA	1299
Br3	1111	ATTACCTCATGTTGAAGAGATG-----CAAGTGGGAGAA-ATTACTTTCAACGGTACA	1162
Lc3	754	ATGGCTTCATGTCGAAGGGATT-----AAA-----TTCAACGGTAAA	790
		** * * * * *	

MÓDULO4

**ABRE&bZIP LFY**

At3	1107	CTCAAGAG-AGGTCACGTGTCATTA-ATTGAGTGG-TTAGCGGCTAAGTACTG-TTACAA	1162
A13	1024	CTCAAGAG-ACGTCACGTGTCATTT-ATTGAGTGG-TTAGCGGCTAAGTACTGTTTACCA	1080
Cb3	1300	CTCAAGAG-AGGTCACGTGTCATTTAATTTGTAATGGTTTAGCTGCTAAGTACTG-TTACAA	1357
Br3	1163	CTCAAGAA-AGACAACGTGTTGTTA-AATGAGTGG-TTGCAACTAAGTACTG-GTACAC	1218
Lc3	791	CTCAATAAGATGCCACGTGTCATTA-ATTGAGTGG-GCAGCGGCTAAGTACTG-TTACAT	847
		***** * * ***** ** * * *** ** ***** ** *	

MÓDULO4

At3	1163	T----TATCCTCAACGCCGACCAACTTCTGGTCTCTACA---TGTATATT--CGCTATC	1213
A13	1081	T----TATCCTCAACGCCGACCAATTTCTGGTCTCTACA---TGTATATTGCGCTATC	1133
Cb3	1358	TTATCTATCCTCAACGCCGACCAACT--GTCGTTACATGTATATATATTCGCTATC	1414
Br3	1219	G----TATCCTCAACCCATAGCAA---CTACTTCTCTACA---TGTATATTGCGCTATC	1266
Lc3	848	T----TATCCT-AACACCTAGCAA---CTGGTTTTGTACA---TG---TTGCAATC	890
		***** ** * * * * * ** * * * * *	

MÓDULO4

At3	1214	ATATAAACAAATCTAGC-AAAATACGACTAACTTA--GTAAGTTGTTTCGATTTTGTTAG	1270
A13	1134	ATATCAACAAATCTAGC-AAAATAC-----TA--GTAAGTTGTTTCGAGTTTGTTAG	1182
Cb3	1415	AAATCAAC-AAATCTAGC-AAAATACTAGTAGTATAACACAGCTTGTCTGTAGTTTCTTAG	1472
Br3	1267	ATATCAACAAATCTAGC-AAACTATTACTACT-----TTATTTGGACTTTTGTTAG	1315
Lc3	891	ATATCAACAAATCTAGCAAAAATATTATTAC-----TTGTTGGAGTTTGTTAG	939
		* * * * * ***** * * * * * * * * * * *	

MÓDULO4

**CArG**

At3	1271	ATTACTAT--TACATAGTTTGGATTCTCGTTTTATAACAAATTACCAA-----	1317
A13	1183	ATTACTA---TACATAGTTTGGAAACTCATTCTGAAGAAATTACCAA-----	1228
Cb3	1473	ATTTCGTATACAAAATAGTTTGTCTTCGTTTTATAAAC--TTTAGCAA-----	1519
Br3	1316	ATTACTAT-----ATAGTTTGGATTCTCGTTTTATGAATAAAATATTAGGGTATCTCCA	1370
Lc3	940	ATTACTAT-----ATA-----	951
		*** ** **	

MÓDULO4

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1371	CATTAACACTAAATTTGGTGTGAAATTACACCAAATTTGGTGTGTTTGGTGTCAATGTT	1430
Lc3	952	-----	951

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1431	TTTATCATCTTCAACAATAACACCAAATCTTACACCAAAAACAATATTATATATTATTG	1490
Lc3	952	-----	951

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1491	ATGTTTTCAGTTTAAATTTTATATTTCTATATTGTAATTGATAAATAATGATTTT	1550
Lc3	952	-----	951

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1551	GTTATATCTAGATTATATTTATATTTTATTATTTGTAAGTGATAAATAATAAATAATTATT	1610
Lc3	952	-----	951

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1611	TACTAATTTATTTTGAATATAATAATAAAATAAAATAAAATTTAATTATATGAAAATA	1670
Lc3	952	-----	951

At3	1318	-----	1317
A13	1229	-----	1228
Cb3	1520	-----	1519
Br3	1671	AATTAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATA	1730
Lc3	952	-----	951



At3	1318	-----TATCAAAAACATTTTTCGTTCCAGCTCA	1345
Al3	1229	-----TATCATAATCAT-----	1240
Cb3	1520	-----GCTTCTAATCAT-CTTCGTTCCAGTTTA	1546
Br3	1731	ATCTATATTATTAATGAAACACATTAATGTATTTTAGAAATTTTGTGTAATA-----	1785
Lc3	952	-----TATTATAGA-----	960
		*   *	
At3	1346	ATGAC-----TAAAGGTATTGAAATCGAGT-----	1370
Al3	1241	-----AAAAGGTATTGAAGTAGAGT-----	1260
Cb3	1547	ATGCTTCAAATTAAGGACTTGAAGTTGAAGTTAA-----	1580
Br3	1786	-----AATATTATCACACCAAATGTGAAAACAAATTTAAAACAAAAATAATAC	1833
Lc3	961	-----	960
At3	1371	-----TTAAGTTCAATGTGGGTTTCAATCATTTTATTTTATTTTGTCTAAG	1417
Al3	1261	-----TTTAGTTCAAATGGGTTTCAATTAATTTTATTTTACTTAAAG	1307
Cb3	1581	-----TTTAATTCACTTTGGTTCATTTG-ACTATTTTATATTTGCTTAAC	1626
Br3	1834	AATATATTTATGTTAATTACAAATTTGATAGTAATTAATTAAT--TTTAAATGAAA	1891
Lc3	961	-----	960
At3	1418	AATAGTCCA--CAAATGATCAAAAACAACTGGT-----	1451
Al3	1308	AATATTCAAAGCAAGATTGATTTAATATAAATGGT-----	1343
Cb3	1627	GAGGGTGAAGCAGAATAGA-----ATATTGGT-----	1654
Br3	1892	CATATTAATA-----TATGTATTTTAAATATTTGGTGTGATGAATAGTGTACACCA	1943
Lc3	961	-----	960
At3	1452	-----	1451
Al3	1344	-----	1343
Cb3	1655	-----	1654
Br3	1944	AATTTGGTGTAAACTAGTCACAATACACCAAATTTGGTGAATAGTGTCAAATTTGGTG	2003
Lc3	961	-----	960
At3	1452	-----	1451
Al3	1344	-----	1343
Cb3	1655	-----ACTC-----	1658
Br3	2004	TCTTGTGGAGATGAAATCACACCAAATTTGTGTTTTGGTGTCTGTGGAGATGACGT	2063
Lc3	961	-----GAGATGTAATC-----	971
At3	1452	-----TTTG	1455
Al3	1344	-----TTTG	1347
Cb3	1659	-----TTTG	1662
Br3	2064	AGATAGTATATCATCTTCATTCACCATATGATTAAGGGTGTGATACGAAGTAGATTTTA	2123
Lc3	972	-----	971
At3	1456	GTTTCATTGTGAAT-----	1469
Al3	1348	GTTTCATTGTGCAT-----	1361
Cb3	1663	GTTTTATTGTGCATTCAACTTAGAATTAACCAAATTTGTCTTCAATTTACCTAGAAT	1722
Br3	2124	ATTCAGTTTGGACCTCTTGGTATG-----	2148
Lc3	972	-----	971
At3	1470	-----TAAAAAAAAAAG-----	1482
Al3	1362	-----TAAAAAAAAATTG-----	1374
Cb3	1723	GAACACTTTTATTTATAAAAACAAGGTGGT-----	1752
Br3	2149	-----AAAAAATACTGGTTTTGTTTGAATTTTGCATGTGTAAGTCAG	2192
Lc3	972	-----GAAATATT-----	980
		*   *	
At3	1483	-----	1482
Al3	1375	-----	1374
Cb3	1753	-----	1752
Br3	2193	TGTTCAACATTTTATATAACTTTTTGTAAAAAATAGTTTTTAATCGGCTTTTCTGCCAAA	2252
Lc3	981	-----	980
At3	1483	-----	1482
Al3	1375	-----	1374
Cb3	1753	-----	1752
Br3	2253	TCCATTTTCAAAAAAAAAAATCATCTTTTCAGCCTCGATTAGCTAATGAATCACCTTTA	2312
Lc3	981	-----	980

At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1752	
Br3	2313	TAAATAAAAGAAAGATGTTTAAACTACATCCATTTTCATAAAGATAGACTTTTTAGTATT	2372	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1752	
Br3	2373	TTTATATATATTAAGAAAACACATTAACCTACCATAATAAATGTATCCTTTTTTGTAATT	2432	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1752	
Br3	2433	TTCAATTTTCAATAACTTTAAATCAATAGTAATTCAATAAAGTCAATTAATTTTCTCGAA	2492	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1752	
Br3	2493	GTTTATAATTTTTTTCATAGAAACACACAAAATAGATATTTGTGAATCAAACTTTTTTT	2552	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1752	
Br3	2553	TAAAAAAGTTTATCTTAATAGAACGGATAAAATGTCTATTTCTAAGAAATTAATTATCA	2612	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1482	
Al3	1375	-----	1374	
Cb3	1753	-----	1787	
Br3	2613	TAAGTATAATAAATAGTTTAAGAGCTA-----	2639	
Lc3	981	-----	980	
At3	1483	-----	1506	
Al3	1375	-----	1398	
Cb3	1788	AATATAATTAATTATCGTAGCTATAGTTTGGTAAGGATAAGTTTATCTACACATGCA	1847	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2640	-----	2662	
Lc3	981	-----	980	
At3	1507	-ATGTGCCATAACAAAATCTT---ATGTAATTATTGCTTCCAAGACTTCAGAGCT----	1557	
Al3	1399	-ATGTGTCAAAACAAAATCTT---ATGCAATTATTGCTTCCAAGACTCCAGAGTCTTAGA	1454	
Cb3	1848	TATGTGTCATAAC-AAATCTA---ATGCAGTTATTGCTTCCAAGACTTT-GAGTCCAAGA	1902	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2663	---TGTGTCATAACAAAATCTCATGCATGCAATTATTGTTTCAAGACTTTAG-----	2711	
Lc3	981	-----	980	
At3	1558	-----	1579	
Al3	1455	CCTCAAGTC-----	1503	
Cb3	1903	TTCTTAATTATTATAGCCTGTAATTAATATGTTTCGCAAAAATA-----	1953	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2712	-----	2711	
Lc3	981	-----	980	
At3	1580	AAGAAAAA-CAAAGAA-GTATATACAGTACACCTACGTAGGCAAATTGATTCACTACCA	1637	
Al3	1504	AAAAAGGGG-AAAACAATGTGTATACAGTACACCTACGTAGGCAAATTGATTCACTACCA	1562	
Cb3	1954	GAAAAAGGGTAAAATGGTGTATATACAGTGCACCTACGTAGGCAAATGGATTGACTACCA	2013	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2712	-----	2758	
Lc3	981	-----	980	
At3	1638	AATCAAGGGCATGCAAAGACTTTAGGATTTGCCTGAAAAAGACACTGTGAACTAGAACAT	1697	
Al3	1563	AATCAAGGGCATGCAAAGACTTTAGGATTTGCCTGAAAAAGACACTGT-----	1610	
Cb3	2014	AATCAAGAGCATGCAAAGACTTTAGGATTTGCCTCAAAAAGACACTGTGAGTTTGT----	2069	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2759	AATCAAGGGGATGCAGAGACTTTAGTATTTGCCTGAAAAAGACACTGNACTAT-----	2811	
Lc3	981	-----	980	

**CArG**

At3	1698	TATATTTTGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAC-TAGAA <b>CATTATATAG</b> AGT-TTTAGG	1755	
Al3	1611	-----GAAC-TAGAA <b>CATTATGTAG</b> AGT-TTTAGG	1638	
Cb3	2070	-----GAACTTAGAAT <b>ATTATATAG</b> AGTCTTTAGG	2099	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2812	----- <b>ACGTTACATAG</b> AGT-GTTAGG	2831	
Lc3	981	----- <b>ATAG</b> AGT-TTCAGG	993	
		***** * **		

**CArG**

At3	1756	GTTTCAGTAACACATAATGTGC----CTGTGTTGTG-TTTAG <b>CCACTTATGG</b> TTA-TTT	1808	
Al3	1639	GTTGCAGTTAGACATAATGTGC----CTGTGTTGTG-TTTAG <b>CCACTTATGG</b> TTA-TTT	1691	
Cb3	2100	GTTTCAGTAAGACATAATGTGT----CTGTGTTGTG-TTTAG <b>CCACTTGTGG</b> TATTTT	2153	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2832	GTATCAGTAAGA-----GTGGAAGACCTCTGTTGTG-TTTAG <b>CCACTTATGG</b> TTA-TTT	2883	
Lc3	994	GTTTTAGTCTGACATAAATGTGG----CTATGTCATGTTT <b>AGCCACTTATGG</b> TTG-TTT	1047	
		** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *		

At3	1809	TCATAGC-TAAATATTTTCCAAAAGTGAAACACCATTTTATTTAT-----AAAA	1858	
Al3	1692	TCGTAGC-TAGATATTTTCCAAAAGTGAAACACCATTTTATTTAT-----AAAA	1741	
Cb3	2154	TCATAGC-TTAAATATTTTCCAAAAG-----TAT-----AAAA	2185	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2884	TCATAGC-TAGATCTTTTTC AAG-ATAAAACATCTTCAATAGTATGTTTATTTGTATA	2941	
Lc3	1048	TCATAGCTTAAATATATTTCCAAAATGAAGCA-----CATC	1084	
		** * ** * * * * * *		

**TCP MYB**

At3	1859	TGACT <b>GGCCCC</b> TCGCG <b>TTTGGT</b> GTTATTACAAATCAACA----CGTGCTCTGTTCCATTC	1914	
Al3	1742	TGACT <b>GGCCCC</b> T--CG <b>TTTGGT</b> GTTATTACAAATCAACACGTGCGTCTCTGTTCCATTC	1799	
Cb3	2186	CGACT <b>GGCCCC</b> T--CG <b>TTAGGT</b> GTTATTACATATCAACA----CCTGCTCTGTTCCATTC	2239	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2942	AGGAC <b>CGCCCT</b> --C <b>TTTGT</b> GTT---CAAATCAACG----CGTGCTCTGTTCCAT--	2989	
Lc3	1085	AGATT <b>GGTCCCT</b> --C <b>TTT</b> AATAATCTTACATATCAACA----CGTGTATGTTCTA---	1135	
		* * * ** * * * * * * * * * * * * * * * *		

**CArG**

At3	1915	CATCCCTGATTTTACT <b>CAAAATTTG</b> CTACATCTAAATATATTTCTTATGCCAAAATTG	1974	
Al3	1800	CATCCCTGATTTTATT <b>CAAAA-TTG</b> CTACATCTATATAT-----1838	1838	
Cb3	2240	CATCCCTGGTTTACT <b>CAAGA</b> -----CTCATTGCTCACA-TACTCATGCCAAA---	2289	<b>MÓDULO5</b>
Br3	2990	---CCCTGGTTTACT <b>GAACAT-TTG</b> CTTACCTAAATATATTTGTCATTTGCCAAAAA-	3044	
Lc3	1136	-----TCATATGAGTATATT-----1150	1150	
		*** * *		

At3	1975	AGATGGTGATGGGTGCAGTATTTGGGTATGAATCGTT-TTGAACATA-A-----AG	2024	
Al3	1839	-----GTT-TCGAACATAA-AACATATATAG	1861	
Cb3	2290	-----ATTGGTGTCAGTATTAGGGTATGAATCGTTGTTGAACATAACAGCAT-----	2335	<b>MÓDULO5</b>
Br3	3045	-----TTGTACCAGTGTAAAG-----3060	3060	
Lc3	1151	-----TTAA-----1154	1154	

At3	2025	TCTAAAACATTATGTAGAGTATTAGGGTTTCAGTAAAAC---ATAATGTCCATGCGTTGT	2081	
Al3	1862	TCATATAAT-CTATATAGAGTTTTAGGGTTTCAGTAAAGAC---ATCATGTGCATGTCTTGT	1917	
Cb3	2336	-----TATAGAGCGTTAGGGTTTCAGTAAAGACATAAATGTGCATGTCTTGT	2383	
Br3	3061	-----TGTTGGATATGAAT-----CGTTTT	3081	
Lc3	1155	-----1154	1154	

At3	2082	GTTTAACTAC---TTATGGTTGTTTTCATGGCTAAATATCTTTCCATCAGTAAAACAC <b>C</b>	2138	
Al3	1918	GTTTAGCTACTTATATGGTTGCTTTTATGGCTAAATATTTTCCAAAAGTAAAACCCAT	1977	
Cb3	2384	GTTTAGCTAC---TTATAGTTGTTTCCATGCCTAAGTATTTTCCAAAAGTGACACGT <b>C</b>	2440	
Br3	3082	TTTTTTT-----TTTTTTTGTCTAAAAGGTTAA-----TATCATAAATGAAGTGGT-	3128	
Lc3	1155	--TTAAT-----TCTTATATACTTGAAG-----1176	1176	
		** * * * * *		

**CArG**

At3	2139	----- <b>TTTTTATAG</b> ----CGTATTTTATTCAT-AAAATGAGTGGCCCTT----GTTAT	2182	
Al3	1978	----- <b>TTTTAATAG</b> ----TAAGGTTTATTCAT-AAAGTGGTGGCCCTT----GTTAT	2021	
Cb3	2441	ACTTTGT <b>TTTTAATAG</b> TAACTATGTTTATTCGTAAAAATGAGTGGCCCTT----GCAAT	2496	
Br3	3129	-----TAGTTAC-----AAAATGCTT-CTATACAATGAT	3160	
Lc3	1177	-----TACGTAAT-----AATATTAATCACCTAT----ATTAT	1205	
		** * * * * *		

At3	2183	TACC-----AATCAACACGTA <b>CTCGTTCTGTCCCTCCCTTCTTTCACTCA</b>	2229	
Al3	2022	TACC-----AATCAACACGTA <b>CTCTGTCTGTCCATCCCTCATTTCAC<b>CA</b></b>	2068	
Cb3	2497	TTACAA-----AATCAACACGTA <b>TCTCTCTGTACATTCCTGTGTCACTAA</b>	2545	
Br3	3161	TACTTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAA <b>CAAGAAATCATAGTGTGAA</b> -----CTAGGAATGGA	3215	
Lc3	1206	CATT-----CAAG <b>CATT<b>CA</b></b>	1221	
		* *		

	CArg		CArg	
At3	2230	AAAATTG	CCTAAT-CTA---AATATATTTGTCATTGC	CAAAAATTAG-----TTTA 2277
A13	2069	AAAATTG	CCAAATACTAATTAATATATTTGTCATTGAC	AAATTTT-----TTTA 2118
Cb3	2546	AAAA	-----AATTGCTACATCT-----	AAATTTT-----CTTA 2573
Br3	3216	TAATCAGG	CTA-----	AGATTAGATCAGCCATTTA 3245
Lc3	1222	TAAAC	-----	ATATTTGAT-----TTTA 1239
		**		* ** ***
At3	2278	CTGTTTGG-----	GTGTGAATCGCATCGAAATGCTCTTCGTATGTG-----	2318
A13	2119	CTATTTGGGTATGACCGTATGAATCGTTTTGAAATGCTCT---	TATGGGAAATGAAAATG	2175
Cb3	2574	-----	TATAATTCTC-----	2583
Br3	3246	GCCATAAGG-----	TTTCGGAACCGTCGT-----	3269
Lc3	1240	GTGATG-----	-----	1245
At3	2319	-----	TCATAAAATGAAACTGAAA-----	2337
A13	2176	CTTTTTTTGTTAAAGGATCTTCATAAAATGAATATGTTATCTAACTTTTTTTTTTTTACT	2235	
Cb3	2584	-----	CCAAATATAAAAAATGTAGCTAACCTTTTTGTCTTC--	2621
Br3	3270	-----	TAATATCATAATCAGGATAT-----	3289
Lc3	1246	-----	TAACATCACACC-----	1258
		* * *		
At3	2338	-ATCGTTTGAAAATTCATAAATACGTATTTAAGAAAAATC-GTTCAAACATATGATCTTTC	2395	
A13	2236	TATC--TTAAGACATATAAATACGTGTTTTAG-AAAAATC-GTTCAAACATATGATATCT-	2290	
Cb3	2622	-GTTTCTTAAGACATATAAATACGTGTTTTAAGAAAAATCGGTTCAAATGCATGATTAATG	2680	
Br3	3290	-----	GAATCGTTTTGAATC-----	3304
Lc3	1259	-----	AATCATT-----	1265
		**** *		
At3	2396	TGCCAACTGCCAAGTACATGTATTATTT-----	GCTTATACATAA--AATTTAACT 2444	
A13	2291	-----	CTCGCAAGTATATGTATTATTT-----GCATATACATAATTTTTTAAAT 2335	
Cb3	2681	TCT---CTCGTAAGTATATTGATTATAGTATCAGTATGCATTTACAATCTTTATTTAAT	2737	
Br3	3305	-----	TCGCTTATATATGGGTCGGGTC-----ATAGACCTAAAAATGTTAGCT 3347	
Lc3	1266	-----	AACTAAATATTTTAG-- 1280	
			* **	
At3	2445	AAAACCTCATTGAAGATCAT-----	TTATATTCGTTTCATTTCTCTTTTCATCA 2493	
A13	2336	AGAACCTCA-TTGAAGCTCTCGATTTGCATCATTATATTCGTTTTATTCTATTTTCATCA	2394	
Cb3	2738	AGTAC-----	TTACTACAATCTTTATTT 2761	
Br3	3348	AA-----	CGTTTTTCCTTA 3361	
Lc3	1281	-----	----- 1280	
At3	2494	AAAAACAAAAATAAAACAAAAAATCTAAAATCAAAAAACAAAACGTGCATGCAAAATAAA	2553	
A13	2395	AAATATAACAA-----	TCATGCAAAATAAA 2419	
Cb3	2762	AA-----	----- 2763	
Br3	3362	AGACATATGA-----	----- 3371	
Lc3	1281	-----	----- 1280	
At3	2554	ATATTGTTA-----	TAAATTTGATGTATCTGATTTATAATTTATGCAAAACCAAGTCTT 2607	
A13	2420	ATATTGTTATCTTCTTAAATTTGATGTATATGATCTACAATTTATGC-ACCTCAAGTCTT	2478	
Cb3	2764	-----	----- 2763	
Br3	3372	-----	----- 3371	
Lc3	1281	-----	----- 1280	
At3	2608	GTCACAAGTAATTACTTTCTACATGTACGAGCATAGTTATCTCTTTTTTCATTTACGGTA	2667	
A13	2479	GTCACAAGTAATTACTTTCTACTTGTACGAGCATAGTTATTTCTTTTTTCA-----	2528	
Cb3	2764	-----	TTAGTACTATGTACCT-----TTTATCTTTCATTT----- 2793	
Br3	3372	-----	----- 3371	
Lc3	1281	-----	----- 1280	
At3	2668	CACATTTTGTTTTTCACGGTACACATATAAATCACATCATTCAAATCACGCATTAACATA	2727	
A13	2529	-----	TTCACGGTACACATAGAAATCACATCATTCAAATCACACATTAACATA 2577	
Cb3	2794	-----	TTTACAGTACACATATAAATCACATCATTCAAATCACACATTAAC--- 2839	
Br3	3372	-----	ATTC---GGTACACATAAATCACATCATTCAAATCGCACATGATTA 3416	
Lc3	1281	-----	ATTA---GTCACACATTAATC---TTGTTT-----ATAAC 1309	
		** ** * * * * *		
At3	2728	CGA-ATTATATCTACCGGTACATAGATTTATAAGTACATT--AACATCTTCTATTTACACC	2784	
A13	2578	CGA-ATTATATCTAACGGTACATAGATTTAAAAGTACATT--AACATCTTCTATTTACACC	2634	
Cb3	2840	---AACATCTTCTACCGGTACATAGATTTATAAGTACATT--AACATCTTCTATTTACACC	2893	
Br3	3417	GAAAAATATATCTACCGGTACATAGATCTACAAGTACACTGCGAAATATTCATTTACACC	3476	
Lc3	1310	CAACATGTGACTACT-----	----- 1325	
		* * * * *		

MÓDULO6

MÓDULO6

			<b>MYB</b>	<b>LFY</b>	<b>ERE</b>			
At3	2785	GGTACGAAGCCGCAAACCTGGTGAT	TAACCA	GAGTGG	AAATTATTA	GCCGCC	AT-----	2839
Al3	2635	GGTACGA AACCCGCAAACCTGGTGAT	TAACCA	GAGTGG	AAATTATTA	GCCGCC	AT-----	2689
Cb3	2894	GGTACGAAGCCGCAAACCTGGTGAT	TAACCA	GAGTGG	GAATTATTA	GCCGCC	ATATACA	2953
Br3	3477	GGTACGA AACCCGCAAACCTGGTGAT	TAACCA	GAGTGG	AAATACTAG	GCCGCC	CA-----	3530
Lc3	1326	-----CTTAACCAAGAATGTTCTAATAAA	T	GTT	CAATAAATAT	TATTC	G-----	1370
			* * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *		

MÓDULO6

			<b>LFY &amp; MYB</b>	<b>CArG &amp; DOF</b>				
At3	2840	-ACTTCGGTTTAGAAC	GACTCTCGAGG	CAAACCA	ATGCAATAACCTTA	CGATTAAAA	2898	
Al3	2690	-ACTTCGGTTTAGAAC	GAT	TCTCGAGG	CAAACCA	ATGCAATAACCTTA	CGATTAAAA	2748
Cb3	2954	AACCTGGTTTAGAAC	GAA	TCTCGAGG	CAAACCA	ACGTGCAATAACCTTG	CGATTAAAA	3013
Br3	3531	-ACTTCGGTTTAGGAC	GAA	TCTCAAGG	CAAACCA	ATGCAATAACCTTG	CGATTAAAA	3589
Lc3	1371	-GCCTCG-----	ACT	AAATA	-----	-----	1383	
			* * *	* * *				

MÓDULO6

			<b>GARE</b>		
At3	2899	GAGACGACCTGTCGTGTTGCATGTAG	TAACAAA	AAAAAAAAAGAGAAAGCAAGAAACATA	2958
Al3	2749	GAGACGACCTGTCATGTTTCATGTAA	TAACAAA	-----AAAGAGAAAGCAAGAAACATA	2802
Cb3	3014	GAGTCTACCTGTCATGTTTCATGTAA	TAACAA	CAACAACAAGGCAA-AAAAAACATA	3072
Br3	3590	GAGACGACCTGTCATGTTTCATGTAA	TAACAAA	G-----AAAAAGAAAGAAAGGACATA	3647
Lc3	1384	-----ATGCTT-----	CAAAG	-----CAATTGAAAAAAAAA-----	1410
			* * *	* * * * *	

MÓDULO6

At3	2959	CTAACCCCTGGACCGAGTCTACTGGTCC	TTCGTAT----	AAACACATAA--ATTCTA--	3009
Al3	2803	CCAACCCCTGGACCGAGTCCACTGGTCC	TTCGTAT----	AAACACAAAAAGATTCTA--	2855
Cb3	3073	CTAACCCCTGGACCGAATCCACTGGTCC	TTCGTATAAA	CAACACATGAAGATTCTAATT	3132
Br3	3648	CTATCCCTGGACCAAGTCCACTGGTCC	GCATC-----	AACACAAACA-----	3690
Lc3	1411	-----	-----	-----	1410

MÓDULO6

			<b>CArG</b>	<b>CArG MYB</b>	
At3	3010	ATATTTTAAAAGTTTAGGGCTTTGTAA	CATAGAAAGG	--CTGTCTAAATTTGATTGGT	TA 3067
Al3	2856	ATCTTTAAAATTTAAGGGCTTTGTAA	ATGGAAGGG	--CTGTCTAAATTTGATTGGT	TA 2913
Cb3	3133	ATCTTTAAAATTTTAGGGTTTGTGGT	GTGTAAGG	--CTGTCTAAGTTTGGATTGGT	TA 3190
Br3	3691	-----TTACACTTTTAGGGTTTGTAA	TATAAAGC	--CTGTCTAAATTTGATTGGT	TT 3743
Lc3	1411	-----TTAATT	TATAATAG	GATTATTTAGCTCAATT	----- 1443
			* * * * *	* * * * *	

MÓDULO6

			<b>TCP</b>		
At3	3068	ACGTGTCGAAGAGTCGTGCTAGG	TCCCCT	-CAT----GTGTTAAGGTTTGTAT--CCTCG	3119
Al3	2914	ACGTGTCGAGGAGTCGTGCTAGG	TCCCCT	CTCAT----GTGTTAAGGTTTGTATGATCCC	2969
Cb3	3191	ACGTGTCGAGGAGTCGTGCTAGG	TCCCCT	CTCAT----GTGTTAAGGTTTGTATGATCCC	3246
Br3	3744	ACGTGTCGTAGAATCGTGCCAGG	CCCC	TCTCAAGAATTATGTGAAGGTTAACATATCCT	3803
Lc3	1444	-CTGTGCACAAAAT--TGTTAC	TCTTCTC	-----GTGTGAA-----	1478
			* * * * *	* * * * *	

MÓDULO6

At3	3120	-----TATA-----	-----AT-----	-----ATATA-----	3130
Al3	2970	-----TATAGTTTGGTCTGTGCGG	TTCAT-----	-----ATATACTCACATT	3007
Cb3	3247	-----TATAGTTTGGTCTGTGCGG	TTCAT-----	-----ATATAG-----	3277
Br3	3804	CGTATTGTTTGGAATTGGCAGTTT	TGAATGTGCTTCAGATATAT	TATACAC-----	3856
Lc3	1479	-----TATAATTAA-----	-----TTTTAAGGCAC-----	-----ATATA-----	1504
			* * *	* * * *	

MÓDULO6

			<b>CArG</b>	<b>SAM-L1</b>		
At3	3131	CTCACAACAAGTAAC	CAACATAAAGT	----GACGAGGAGGTACATTTACACATACA	---- 3182	
Al3	3008	CTCACAACAAGTAACA	CAACATAAAGT	----GAAGAGGAGGTACATTTACACATACA	---- 3059	
Cb3	3278	-TTACAAGAAGTAAA	CAACATAAAGT	----GAAGAGGAAGTACATACAGACATACA	---- 3328	
Br3	3857	-TCACAATAAACAAA	CAACATATA	TAAAGCGAAGAGTATG	CATTTACGCATGAATAAT	3915
Lc3	1505	-TCACATTGCTCAAG-	-----	GAATAGTATA	TAAATT	----- 1534
			* * * *	* * * * *		

MÓDULO6

At3	3183	-----	-----	-----TGTAGACAA	3191
Al3	3060	-----	-----	-----TGTAGACAA	3068
Cb3	3329	-----	-----	-----TTGATACAT	3337
Br3	3916	ACGCAGAAATGTGCTACCAGTGT	TAATAAATAAATCCTTTTTTTAT	-----TAAATAAAT	3968
Lc3	1535	-----	-----	-----AAAATATCGTTTTCTTACAGTTGAGTAGAATTT	1568
				* * *	

At3	3192	A-----	-----GTAATTC--	-----AATAATTTAACCAAAA-----	3217
Al3	3069	ATTAG-----	-----GTAATTC--	-----AATGATTTAACCAAAA-----	3098
Cb3	3338	ATCGACATATCGACAAA	AGTAAACTC--	-----AATGAGTTAGAAAGAAAGAAAGTGAATCAAT	3395
Br3	3969	CTTA-----	-----GTCCCTCGGAGACATCCGATA	-----TAAATAAATAAAT-----	4005
Lc3	1569	ATCT-----	-----ATCATTTC--	-----AATCAGTCAAGCAAAACAGCG-----	1601
			* * * *	* * * *	



**AuxRE**

At3	3784	TC-TTCTGCGATGCTTTTGTACTGCGAAAGCTGCAAAAAACAT---G <b>TGTCTC</b> TTTCTC	3838	
A13	3510	TC-TTCTGCGATGCTTTTGTACTGCGAAAGCTGCAAAAAACATCATCG <b>TGTCTC</b> TTTCTC	3568	
Cb3	3723	TCTTTCTGCGA---TTTTGTACTGCGAAAGCTGC-AAAAACAT---G <b>TGTCTC</b> TTTCTC	3774	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4434	TC-TTCTGCGATGCTTTTGTACTGGAAAAAGCTGCAGAACAAAT---A <b>TGTCTC</b> TTTTTT	4488	
Lc3	1905	TC-TT-----AAT---T <b>TATGT</b> TTTTTTT	1924	
		** ** * * * * *		
At3	3839	CTTTTTCATTTTTTTC-----TGGTTTACTTTCCTTTTGTCTTTTCTTTTTT	3889	
A13	3569	CTTTTCCATTTATTTTC-----TGGTTTACTTCCCTTTTGT-----TTTTCTTTTT	3614	
Cb3	3775	ATTTCTCATTTATTTT-----TGGTTTATTTTCTTTTTT-----TTTTAA	3815	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4489	CTCTTT-ATTTATTTTATC-----CGAATTTACTTGC-----CTTTT	4524	
Lc3	1925	TTCTTTTCATTTTCTATATTTTTTTGGCGCATTT-----CTCTT	1961	
		* * * * * * *		
At3	3890	TCTGTTGCAAATAACTTTG--TATT---CAAGCT-CAAAGACTT-----	3927	
A13	3615	TCTTTTGCAAATGACTTAG--TATTATGCAAGCTGCAAAGACTTTTTTTTTTTTTTTTTC	3672	
Cb3	3816	TATTTTGCAAATTCATTTGTATATATGCAAGCT---GAGACTT-----	3856	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4525	TATTTTATAAAAATTACTT--TGTATGCAAACTGCGAAGACTT-----	4566	
Lc3	1962	TATTTTTCAATTAACTTTG--TGTATGCAAACTGCGAAGACTT-----	2003	
		* * * * * * *		
At3	3928	-----TCTTTTGGAAAGATC-TATTTGTTACCAAAGTAAA	3961	
A13	3673	TTTTTTCGAACATAGCTGCAAAGACTCTTTTGGAAAGATTAGTATTTGCGACCAAAGT-AA	3731	
Cb3	3857	-----TCTTCTGCAATATA--TATTTGCAACCAAAGTAAA	3889	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4567	-----TCTTTTGGAAAGCGTC-TGTTTGCACCAAATAA	4600	
Lc3	2004	-----TCTTATGGAAGATC-TCTTTGTGACC-----	2029	
		*** * * * * * *		

**DOF**

At3	3962	AACATCACAAGCAAATTTG <b>CTTT</b> TGGGAGAGTCCAAGGTTGACG-AAGAGAGTAGATA-	4019	
A13	3732	AATATCACAAGAAAATTTG <b>CTTT</b> TGGGAGAGTCCAAGGTTGAGG-AAGAGAGTAGATA-	3789	
Cb3	3890	AATATCACAAGAAAATTTG <b>CTTT</b> TGGGAGAGTCCAAGGTTGAGG-AAGAGAGTAGATA	3948	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4601	TA-ATCACAAGAAAATTTG <b>CTTT</b> TGGAAGAGTCCAAGGTTAAAGG-AAGAGACTAGGAAC	4658	
Lc3	2030	---ATCACAAGAAA-TG <b>CTTT</b> TGGAAGAGTCCAAGGTTAAGGCAAGAGAGTAGATA-	2084	
		***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
At3	4020	-----ACACATTTGCTGTTTCAACAATCTTGGTTCTGATTTACACAATCTAGCTCGAA	4070	
A13	3790	-----ACACATTTTCTGTTTCAACAATCTTGGTTCTGATTTACACAATCTAGAACGAA	3840	
Cb3	3949	CAGCAGTCCACACAATTTGCTGTTTCAACAATCTTGGTTCTGATTTACACAATGTAGCAGGAA	4008	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4659	AGCAGCC--ACACCTCCTCTGTTTCAACAATCTTGGTTCTGATTTGCAAAATCTAGCAGGAA	4716	
Lc3	2085	--AAATC--AAA-----CACAACTTGGTTCTGATTTACACAATCTATCATGAA	2129	
		* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
At3	4071	ATT-TCTGGTTAACATGCATAGCTTTGAGATCATTATACATA-----GCCAA--CTA	4120	
A13	3841	ATT-TCTGGTTAAAAT-----AATCATCTATACATA-----GCCAA--CTA	3878	
Cb3	4009	GTT-TCTAGTTGATAC---AGATTTGGGATCATTTTTGTATAT-----GCCAAGTATA	4057	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4717	AG--TTTGGTTAATAATAC-AGCTTTGGGATCATTCGTATACGCCAAGTGCCAA--GTA	4771	
Lc3	2130	AAATTTCTGATTAATAA---AGATTTGATATCATTTATACAT-----GTAAA--GTA	2175	
		* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		

**LFY LFY**

At3	4121	TATTG-----TTTATTT <b>CCAATG</b> ATCA <b>CCACTG</b> ----TATCCAACGCGCTGTGA----	4166	
A13	3879	TATTG-----TTCATTT <b>CCAAT</b> --TC <b>CAACTG</b> TATATATCCAACGCGCTGTGA----	3926	
Cb3	4058	TATTG-----TTTATTT <b>CTAGT</b> TTCT <b>CAACTG</b> TAT---TTCCTAGGCGCGGTGA----	4104	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4772	TATTG-----TTCATTT <b>CCAAT</b> --TT <b>CAACTG</b> TAT---TTCCAACTCGGTGTGAATGT	4820	
Lc3	2176	TATTGTATATATATATTT <b>CCAAT</b> --TT <b>CAACTG</b> TAT---TTCCAACGTGGTGTGACGA-	2228	
		***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
At3	4167	--TCCACTAACACATACTTGAGTA-----TATTTTGTCAACACTACTGTTTC----	4211	
A13	3927	--TCCACC-ACACATACTTGAGTA-----CATTTTGTCAACACTACTGTTTC----	3970	
Cb3	4105	--TCCACC-ACACATACTTGAGTA-----CTTTTGTCAACGTT-CTGTTTC----	4147	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4821	GATCCACAGATTCATACCTTGAGTAGTGATATTTGTTGGTCAACACTACTGTTTC----	4876	
Lc3	2229	-----CATAGTCGAGTA-----TTTTTGGTCAACATTATTACTTCAACG	2267	
		**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
At3	4212	-----ATCTTCTG---AAAATGTCTCA---TTGAGTATATCTATACACAT-	4251	
A13	3971	-----ATCTTCTG---AAAATTTCTCAT---TTGACTATATCTATACACAT-	4011	
Cb3	4148	-----ATCTTTTGACAAAAAAACTCA---TTGAGTTTATCTTTTATACATC	4192	<b>MÓDULO7</b>
Br3	4877	-----TTGTCCACAGATCCAAGAACCCTATACCATGTGAACCTAGAAATAATTAG-	4926	
Lc3	2268	AGACAAC <b>TACTAT</b> CACTAGACCCATCACTT <b>GATAACTT</b> CCTCAGCTT---CATGAGTCG-	2323	
		** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		

At3 4252 ----ACTTTTATAAGATAAAATGCAAAGTTTACA----- 4280  
 Al3 4012 ----ACTTTTATAAGAT-AATATAAAGTTTACA----- 4039  
 Cb3 4193 AAAGAGTTTCAAACATAAAATACAAAGCTTACA----- 4225  
 Br3 4927 ----TCCGTACCGAAATATTTGCTTATCTACGTATCGGGCCGGTTTGGGCATATAATAT 4982  
 Lc3 2324 ----CCTATGGTGGCATTAAAGAGATAACTTACCCTTGAG-----ATGTAACATA 2368

MÓDULO7

\* \* \* \* \*

At3 4281 -----CTAAGTCGTGCATT----- 4294  
 Al3 4040 -----CAAACCCGTGCATTATAGT-----AAACTAGACAGAA 4071  
 Cb3 4226 -----CAAGCTCGTGCATCTTATTTCTCTAAGATATAATCTTAAAGTAACCTACAAAGAA 4279  
 Br3 4983 TCCATCCAAAAGCCCAATCTCTGTTCCTCT----- 5013  
 Lc3 2369 GCTA--CTAATGCTTATTGT---TTCCTTCT----- 2394

\* \* \*

At3 4295 --TAACCTTTAGTGTTATGAATCAAATAGACCAATCTACATCTG----- 4335  
 Al3 4072 AATAACTCTAGTATTACGCATCATATAAACCAATCTACCTCTG----- 4114  
 Cb3 4280 GAAAAGTTTACTAGTATGCATCA-----AGTCTACCTCTA----- 4314  
 Br3 5014 --CGACTCTT--CTTGTTCATATATA--GTTAGGCCTTGTTCGCAAAGAACGCTAAAAC 5068  
 Lc3 2395 --TAGTTGTCGCCCTTCTTACCAT---GATGAGTTTTTCTCTGCTTGAGAA----- 2440

\* \* \* \* \*

At3 4336 TTTCTAACTAAACT-----TCAACACTTACAATTAAGAATCATTTGATAGCATTTTAC 4387  
 Al3 4115 TTTCTAACTAAACTC-----CCAACCTTACAATTAAGAATCATTAATAGCATTTTAC 4167  
 Cb3 4315 TTTCTAACTAAACTCCAAGTCTCCAACCTTACAATTAAGAAT-----CATTTTAC 4365  
 Br3 5069 CTTTTGACT-----AGCTAGAAATTTCTGAAAATAGTGAGAC 5104  
 Lc3 2441 TCTTTAACTA-----TACAATAAAGAATCCACATCACATTGGTA- 2479

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

LFY

At3 4388 A-CTGTTTCATATAAACCCCTTGAGCAAAAAAAAAA---GAAAAGGTAGTAGA**CCAATG**TTT 4443  
 Al3 4168 A-TTTTTTGAGATAAACCCCTTTAGCCCAAAAAA-----AAAAGGTATAGTA-**CATTG**TCT 4219  
 Cb3 4366 ATTTGTTTCAGATAAACCCCTTACCTAAAGAAT-----AGGCAACAGA-**TATTG**TCT 4416  
 Br3 5105 CAAGCAAGTAGATGGCTACTTG---TTAAACAACCTTTCCAATATGTTA---AGTGTAA 5157  
 Lc3 2480 -AAACAAGAACGAGGATTCAGAACCAAAAAAAAAAAGAATATGT-----**ATATTG** 2531

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

At3 4444 CAGTTCCTAATAATATGCAGGGGAAGAAAGCCCTGAGAATGAC-----AAAAAA-TAGCAC 4496  
 Al3 4220 CAGTTCAGTAATAATATGCAGGGGAAGAAAGCCGGAGAGCAAC-----AAAACC-TAGCAC 4272  
 Cb3 4417 CAGTTCAGTAATAATATGCAGGGGATAAAAGTCAAGAGCAAC-----AACACCTTAGCAC 4470  
 Br3 5158 TTTATCATCCAAGATTGATGCGGACCAAACTGGAAATGACCCCGTAGAAGCCAGGACCT 5217  
 Lc3 2532 CTTATTTGATAAAAATTAAT---AATACAGTGAAGAAAG---TGTAAGTGTATAAATAG 2583

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

At3 4497 TGTAATAACCTCATCAAAACTGGCAG-----AGATCTAT-AACA 4534  
 Al3 4273 TGTAATAACCTCATCAAAACTGGC-G-----AAATCTATAAACA 4310  
 Cb3 4471 TGTAATAACCTCATTTAAACTGGCGG-----AGATCGATAAACA 4509  
 Br3 5218 GAAGGAGAACATGTTAAAAGGTGCACGTGAAATAATAAGAAC-----AAGTTGTTGAACA 5272  
 Lc3 2584 TATAGGACCATATTTAAATTTATCCATAACATAATGGGACCCACCAATTTG----- 2636

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

At3 4535 ACTGACCGGTGAGCTGA-----ATCTTTA----- 4558  
 Al3 4311 ACTGACCTGTGAGCCGA-----ATCTTTA----- 4334  
 Cb3 4510 AATGCCCGGTGAGCCGAGG-----ATCTCTGTTACTGGTGGATATGGGGCCTTGCC 4561  
 Br3 5273 CGTGATCCCTTT-----GTTCTTTTTTGA----- 5297  
 Lc3 2637 CCTTGTCTTTTTGAAGTAAAAGAGAAGGTTTTATCCATGG----- 2676

\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

At3 4559 -----AGAAGAAGAGATGTTC-----A 4575  
 Al3 4335 -----AGAAGAAGA-----A 4344  
 Cb3 4562 CCTTCCAGTTAGAAGGCCTACAAAACAAGATGTGTCAA-----T 4601  
 Br3 5298 -----NGGATACTAGGTG-----TC 5312  
 Lc3 2677 -----CGGCGATTTAGCGCCAATGTCTTC 2702



## ALINEAMIENTO S4

### Alineamiento de los cDNAs de TCP7 y TCP21 para el diseño de una construcción RNAi contra TCP7.

En minúsculas aparecen las UTRs (según TAIR) y en mayúsculas la región codificante. Señalada en negrita, la secuencia clonada en el vector de RNAi.

TCP7	1	-----acaagccaagt	11
		. .... .  .	
TCP21	1	ctcaaatcattacctccttcttcttcttcttcttcttcttcttctcctcgaga	50
TCP7	12	<b>gagaaaaagaaaacactaaaccagatcgaaaaccATGTCTATTAACAAC</b>	61
		...   . ....                            .                . .. ..	
TCP21	51	<b>gagagttagatagtgataa-----cgaaatc-----ctaattccATG</b>	87
TCP7	62	<b>AACAACAACAACAACAAT-AACAACGATGGTCTTATGATCTCATCAA</b>	110
		.. .     .  .. .   . .. ....                          .	
TCP21	88	<b>GCCGACAACGACGG-AGCAGTGAGTAACGG-----CATCAT</b>	122
TCP7	111	<b>A--CGGAGCTTTAATCGAACAACAACCATC-AGTCGTTGTGAAGAAACCA</b>	157
		..... .     ..... .   ... .. . .	
TCP21	123	<b>AGTC-GAGCAGACGTCAAACAAAGGACCTCTTAACGCCGTTAAGAAACCA</b>	171
TCP7	158	<b>CCGGCGAAAGATCGACATAGCAAAGTCGATGGAAGAGGGAGAAGAATCCG</b>	207
		. .     ..... .     ..... .  .     ..... .     .  .	
TCP21	172	<b>CCGTCTAAAGATCGACACAGCAAAGTTGACGGAAGAGGAAGAAGGATTCG</b>	221
TCP7	208	<b>TATGCCGATTATATGTGCTGCTCGTGTTCAGCTAACGAGAGAGCTTG</b>	257
		.   .   .   .     .     ..... .  .     .  .	
TCP21	222	<b>TATGCCAATCATTGCGCAGCTCGAGTTTTCAATTGACCAGAGAGTTAG</b>	271
TCP7	258	<b>GTCATAAGTCAGATGGCCAACAATGAATGGTTACTTCGTCAAGCAGAG</b>	307
		.     .     .     .   .   .   .     ..... .	
TCP21	272	<b>GTCACAAGTCCGATGGTCAAACCATAGAGTGGCTTCTCCGTCAAGCTGAG</b>	321
TCP7	308	<b>CCTTCTATTATAGCTGCAACAGGAAGTGGTACAACCTCCAGAGTTTCTC</b>	357
		..... .     .   .     ..... .  .     .	
TCP21	322	<b>CCTTCTATCATAGCCGCACTGGAAGTGGCACTACTCCGGCGAGTTTCTC</b>	371
TCP7	358	<b>AACTGCTTCTGTCTCTATCCGTGGAGCCACCAATCTACTTCTTTAGATC</b>	407
		.	
TCP21	372	<b>CACTGCTTC--TCTCT-----</b>	385
TCP7	408	<b>ATAAACCCACTTCTTTACTTGGTGGTACGTCACCGTTTATACTTGGGAAA</b>	457
		.     ..... .  .	
TCP21	386	<b>-----CCACTTCT-----TCTCCGTTTACTTCTCGGGAAA</b>	414

TCP7	458	CGT---GTTAGAGCTGATGAGGATAGTAATAATAGTC-----ATAATCAT	499
		.     .   . .  . ..... .  .  . . .  .	
TCP21	415	CGTGTCGT CAGAGCGGAGGAAGG-AGAATCCGGCGGCGGAGGAGGAGGAG	463
TCP7	500	AGTT--CTGTTGG--TAAAGATGAGACCTTTACGACAAC-----	534
		.     .   .    . . .     . .      . . .  .	
TCP21	464	GGTTAACAGTGGGACACACAATGGGGACTT--CGTTAATGGGTGGTGGTG	511
TCP7	535	-ACCAGCTGGGTTTTGGGCTGTTCGGCGAGGCCGGATTTTGGACAAGTT	583
		. . . .                               .       .  .	
TCP21	512	GTTCTGGTGGGTTTTGGGCTGTTCGGCGAGGCCGGATTTCCGACAAGTC	561
TCP7	584	TGGAGTTTTGCT---GGAGCTCCACAAGAGATGTTTTTACAACAACAACA	630
		.     .  .          . . . . .  .    ..... . . .  .	
TCP21	562	TGGAGCTTTGCAACCGGAGCTCCACCGAAATGGTTTTTGCAGCAGCAGCA	611
TCP7	631	TCATCATCAGCAACCATTGTTTGTTCATCAGCAACAGCAACAACA-----	675
		. . .  .    . .  .    . . . . . . .  .  .       .  .	
TCP21	612	GCAAC--CAGCTA-CACTCTTCGTCGCCACCAGCAGCAACAGCAAGCTT	658
TCP7	676	----- <b>AGCTGCAATGGGTGAAGCTTCTGCTGCTAGAGTTGGG</b>	712
		.  .    .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	659	CCGCCGCCGAGCAGCTGCAATGGGTGAGGCTTCAGCAGCTAGAGTTGGG	708
TCP7	713	<b>AATTATCTTCCGGGTCATCTT---AATTGCTTGCTTCTTTATCCGGTGG</b>	759
		.  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	709	AATTATCTTCCGGGTCATCATCTCAATTGCTTGCTTCTTTGTCTGGTGG	758
TCP7	760	<b>ATCTCCCGGGTCGGATCGAAGAGAGGAAGATCCACGTTAAtggtttaagc</b>	809
		.  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	759	AGCTAACGGGTCGGGTCGGAGGGAAGACGA-CCACG-----AACC	797
TCP7	810	<b>ccttttaggtttgagggcaaaatttggtatatatatttattatcttctct</b>	859
		. .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	798	ACGTTGAg-----aaatgg-----tattgtctt---t	821
TCP7	860	<b>tctctattgttgtcattgtttctctatgtgtgtgttttagtgttgtaga</b>	909
		.  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	822	ttggtaatgtatagaaaaattc-ctatg-----ttttatgtc-atcga	862
TCP7	910	<b>gattgatttggtttcagaatctctgcaagtgatttgagagttttcgtag</b>	959
		. .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .  .	
TCP21	863	aagtgttag---aaagtacctc-----taatttgagg--tttcttttg	901









Como todo en Ciencia y yo también creo que todo en la vida, este trabajo no ha sido individual, así que aprovecho para agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han colaborado o me han apoyado en la realización de esta Tesis Doctoral.

Empezando por los agradecimientos científicos, me gustaría dar especialmente las gracias al Dr. G. Angenent y Dr. M. Kater, los investigadores principales de los dos laboratorios en los que realicé una parte de los experimentos aquí mostrados y a los Doctores J.A. Darós y C. Helliwell por su predisposición a ayudarnos en la realización de algunos experimentos en los que carecía de los conocimientos y experiencia necesarios. Mi agradecimiento al Dr. Carlos Giménez por ayudarme a iniciar el trabajo con TCP7 durante su estancia en el IBMCP. Además, también quiero agradecer a la Dra. R. Schmidt y al Dr. D. Baum por habernos facilitado algunas de las secuencias que utilizamos en el capítulo 2 y al Dr. J.L. Micoll y a la Dra M.R. Ponce por el mapeo de la mutación *moss*. Por último, mi agradecimiento a los tres evaluadores externos de esta Tesis, Dra. P. Cubas, Dr. D. Bradley y Dr. F. Parcy por haber querido colaborar desinteresadamente en la correcciones y por su ayuda para que todo se hiciera de forma eficiente para poder estar dentro de los plazos burocráticos.

Este trabajo ha podido realizarse gracias a todas las instituciones que han financiado los distintos proyectos de nuestro laboratorio. Además, quiero agradecer especialmente a todas aquellas instituciones que me han financiado a mí. La fundación Ana Royo, al programa de becas predoctorales I3P del CSIC y la Unión Europea, a la Universidad Politécnica de Valencia y muchas gracias al INEM y a todos aquellos que han podido hacer realidad que los becarios tengamos derecho a la prestación por desempleo, lo que nos ha permitido a muchos terminar el doctorado sin pasar penurias.

Después de estos formalismos necesarios, mis más sinceros agradecimientos a mucha gente. Empezamos con los jefes.

En primer lugar al "Montero", mi profesor de ciencias durante la secundaria que fue el que me inculcó el gusanillo por este mundo. También muchas gracias a muchos de los profesores de la Facultad de Biología de la UV por haberme continuado alimentando dicho gusanillo.

Mil gracias a Lourdes, que fue la que me dio la primera oportunidad de cacharrear en un laboratorio, no te puedo pagar todo lo que hiciste por mí.

Como no, el principal agradecimiento es para Paco, por brindarme la oportunidad de hacer una tesis y por todo este tiempo siendo mi jefe. Has sido un jefe excepcional y mucha mejor persona. He aprendido que es importante que un científico a parte de Ciencia sea humano y tú eres de esos, que por cierto, no abundan mucho. En tantos años trabajando juntos hemos tenido algún momento de tensión, pero eso, puntual. Muchas gracias por todo.

Muchas gracias para Cristina, que has sido mucho más que la jefa del labo de al lado. Gracias por ver siempre la botella medio llena y por tus ánimos. Al igual que le digo a Paco, gracias por tener ese lado humano que a veces tanto se echa en falta en este mundo.

Gracias también a Des, porque siempre has estado dispuesto a escuchar, porque si no es por ti no hablo ni papa de inglés y porque siempre creías que lo que estaba haciendo era interesante.

A Simona y Richard, por lo bien que me acogieron en sus laboratorios, por lo mucho que me enseñaron y porque me aguantaron. Un placer haber trabajado con vosotros.

Muchas gracias a J. A. Darós por tu predisposición a escucharme siempre que he necesitado una opinión técnica y por esas semanas que me acogiste en tu laboratorio (y por la paciencia que tuviste que tener para enseñarme). Muchas gracias también a R. Serrano por estar siempre accesible al escalafón más bajo.

Gracias a todos los servicios del IBMCP con los que he interactuado, pero en especial muchas gracias a las microscopistas (MD primero y Marisol después) por todos los favores que me habéis hecho y lo que me habéis enseñado. A Santiago por ser un cachondo y sobre todo a Eugenio, por lo bien que te has portado siempre conmigo, tu profesionalidad y por esos ratos de humor negro y ácido que hemos despachado.

Mil gracias a Sergio y Savi. Por acogerme y mantenerme durante medio año. Sin vuestra ayuda quién sabe cuándo y cómo habría acabado. Y sobre todo gracias por subirme la moral, me sentí muy valorado trabajando para vosotros y además me enseñasteis que hay vida más allá de Arabidopsis. Muchas gracias también a Manolo y como no, a Bego, por ser mis compañeros en Agrónomos y por recibirme con los brazos abiertos.

Por último, muchas gracias a Antonio y la gente de su laboratorio por haberme acogido estos últimos meses en Barcelona. Se agradece un café y unas risas con alguien cuando acabas de llegar a un sitio nuevo y no conoces a nadie. También gracias a mis compañeros de comidas del laboratorio de Elena en Barcelona.

Y siguiendo con los agradecimientos, no sé cómo hacerlo a los que me habéis ayudado, formado e

incluso sufrido. Que tanto tiempo pasado juntos hace que os considere parte de mi familia, al igual que vosotros me consideraréis a mí. Ha sido un enorme placer trabajar con vosotros. Empezando por la más importante: Majo, más de dos tercios de esta Tesis son tuyos y ya llevas dos doctorados (con sendos personajes) has sido mi compañera de batalla y muchas veces has ejercido de madre. Ana, por tu vitalidad y porque mitad de lo que sé me lo has enseñado tú. Antoñete, tú me has enseñado la otra mitad y además con el tiempo, desde que no sabían si presentarnos porque te irías enseguida, hasta ahora, nos hemos hecho grandes amigos. Haber trabajado con vosotros tres es lo clave de sobrevivir a 6 años de tesis sin morir en el intento. Dudo que en algún sitio encuentre unos compañeros de vuestra talla. Y como no, aunque legalmente no sois de nuestro laboratorio, mención especial para otros dos grandes amigos que los uno a los tres de antes, Vicente y Marina. Vicente, qué gusto llegar de buena mañana al labo y encontrarte siempre con una sonrisa y una frase con segundo sentido. Si me he levantado todas estas mañanas para ir a trabajar ha sido con la ilusión de llegar y juntarme contigo, el Antoñito y Jorge y ponernos a rajar de todo y de todos. Las comidas han sido muy grandes (como siempre, pensarás otra cosa al leerlo). Sobre Marina, otra que te la encuentras y te alegra el día, esa risa es la caña y se te echa mucho de menos, que fuiste la primera en irte. También gracias a todos los que más tarde o temprano os incorporasteis a nuestros laboratorios, en especial a Jose Alfredo que siempre vas con una sonrisa por ahí, a Ale, muy grande y a las dos alumnas que tuve a mi servicio un verano y que tanto me ayudaron, Lidia y Estefanía. Y como no, a nuestro laboratorio hermano, en especial a Carol y Chloè que son con las que más he convivido. Por último, gracias a Luis y Carmencita por lo bien que me acogisteis en Milán y por seguir siendo mis amigos.

Ahora viene lo problemático, he pasado tantos años en el IBMCP y he tratado con tanta gente que se me olvidarán más de la mitad. Perdonadme.

Jorge, muchas gracias por ser uno de mis mejores amigos. Esta etapa de mi vida va pegada a tu amistad. Por ti, hasta me siento valenciano (con las salvedades discutidas). Y respecto a ti, Mar, te conocí antes, siendo una gran amiga y estos últimos años, pues también has pasado a formar parte de mi vida valenciana. Cuidaos mucho los dos y os echaré de menos lo que no está escrito.

Dieguete, junto con Jorgito has sido mi otro gran compañero de viaje durante estos años en el IBMCP y en Valencia. Qué buenos ratos hemos pasado y que sigamos manteniendo la amistad pese a la distancia.

Kapa, Hugo y Emilio. Los que faltaban. Todos juntos somos ese Consejo que me ha hecho tan feliz todos estos años. Alguna vez he perdido un tren porque me ha dado envidia irme con la que se estaba montando. Hace ya algún tiempo que echo de menos esas cervezas y risas consejeras en algún bar de Benimaclet. Qué pena que el tiempo tenga que pasar. Cuando estoy depre y os recuerdo a todos riendo me animo (aunque también reconozco que se me cae una lágrima). Tampoco quiero olvidarme de la Dra Sandra Patricia, que antes te conocía más como la novia del Kapa y que últimamente he tenido la suerte de descubrir que eres mucho más que eso (qué por sí solo, ya es).

Otra persona muy especial para mí por todo lo que me ha ayudado (científicamente y buracráticamente) y que ha sido un gran consejero. Además, he tenido la suerte de hacerme amigo por el camino. Pako, un abrazo muy fuerte.

Y como decía, sois muchos, pero mil gracias a los Serranos por acogerme y sacarme a pasear en mis inicios. Carlos, Edu y Santi, es cierto que últimamente no tenemos tanto contacto pero que sepáis que os aprecio una barbaridad.

Y por haberme ayudado siempre que os he necesitado y sobre todo por ser de esa gente con la que se pueden echar unas risas gracias a J. Gallego, J. Lozano y Laura Y. y como no, a Steph!

Por último, gracias también a la gente del ex L10 por todo lo que me habéis enseñado y muchas gracias a mis amigas las malotas (en especial Mini-Bego), por amenizar las comidas en la salita con vuestro inconfundible sentido del humor.

También me quiero acordar de todos los amigos que desde fuera del trabajo habéis hecho que esta casi media vida pasada en Valencia haya sido la mejor etapa de mi vida. A los de la carrera (Miguel y Domingo), a los de fuera (muchas gracias a todos los de natación del Poli que me habéis ayudado tanto a desconectar) a los de toda la vida, los albaceteños (Pablo, Fito, Jesús, Juanfer, Piñe, Paco, Salva, Karlos...) y sobre todo gracias a Juanjo y muy especialmente gracias a Emilio, tu amistad es de lo mejor que me llevo de Valencia y lo mejor de todo es que continúa.

Y como no, gracias a mi familia. Soy lo que soy por mis padres, mi hermana y Angelita y si he ganado algo por el camino ha sido gracias a mi otra familia (que suerte tener dos, o que sean la misma). A mis tíos Paulino, mi tía Pilar y mis primos Pau y M. Ángeles. Sois para mí unos padres y hermanos.

Para terminar, a quien me ha apoyado en todo estos últimos años en todos los aspectos de la vida. Muchas gracias Ele por ser el sol que está siempre a mi lado y por compartir tu vida conmigo. Sin tus ánimos no muchas cosas habrían costado mucho más.









UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA