

# TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Análisis de la conexión entre la formación de las flores y el estrés abiótico (ABA) a través de  
*TERMINAL FLOWER 1*



CAROLINA GARCÍA GARCÍA

**Tutor:** Francisco Madueño Albi

**Directora Experimental:** Ana Berbel Tornero

Mayo 2021

## AGRADECIMIENTOS

Este camino de casi dos años llega ya a su fin, y a pesar de haber estado lleno de imprevistos, (porque no sé qué esperaba exactamente de mi paso por el IBMCP, pero tener que hacer un TFM en el medio de una pandemia no se me había pasado por la cabeza) ha estado también lleno de ilusión y alegrías. Y sin duda esta sensación tan positiva que me llevo no habría sido posible sin muchas personas que habéis caído en mi camino, y por las que estoy eternamente agradecida. A todos y todas, gracias de corazón.

Para empezar, quiero darte las gracias Paco, por haber confiado en mí y haberme acogido con tanto cariño en tu laboratorio. Gracias por tu tranquilidad, por supervisarme con tanto interés y por tus palabras de ánimo. Esta experiencia me ha dado mucho más que ciencia, y el buen rollo que se tiene en el laboratorio es sin duda gracias a ti. No podría haber tenido un mejor tutor.

Por supuesto, darte las gracias Ana, mi directora experimental. Has sido mi faro y mi ancla durante estos meses, cuando las cosas salían bien y cuando no salían como esperábamos. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy de haberte tenido enseñándome, pero lo voy a intentar. Gracias por tu dedicación, por enseñarme lo que es trabajar de verdad en un laboratorio, pero sobre todo, por el mimo y el cuidado que pones a todo lo que haces. Por enseñarme y motivarme, por haber hecho que los más imprevisibles contratiempos se acabaran convirtiendo en nimiedades, por haber cuidado tanto de mí. Cualquiera que haya tenido la enorme suerte de estar bajo tu tutela sabe de lo que hablo. Espero llevarme un pedacito de ti conmigo, y ojalá poder ser lo que has sido para mí algún día para alguien.

Agradecer también a mis compañeros de labo, por hacerme sentir en casa. A Jesús, por abrir un pedacito de estantería para mí en mi primer día, por todas las veces que me has ofrecido tu tiempo para ayudarme o enseñarme, por hacerme sentir parte de tu equipo; a Majo, por tu optimismo y cariño, por preocuparte tanto de mí y prestarme ayuda sin tener apenas que pedirla; y a todos los compañeros del 1.09, gracias por los cafés, por todas vuestras palabras de ánimo, por todas las veces que me habéis echado un cable. Habéis sido unos compañeros estupendos.

Y no todo ha sido ciencia estos años. Gracias a esos compañeros de máster, que habéis hecho que mi paso por Valencia me deje con ganas de más. Todo el buen rollo que hemos tenido ha sido la guinda, y espero llevarme algunas amistades para toda la vida.

Cierro ya este capítulo, sabiendo que gracias a todos vosotros he crecido como científica y como persona, y que esta historia no se podría haber escrito sin vosotros. En cierto modo, este TFM no es solo mío, todos vosotros lleváis un pedazo de esta experiencia. Así que lo repetiré una vez más. Gracias.

Carolina

## RESUMEN

La arquitectura de la planta se define como la disposición tridimensional que adoptan los órganos de la planta tras su proceso de crecimiento y diferenciación. Esta conformación es de vital importancia para la ecología de las plantas y su interacción con el entorno que las rodea.

En el caso de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, todos los órganos formados en la parte aérea, excepto los cotiledones, van a derivar del meristemo apical del tallo (SAM, *Shoot Apical Meristem*). Este desarrollo se divide en dos fases: fase vegetativa, en la que el meristemo vegetativo produce una roseta de hojas sin elongación de los entrenudos; y la fase reproductiva, en la que comienza a producir flores en vez de órganos vegetativos. El cambio de una a otra se conoce como “transición floral”, y va a ser un proceso crucial para la supervivencia y el éxito reproductivo de la planta. Como tal, se encuentra regulado tanto por señales endógenas como por señales exógenas, asegurando que este proceso tenga lugar en condiciones adecuadas.

Durante la transición floral, el SAM adquiere identidad de meristemo inflorescente, entrando en la fase de desarrollo reproductivo y dando lugar a la inflorescencia. Cuando la floración se activa por la vía del fotoperiodo la regulación la llevan a cabo, entre otros, dos genes integradores clave: *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Ambos genes dan lugar a proteínas de la familia PEBPs, pero con funciones opuestas. Mientras que *FT* promueve la floración e induce genes de identidad floral; *TFL1* reprime floración, controlando así la identidad espacial del meristemo, así como la fase de transición.

La función molecular de *TFL1* aún no está del todo clara. En experimentos previos llevados a cabo en este laboratorio, se identificaron mediante ChIP-seq distintos genes diana de *TFL1*, siendo varios de ellos componentes de la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA). La relación entre la floración y el ABA no es desconocida; sin embargo, la contribución exacta del ABA a la transición floral es controvertida, ya que se han observado tanto papeles positivos como papeles negativos.

No obstante, hasta ahora no se había relacionado a *TFL1* con el ABA, lo cual genera varias preguntas. En este Trabajo de Fin de Máster hemos intentado profundizar en la interacción entre *TFL1* y diferentes genes de la ruta de señalización del ABA. Para ello, hemos analizado cómo *TFL1* afecta a la expresión de estos genes diana; también hemos analizado mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión de algunos de estos genes para estudiar su posible contribución a los procesos de desarrollo controlados por *TFL1*.

## ABSTRACT

Plant architecture is defined as the tridimensional spatial disposition of plant organs after their development and differentiation. This arrangement plays a key role in the ecology of plants and their interaction with the environment that surrounds them.

In the model plant *Arabidopsis thaliana* every organ formed in the aerial part, besides cotyledons, are derived from the SAM (Shoot Apical Meristem). Its development can be divided in two phases: the vegetative phase, when the vegetative meristem produces leaves in a rosette with little elongation of the internodes; and the reproductive phase, when it starts producing flowers instead of vegetative organs. The switch between them is known as “floral transition”, and it will be a crucial step for survival as well as for the reproductive success of the plant. Thus, this process is regulated by a plethora of signals, both endogenous and exogenous, making sure the process takes place in suitable conditions.

During floral transition, the SAM becomes an inflorescence meristem, entering the phase of reproductive development and giving rise to the inflorescence. When flowering is activated through the photoperiodic route the genetic regulation is carried by two key integrators: *FLOWERING LOCUS T (FT)* and *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Both genes translate into proteins of the PEPBs family, but with opposite functions. While *FT* promotes flowering and induces floral identity genes; *TFL1* represses flowering, controlling the spatial identity of the meristem, as well as the transition phase.

The molecular function of TFL1 is not yet well understood. In previous experiments carried out in this laboratory, some target genes of TFL1 were identified through a ChIP-seq analysis, some of them being part of the abscisic acid (ABA) signaling pathway. The relationship between ABA and flowering is not unheard of; however its exact contribution is still poorly understood, since it has been recorded to have both positive and negative roles related to flowering regulation.

Nevertheless, the connection between TFL1 and ABA has not been studied yet, which opens the door to some interesting questions. In this Master Thesis we aimed to deepen the knowledge about the interaction between TFL1 and its target genes from the ABA signaling pathway. In order to do so, we analyzed how TFL1 affects the expression of its target genes; we also analyzed loss of function mutants and overexpression lines of some of these genes to study their possible contribution to development processes regulated by TFL1.

## TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	1
La floración y la arquitectura de la planta .....	1
Los genes <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i> y <i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i> y la floración ..	2
Modo de acción de TFL1 y su relación con la ruta de señalización de ABA .....	6
MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
1. Material biológico .....	9
1.1. Material vegetal .....	9
1.1.1. Líneas mutantes .....	9
1.1.2. Líneas transgénicas .....	9
1.1.3. Cultivo de Arabidopsis en el invernadero .....	10
1.1.4. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i> .....	10
1.2. Material bacteriano .....	10
1.2.1. Cultivo de bacterias <i>in vitro</i> .....	11
1.2.2. Conservación de los microorganismos en glicerol .....	11
2. Métodos de biología molecular .....	12
2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos .....	12
2.1.1. Extracción de DNA plasmídicos de <i>E. coli</i> .....	12
2.1.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>A. tumefaciens</i> .....	12
2.1.3. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis .....	12
2.1.4. Extracción de RNA total de Arabidopsis .....	12
2.2. Manipulación de ácidos nucleicos .....	13
2.2.1. Síntesis de cDNA .....	13
2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	13
2.2.3. Purificación de fragmentos de DNA .....	14
2.2.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) .....	14
2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	15
2.3. Generación de las líneas de sobreexpresión .....	15
2.3.1. Vectores plasmídicos utilizados .....	15
2.3.2. Construcciones plasmídicas utilizadas .....	16

2.3.3. Obtención de construcciones .....	17
2.4. Secuenciación Sanger .....	18
2.5. Generación de organismos transgénicos .....	18
2.5.1. Transformación de bacterias .....	18
2.5.2. Generación de plantas transgénicas de Arabidopsis.....	18
2.5.2.1. Transformación de Arabidopsis .....	18
2.5.2.2. Selección de plantas transgénicas .....	18
3. Análisis fenotípico de las plantas mutantes y líneas transgénicas .....	19
3.1. Fotografía a bajo aumento .....	19
3.2. Técnicas microscópicas para el análisis del tamaño de semillas .....	19
4. Análisis bioinformáticos .....	19
4.1. Análisis de secuencias .....	19
4.2. Análisis estadísticos .....	19
RESULTADOS .....	21
1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE</i> <i>SYNTHASE 1 (P5CSI)</i> .....	21
1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>P5CSI</i> .....	21
1.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>P5CSI</i> .....	22
1.2.1. Identificación y análisis del mutante <i>p5cs1</i> .....	22
1.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>P5CSI</i> .....	24
2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>HOMEOBOX 12 (HB12)</i> .....	26
2.1. Análisis del patrón de expresión de <i>HB12</i> .....	26
2.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>HB12</i> .....	27
2.2.1. Identificación y análisis del mutante <i>hb12</i> .....	27
2.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>HB12</i> .....	28
3. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>HOMEOBOX-LEUCINE ZIPPER 16 (HB16)</i> .....	29
3.1. Análisis del patrón de expresión de <i>HB16</i> .....	29
3.1.1. Análisis del patrón de expresión de <i>HB16</i> usando transcriptomas disponibles en bases de datos .....	29

3.1.2.	Análisis del patrón de expresión de <i>HB16</i> mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo .....	31
3.1.3.	Análisis del patrón de expresión de <i>HB16</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR .....	31
3.2.	Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>HB16</i> .....	32
3.2.1.	Identificación y análisis del mutante <i>hb16</i> .....	32
3.2.2.	Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>HB16</i> .....	33
4.	CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>ABI5 BINDING PROTEIN 2 (AFP2)</i> .....	36
4.1.	Análisis del patrón de expresión de <i>AFP2</i> .....	36
4.1.1.	Análisis del patrón de expresión de <i>AFP2</i> usando transcriptomas disponibles en bases de datos .....	36
4.1.2.	Análisis del patrón de expresión de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo .....	37
4.1.3.	Análisis del patrón de expresión de <i>AFP4</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR .....	38
4.2.	Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>AFP2</i> .....	39
4.2.1.	Identificación y análisis de los mutantes <i>afp2</i> .....	39
4.2.2.	Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>AFP2</i> .....	41
5.	CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>ABI5 BINDING PROTEIN 4 (AFP4)</i> .....	43
5.1.	Análisis de expresión de <i>AFP4</i> .....	43
5.2.	Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>AFP4</i> .....	45
5.2.1.	Identificación y análisis de los mutantes <i>afp4</i> .....	45
5.2.2.	Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>AFP4</i> .....	46
6.	CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>G-BOX BINDING FACTOR 3 (GBF3)</i> .....	48
6.1.	Análisis del patrón de expresión de <i>GBF3</i> .....	48
6.1.1.	Análisis del patrón de expresión de <i>GBF3</i> usando transcriptomas disponibles en bases de datos .....	48
6.1.2.	Análisis del patrón de expresión de <i>GBF3</i> mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo .....	50
6.1.3.	Análisis del patrón de expresión de <i>GBF3</i> en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR .....	50

6.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a <i>GBF3</i> .....	51
6.2.1. Identificación y análisis del mutante <i>gbf3</i> .....	51
6.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de <i>GBF3</i> .....	53
DISCUSIÓN .....	59
CONCLUSIÓN .....	63
REFERENCIAS .....	65
ANEXO .....	71



## INTRODUCCIÓN

### La floración y la arquitectura de la planta

Se define la arquitectura de la planta como la disposición tridimensional que adoptan los diferentes órganos de la planta tras su proceso de crecimiento y diferenciación. Para la parte aérea de la planta esto se refiere al crecimiento de las ramas, así como al número, tamaño, forma y posición de las hojas y las flores. Tal es la importancia de esta disposición que ha sido ampliamente utilizada como un criterio para clasificar e identificar plantas (Reinhardt y Kuhlemeier, 2002). Los órganos de la parte aérea de la planta, excepto los cotiledones, derivan del meristemo apical del tallo (SAM por sus siglas en inglés *Shoot Apical Meristem*), en el que se distingue una zona central con lenta tasa de división celular, cuya función es el mantenimiento del propio meristemo, y una zona periférica, con tasa de división celular elevada, donde se forman los primordios de los distintos órganos laterales y de los meristemos axilares, órganos cuya naturaleza varía en función de la fase de desarrollo de la planta (Bowman, 1994; McGarry y Ayre, 2012; Serrano-Mislata *et al.*, 2016).

La planta modelo *Arabidopsis thaliana* tras la germinación atraviesa dos fases de desarrollo: la fase vegetativa y la fase reproductiva. En la fase vegetativa el SAM genera una roseta de hojas, como consecuencia de la producción reiterada de hojas en sus flancos sin elongación de los entrenudos entre ellas (Bowman, 1994; Irish, 2010). En la fase vegetativa, se pueden diferenciar dos etapas en función de la disposición de las hojas, la forma, el tamaño y la distribución de los tricomas en las mismas. En la primera, la fase vegetativa juvenil, las hojas se inician en parejas opuestas y son pequeñas, redondeadas y sin tricomas en el envés. En la segunda fase, la vegetativa adulta, las hojas, que se inician siguiendo una espiral, son más grandes, alargadas y con tricomas tanto en el haz como en el envés (Reinhardt y Kuhlemeier, 2002; Fouracre y Poethig, 2019). Durante la fase juvenil, aunque las condiciones sean las adecuadas, la planta no es capaz de florecer. Solo podrá hacerlo una vez haya alcanzado la fase adulta.

El paso de la fase de desarrollo vegetativo a la de desarrollo reproductivo, con producción de flores en lugar de órganos vegetativos, se denomina transición floral (Bäurle y Dean, 2006) y es un proceso altamente regulado tanto por señales exógenas (temperatura, fotoperiodo, calidad de luz) como por señales endógenas (edad de la planta, fondo genético, niveles de sacarosa o de distintas fitohormonas) asegurando, de este modo que la floración se produzca cuando las condiciones ambientales sean favorables y se hayan acumulado las reservas internas (Bäurle y Dean, 2006; Fornara y Coupland, 2009; Amasino, 2010; Huijser y Schmid, 2011; Romera-Branchart, M. *et al.*, 2014)

Arabidopsis es una planta anual facultativa de día largo (LD, por sus siglas en inglés *Long Day*) lo cual quiere decir que florece una sola vez en su ciclo vital y que lo hace antes cuando crece en condiciones de día largo, pero que también es capaz de florecer en condiciones de día corto (SD, por sus siglas en inglés *Short Day*) (Gregory y Hussey, 1953; Amasino, 2010; Andrés y Coupland, 2012). Los mutantes que afectan al tiempo de floración son fácilmente reconocibles, ya que aquellos que florecen de forma tardía producen más nodos vegetativos y, por tanto, más hojas antes de producir la primera flor que las plantas del genotipo silvestre; por el contrario, los mutantes que florecen de forma temprana producen menos hojas (Amasino, 2010).

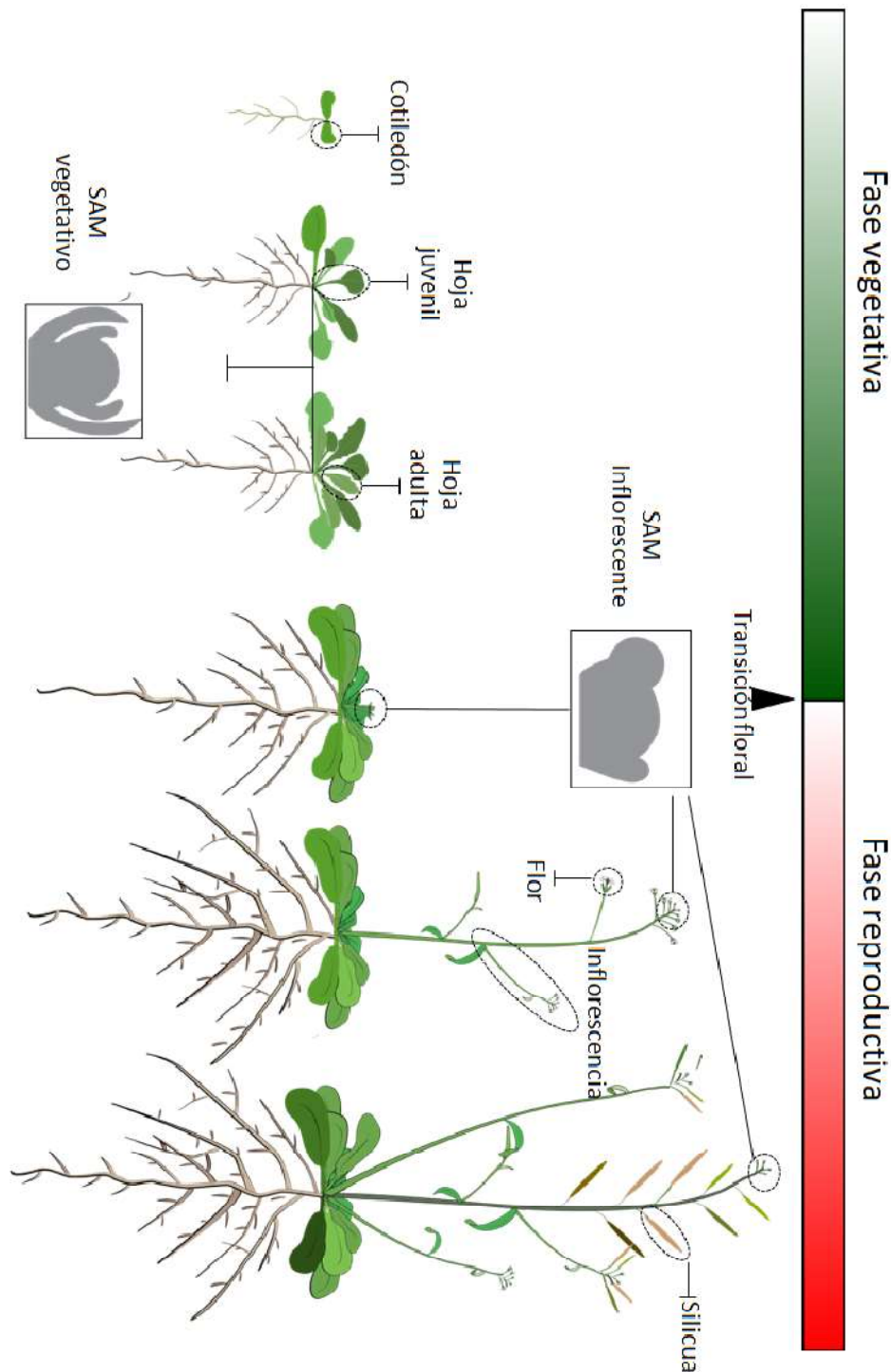
Como consecuencia de la transición floral, el SAM adquiere la identidad de meristemo inflorescente y la planta entra en la fase de desarrollo reproductivo que da lugar a la inflorescencia, la parte de la planta en la que se localizan las flores (Benlloch *et al.*, 2007). Durante la fase de desarrollo reproductivo de Arabidopsis se pueden diferenciar dos fases (Coen y Nugent, 1994; Irish, 2010). En la primera, conocida como fase de inflorescencia temprana, el meristemo inflorescente genera en sus flancos hojas caulinares, en cuyas axilas se inician nuevos meristemos inflorescentes; en la segunda fase, llamada inflorescencia tardía, el meristemo inflorescente genera en sus flancos flores no sustentadas por hojas. Seguido a la producción de hojas caulinares y de las primeras flores en la inflorescencia principal, se produce un cambio morfológico muy evidente, el “*bolting*” o elongación del tallo de inflorescencia, como consecuencia de un incremento en la longitud de los entrenudos que genera la separación de las hojas caulinares de las hojas de roseta que permanecen en la base del tallo (Bowman, 1994; Meverowitz y Somerville, 1994).

La inflorescencia de Arabidopsis es indeterminada, ya que el meristemo apical del tallo continúa produciendo lateralmente flores a lo largo de la vida de la planta. De los meristemos formados en las axilas de las hojas caulinares se generan ramas secundarias llamadas coflorescencias, con un patrón de crecimiento similar al de la inflorescencia principal. Desde las axilas de las hojas de roseta también pueden desarrollarse inflorescencias secundarias, una vez se ha formado la inflorescencia principal (**Figura 1**; Álvarez *et al.*, 1992).

### **Los genes *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* y la floración**

Cuando la floración se activa por la vía del fotoperiodo, uno de los genes integradores claves que se inducen es *FLOWERING LOCUS T (FT)*. La luz percibida por los fitocromos y el ciclo circadiano activan la expresión de *CONSTANS (CO)*. CO codifica un factor de transcripción capaz de interactuar con el promotor de FT (Tiwari *et al.*, 2010; Golembeski *et al.*, 2014), induciendo su expresión en el tejido vascular de las hojas, en las células acompañantes del floema, en condiciones de LD. Los mutantes *ft* presentan floración tardía en condiciones de LD; por el contrario, las plantas transgénicas que sobreexpresan FT tienen floración temprana tanto

en LD como en SD (Kobayashi y Weigel, 2007; Xu *et al.*, 2012; Romera-Branchat *et al.*, 2020). Este gen, además, se encuentra bastante conservado y posee homólogos en muchas angiospermas (Jin *et al.*, 2021).



**Figura 1. Fases del desarrollo en *Arabidopsis*.** Tras la germinación, *Arabidopsis* comienza una fase de crecimiento vegetativo juvenil caracterizada por la formación de hojas redondeadas, con tricomas en la cara adaxial; tras pasar a la fase vegetativa adulta, las hojas producidas son alargadas y levemente serradas. En ambas fases las hojas se producen sin elongación del tallo; que tiene lugar cuando comienza la transición floral. Al iniciar el crecimiento reproductivo la planta deja de producir hojas para generar

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

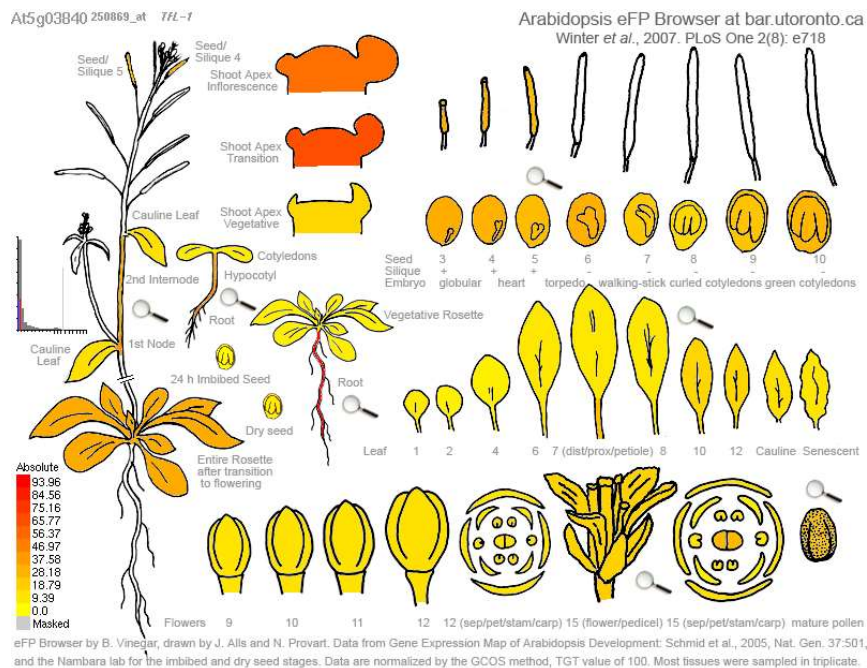
Cómo FT lleva a cabo exactamente su función es aún un tema de debate. Se sabe que FT se expresa en las hojas, dando lugar a una proteína de la familia de proteínas de unión a fosfatidietanolamina (PEBPs) (Zhu, *et al.*, 2021) la cual es capaz de moverse sistémicamente desde las células acompañantes del floema hasta el SAM a través del floema. Debido a esta capacidad de movimiento, que conduce a la activación de la floración, la proteína FT es referida como florígeno (Liu *et al.*, 2013). Una vez que llega al SAM, FT actúa como cofactor de transcripción en un complejo de activación floral o FAC que incluye proteínas 14-3-3 y la proteína FD, un factor de transcripción de tipo bZIP (Zhu *et al.*, 2020b). Una vez en el SAM, el complejo FAC se encarga de inducir la expresión de genes clave en la floración, como son *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (SOC1), *LEAFY* (LFY) y *APETALA 1* (AP1) (Abe *et al.*, 2005; Wigge *et al.*, 2005; Amasino, 2010; Zhu *et al.*, 2020b).

Cuando este proceso comienza lo hace de forma irreversible. Existe un gen con una función antagonista a FT: *TERMINAL FLOWER 1* (TFL1) (Martignago *et al.*, 2020). *TFL1* también da lugar a una proteína de la familia PEBPs. Se sintetiza en el SAM y es capaz de moverse y unirse al factor FD mediante proteínas 14-3-3 (Goretti *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021). Las secuencias de FT y TFL1 son muy similares pero sus funciones son opuestas, ya que TFL1 es un represor de la floración. TFL1 y FT compiten por su unión al factor FD (Zhu *et al.*, 2020a).

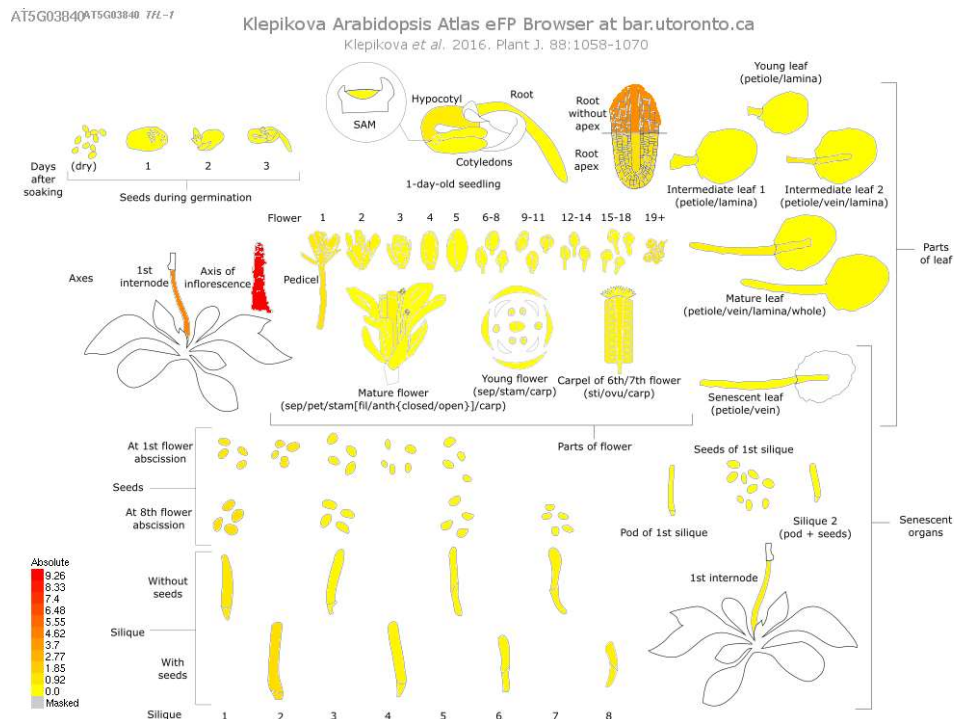
El patrón de expresión de TFL1 es complejo y dinámico (**Figuras 2 y 3**). TFL1 se expresa en todos los meristemos del tallo, pero no en los meristemos florales. En el SAM, tras la germinación, TFL1 se expresa débilmente en el centro del meristemo durante la fase vegetativa, aumentando mucho su expresión durante la transición floral, cuando la identidad vegetativa de este meristemo cambia a identidad inflorescente (Bradley *et al.*, 1997; Serrano-Mislata *et al.*, 2016). Por otro lado, en los meristemos axilares, la expresión de TFL1 es fuerte desde un principio, reduciéndose su nivel y restringiéndose su dominio a medida que se desarrollan las ramas axilares. Por tanto, la expresión de *TFL1* responde e integra diferentes señales que controlan la fase de transición, así como la identidad espacial del meristemo (Conti y Bradley, 2007; Serrano-Mislata *et al.*, 2016).

Este patrón de expresión es clave para el correcto desarrollo de la arquitectura de la planta (Baumann *et al.*, 2015) y esto se puede observar con facilidad en plantas donde la función de *TFL1* se ve afectada. En los mutantes *tfl1*, que son los que dan nombre al gen, la expresión de los genes de identidad foral *LFY* y *API* se expresan ectópicamente en el SAM (Bowman *et al.*,

1993; Bradley *et al.*, 1997; Périlleux *et al.*, 2019), produciéndose una floración temprana, tanto en el SAM como en los meristemas de las cofilorecencias, que pierden su crecimiento indeterminado, dando lugar directamente a flores (flores axilares), en vez de a ramas.



**Figura 2. Patrón de expresión de *TFL1* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *TFL1* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



Data from A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling: Klepikova *et al.*, 2016, Plant J. 88:1058-1070. Total RNA was extracted with RNeasy Plant Kit and Illumina cDNA libraries were generated using the respective manufacturer's protocols. cDNA was then sequenced using Illumina HiSeq2000 with a 50bp read length. The read data are publicly available in NCBI's Sequence Read Archive under the BioProject ID 334076 (accession: PRJNA314076). Reads were aligned to the reference TAIR10 genome (Lamesch *et al.*, 2012) using TopHat (Trapnell *et al.*, 2009). Default TopHat settings and job resource parameters were used, with read groups unspecified. Reads per gene were counted with an in-house Python script using functions from the HTSeq package (Anders *et al.*, 2015). Reads were filtered so that only uninterrupted reads corresponding to a region within exactly one gene were used for RPKM calculation. If a gene's expression level is not displayed, this indicates the reads for this gene did not pass the filtering criteria. RPKM values were compiled using an in-house R script.

**Figura 3. Patrón de expresión de *TFL1* en *Arabidopsis*.** Atlas Klepikova *Arabidopsis* extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova *et al.*, 2016.

Por otro lado, la sobreexpresión de *TFL1* en los mutantes 35S::*TFL1* reprime la expresión de los genes de identidad floral y hace que se mantenga el crecimiento vegetativo, dando lugar a plantas con floración muy tardía y crecimiento indeterminado (Ratcliffe *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 2015; Serrano-Mislata *et al.*, 2016).

### **Modo de acción de *TFL1* y su relación con la ruta de señalización de ABA**

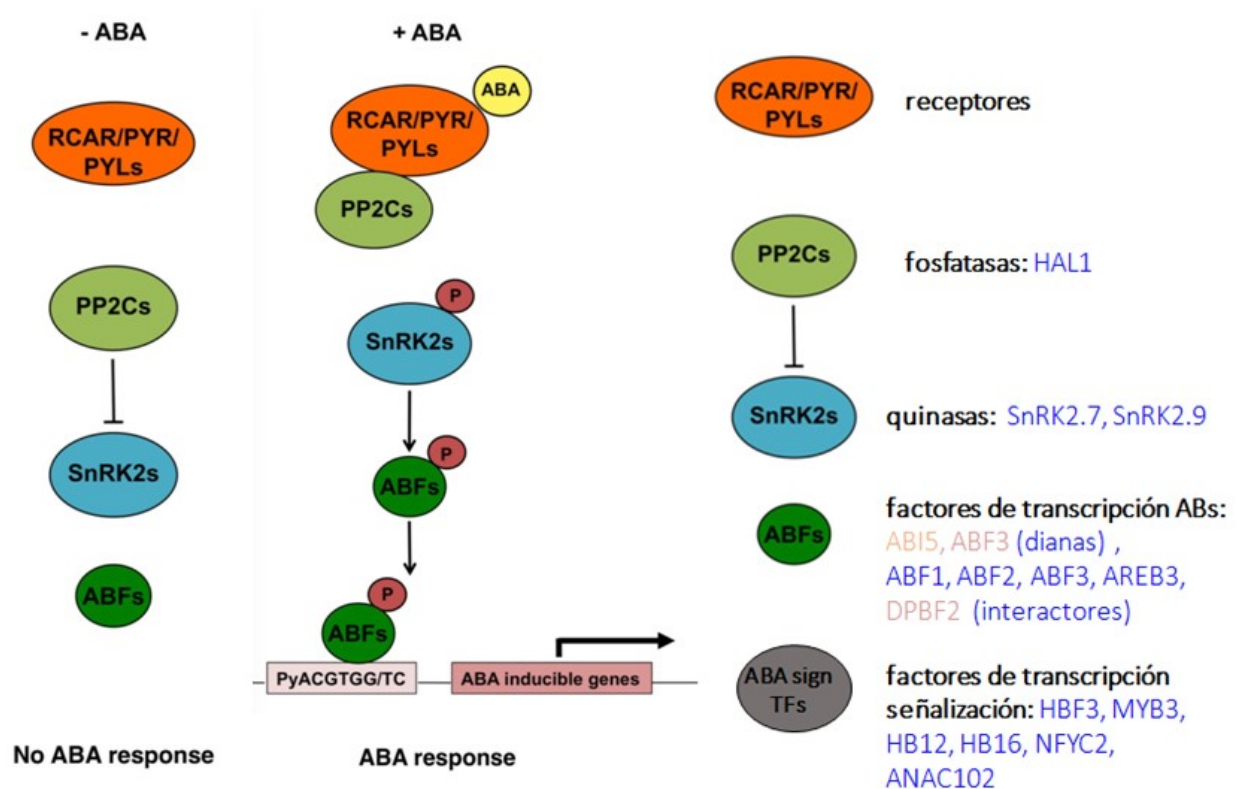
La función molecular de *TFL1* aún no está del todo clara. Se ha observado que la proteína es capaz de moverse en el SAM, desde el centro hacia la periferia del mismo, donde previene la expresión de genes de meristemo floral (Conti y Bradley, 2007; Goretti *et al.*, 2020). También se ha observado que al fusionar *TFL1* con el activador transcripcional VP16 se induce la expresión de genes que normalmente se encuentran reprimidos por *TFL1*, lo cual sugiere que *TFL1* no solo inactiva el FAC, sino que funciona activamente como un co-represor transcripcional gracias a su unión con FD y un posible co-represor, ya que por sí mismo no posee secuencias de unión a DNA (Hanano y Goto, 2011). En estudios previos realizados en nuestro grupo, se identificaron mediante ChIP-seq distintos genes diana de *TFL1* (Goretti *et al.*, 2020; Silvestre, M., 2021); siendo varios de ellos componentes de la ruta de señalización del ácido abscísico (ABA) (**Tabla 1**). Otros estudios dirigidos a identificar posibles dianas de *TFL1* también han encontrado resultados similares (Zhu *et al.*, 2020b).

**Tabla 1.** Genes diana de *TFL1* de la ruta de señalización del ABA, identificados mediante un experimento de ChIP-seq (Goretti *et al.*, 2020).

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

La relación entre la floración y el ABA, el estrés hídrico, no es desconocida. A pesar de que el ABA es una hormona que principalmente regula procesos de dormición de la semilla, retraso de la germinación y resistencia frente al estrés abiótico (Vishwakarma *et al.*, 2017), también se ha relacionado con anterioridad con el proceso de floración (El-Antably y Wareing, 1966; Conti, 2017).

La vía de señalización mediada por ABA está compuesta por tres componentes principales: El ABA es reconocido por PYRABACTIN RESISTANCE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR (PYR/RCAR) con un grupo de PROTEIN PHOSPHATASE 2Cs (PP2Cs) y se libera SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2s (SnRK2s) (Cutler *et al.*, 2010; Conti, 2017). Estas quinasas activan diferentes sustratos, entre ellos una compleja red de factores de transcripción, que serán los que coordinen las respuestas mediadas por ABA (Figura 4; Golembeski y Imaizumi, 2015; Conti, 2019).



**Figura 4. Ruta de señalización mediada por ABA.** El ABA es reconocido por los receptores RCAR/PYR/PYLs. Esta unión estimula la interacción con las fosfatasas PP2Cs, provocando la liberación de las quinasas SnRK2s. Estas quinasas activarán diferentes sustratos, entre los que se encuentran los factores de transcripción ABF, que coordinarán las respuestas a ABA.

La contribución exacta del ABA a la transición floral es controvertida, ya que se han observado papeles positivos y negativos. En condiciones de LD, se ha observado que es capaz de activar *FT* y *TSF*, en un proceso conocido como escape a la sequía (DE, por sus siglas en inglés

*Drought Escape*), fenómeno ya estudiado previamente (Verslues y Juenger, 2011; Riboni *et al.*, 2013). El DE permite a las plantas acelerar la transición floral y producir semillas antes de que el nivel de sequía sea demasiado elevado (Hwang *et al.*, 2019). Se produce por tanto una compensación entre la capacidad de supervivencia y la cantidad de frutos y semillas que puede llegar a producir la planta (Riboni *et al.*, 2016). De acuerdo con esta idea, se han encontrado diversos mutantes de ABA que presentan defectos en la floración en condiciones de LD, pero no en condiciones de SD (Shu *et al.*, 2018; Martignago *et al.*, 2020). Esto ha llevado a proponer un modelo en que el ABA es capaz de afectar la expresión de *FT* modulando la transcripción de *GIGANTEA* (*GI*) y *CO* (Martignago *et al.*, 2020).

También se ha observado que el ABA es capaz de regular negativamente la floración, aunque en este caso lo hace aguas debajo de *FT* (Conti, 2017). En condiciones de fotoperiodo no inductivas se han observado mutantes en la señalización de ABA con floración temprana o retrasada (Wang *et al.*, 2013). Estos fenotipos puede que deriven de un modo de acción diferente del ABA en el SAM que aún no está completamente caracterizado.

Hay muchas cuestiones aún que no se conocen sobre la relación de la ruta de señalización del ABA y la floración. Hasta ahora, no se había relacionado a *TFL1* con el ABA, y esta observación novedosa sugiere varias preguntas ¿Está *TFL1* regulando la ruta del ABA en el SAM? ¿Ejerce *TFL1* su función en parte a través de su influencia en la señalización del ABA? ¿Qué defectos del desarrollo de los mutantes *tfl1* son consecuencia de variaciones en los niveles de ABA o de variaciones en la sensibilidad al ABA?

Para intentar responder a alguna de estas preguntas, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar cómo *TFL1* afecta a la expresión de algunos genes de señalización de ABA, identificados como genes diana de *TFL1* en nuestros experimentos, analizando su patrón de expresión y estudiando si la expresión de estos genes varía en plantas con alteraciones en *TFL1*.
2. Estudiar la posible contribución de la actividad de genes de ABA regulados por *TFL1* en la regulación de los procesos de desarrollo controlados por *TFL1*, mediante el análisis del fenotipo de mutantes de pérdida de función y líneas de sobreexpresión en algunos de esos genes.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Material biológico

#### 1.1. Material vegetal

En este estudio se ha utilizado *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental. Como parental silvestre se utilizó el ecotipo Col-0 de Arabidopsis. Los mutantes de pérdida de función estudiados proceden de la colección de líneas mutantes de T-DNA del instituto SALK (<http://signal.salk.edu>) y de la colección de mutantes de la universidad de Bielefeld GABI-KAT (<https://www.gabi-kat.de/>).

##### 1.1.1. Líneas mutantes

Las líneas mutantes utilizadas se detallan en la **Tabla MM-1**.

**Tabla MM-1.** Líneas mutantes utilizadas

LÍNEA	MUTÁGENO	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	COLECCIÓN_ CÓDIGO REFERENCIA
<i>gbf3</i>	T-DNA	Col-0		SALK_082840C
<i>p5cs1-1</i>	T-DNA	Col-0		SALK_058000
<i>p5cs1-4</i>	T-DNA	Col-0		SALK_063517C
<i>afp2-1</i>	T-DNA	Col-0		SALK_131676
<i>afp2-2</i>	T-DNA	Col-0		SALK_145086C
<i>afp4-1</i>	T-DNA	Col-0		SALK_208284C
<i>hb16</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GK-310A04
<i>hb12</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GK-174E09_013516
<i>tfl1-1</i>		Col-0		(Shannon y Meeks – Wagner, 1991)

##### 1.1.2. Líneas transgénicas

Las líneas transgénicas utilizadas en este trabajo se detallan en la **Tabla MM-2**.

**Tabla MM-2.** Líneas transgénicas utilizadas

LÍNEA	VECTOR	FONDO GENÉTICO	SELECCION	PROCEDENCIA
<b>35S:GBF3</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:P5CS1</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:AFP2</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:AFP4</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:HB12</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:HB16</b>	pMDC32	Col-0	Higromicina	Este trabajo
<b>35S:TFL1</b>	SLJ 44024	Col-0	Kanamicina	Desmond Bradley (Radcliffe <i>et al.</i> , 1998)

### 1.1.3. Cultivo de Arabidopsis en el invernadero

Las plantas *Arabidopsis* fueron cultivadas en una mezcla de tierra 2:1:1 turba negra:perlita:vermiculita, utilizando alveolos de 6.5 x 6.5 x 5 cm. Tras ser sembradas, las semillas se estratificaron durante 3-5 días en condiciones de oscuridad a 4°C para sincronizar la germinación.

Las plantas se cultivaron en cabinas de invernadero con luz natural suplementada con luz blanca fría (4600lm), completando un fotoperiodo de día largo de 16h de luz; mientras que la temperatura se mantuvo estable entre 21°C y 23°C. Por otro lado, también se cultivaron en fitotrón, con iluminación procedente de tubos fluorescentes de luz blanca fría (4600lm), bajo un fotoperiodo de día largo de 16h de luz y 8h de oscuridad a 21°C; o de día corto de 8h de luz y 16h de oscuridad. El riego se realizó por inmersión dos veces por semana, una vez con agua y otra con solución nutritiva Hoagland n°1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966).

### 1.1.4. Cultivo de Arabidopsis *in vitro*

El cultivo *in vitro* fue utilizado para la obtención de material vegetal, así como para la selección de plantas mutantes y transgénicas. En ambos casos, las semillas de *Arabidopsis* se esterilizaron en una solución acuosa de etanol al 70% (v/v) y Tritón-X-100 al 0.005% (v/v) durante 3 minutos con agitación, se lavaron con etanol al 96% (v/v) durante 1 minuto con agitación y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril. Las plantas se cultivaron en cajas de Petri, selladas con cinta *Micropore™ 3M Surgical Tape* para facilitar el intercambio de gases, en un medio de cultivo sólido (pH 5.9) compuesto por 2.2g/L de sales MS (Duchefa), 20g/L de sacarosa, 0.1g/L MES y 6.0g/L de agar.

Para la selección de las plantas mutantes se utilizó, en los casos requeridos, Sulfadiazina (100µg/mL). Para la selección de las plantas transgénicas se utilizó Higromicina (40µg/mL) y Timentina (150µg/mL), este último únicamente en las T1 para eliminar restos de *Agrobacterium tumefaciens*.

Tras ser sembradas, las placas se estratificaron durante 3-5 días en oscuridad a 4°. Tras este proceso, se llevaron a cabinas de cultivo *in vitro* con fotoperiodo de día largo de 16h de luz y la temperatura se mantuvo constante a 24°C. La luz fue proporcionada por tubos fluorescentes Sylvania Gro Luz 36W que emitían luz blanca fría (850lm).

## 1.2. Material bacteriano

Las cepas bacterianas utilizadas se encuentran descritas en la **Tabla MM-3**.

Tabla MM-3. Cepas bacterianas utilizadas

CEPA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Escherichia coli</i> One Shot™ TOP10	Transformación de bacterias	ThermoFisher
<i>Escherichia coli</i> DB3.1™ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de bacterias Transformación de Arabidopsis	Invitrogen (Koncz y Schell, 1986)

### 1.2.1. Cultivo de bacterias *in vitro*

Las bacterias se cultivaron en medio LB (*Luria-Bertani médium*), compuesto por triptona 10g/L, extracto de levadura 5.0g/L y NaCl 1.0g/L, pH 7.0; añadiendo agar 15 g/L cuando se requiere medio sólido. Los cultivos en medio líquido, tanto para *E. coli* como para *A. tumefaciens*, se dejaron incubar durante toda la noche a 37°C o 28°C, respectivamente, con agitación de 200 rpm. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se incubaron a 37°C durante una noche; los cultivos en medio sólido de *A. tumefaciens* se incubaron a 28°C durante 2 días.

Para la recuperación de las células de *E. coli* One Shot™ TOP10 tras la transformación de DNA mediante choque térmico, se usó el medio líquido SOC (medio S.O.C de Hanahan), compuesto por triptona 2 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl<sub>2</sub> 20mM, MgSO<sub>4</sub> 10mM y glucosa 20mM.

Para la selección de bacterias transformadas se suplementaron los medio de cultivo, según fuera necesario, con la siguiente relación de antibióticos (Tabla MM-4).

Tabla MM-4. Antibióticos añadidos al medio LB para la selección bacteriana.

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

### 1.2.2. Conservación de los microorganismos en glicerol

Se prepararon glicerizados en tubos estériles de 2mL “Cryovial” de “Simport” ([www.simport.com](http://www.simport.com)) a partir de cultivos en fase exponencial de *E. coli* y *A. tumefaciens*, para su conservación a largo plazo. Se les añadió glicerol puro hasta una concentración final del 25% y

se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. Todos los viales se almacenaron a -80°C.

### 2. Métodos de biología molecular

#### 2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos

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

En las extracciones a pequeña escala se partió de 5 mL de un cultivo en fase estacionaria de *E. coli*, crecido en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Se utilizó el kit comercial *NZYMiniprep* (NZYTech).

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

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989, partiendo de 5 mL de un cultivo en *A. tumefaciens* crecido durante 24h a 28°C, en medio suplementado con Rifampicina 100µg/mL, para que este se encuentre en fase estacionaria. Dado que la cantidad y la pureza del ADN obtenido mediante este método son bajas, el DNA resultante se utilizó para transformar de nuevo en *E. coli*. A partir de este cultivo de *E. coli* se volvió a purificar el plásmido para su posterior análisis mediante secuenciación Sanger o digestión enzimática.

##### 2.1.3. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis

Se recogieron hojas jóvenes, de aproximadamente 1cm de longitud, en hielo y se extrajo el ADN genómico siguiendo el protocolo “*Quick DNA prep for PCR*” descrito por Weigel y Glazebrook, 2009. Una vez obtenido, el ADN se resuspendió en 100µL de agua Milli-Q, y se almacenó a -20°C.

##### 2.1.4. Extracción de RNA total de Arabidopsis

Las muestras para la extracción de RNA se recolectaron en nitrógeno líquido, evitando al máximo su descongelación. Las muestras congeladas se trituraron manualmente con un mortero y un pistilo hasta obtener un polvo fino, que se alicuotó en tubos de microcentrífuga con aproximadamente 100mg cada uno y se mantuvieron a -80°C hasta la extracción.

Los procesos de extracción necesarios para las técnicas de clonaje y los análisis de nivel de expresión de un gen mediante RT-qPCR se realizaron utilizando el sistema “*E.Z.N.A. Plant Kit RNA kit*” (Omega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación del RNA obtenido se utilizó el sistema Nanodrop ND1000 (Applied), y su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Por último, para eliminar rastros de DNA

genómico, se trató el RNA con DNAsa, utilizando el sistema “*TURBO DNA-free kit*” (Invitrogen).

## 2.2. Manipulación de ácidos nucleicos

### 2.2.1. Síntesis de cDNA

Se partió de 3µg del RNA total de Arabidopsis, aislado y tratado con DNAsa según lo descrito en el apartado 2.1.4. Para la síntesis de cDNA se utilizó el sistema “*SuperScript IV*” y “*Oligo dT<sub>12-18</sub>*” (Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se mantuvo a -20°C hasta su uso en la RT-qPCR.

### 2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la PCR para amplificar fragmentos de DNA con diferentes finalidades, como la clonación o el genotipado de líneas mutantes. En cada caso se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores específicos (**Anexo, Tabla S1**). También se usaron moldes de diferente naturaleza, tales como cDNA, DNA genómico, DNA plasmídico o fragmentos de PCR; así como diferentes tipos de DNA polimerasas, dependiendo del objetivo de la PCR.

Para la amplificación de fragmentos de DNA para procesos de clonaje se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *HF Phusion* (Thermo); mientras que para el genotipado se utilizó la polimerasa *GoTaq* (Fermentas), siguiendo en ambos casos el protocolo descrito por el fabricante. Las condiciones generales para ambas polimerasas se muestran a continuación (**Tablas MM-5 y MM-6**).

**Tabla MM-5.** Condiciones generales utilizadas en la amplificación de DNA mediante PCR. Mezclas de reacción estándar.

	MIX PCR	
	Phusion	GoTaq
Tampón	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	1.5mM
dNTPs	400µM	200µM
Cebador Dir	0.5µM	0.2µM
Cebador Rev	0.5µM	0.2µM
H <sub>2</sub> O	Hasta 50 µL	Hasta 25 µL
Polimerasa	0.2U/µL	0.2U/µL
DNA molde	Desde 1pg hasta 10ng	Desde 1pg hasta 10ng

**Tabla MM-6.** Condiciones generales utilizadas en la amplificación de DNA mediante PCR.

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

El cálculo de la temperatura óptima de hibridación de los cebadores diseñados se calculó empleando la herramienta “*online Tm calculator* Thermo”: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

### 2.2.3. Purificación de fragmentos de DNA

En los procesos que requieren amplicones de DNA de alta calidad y pureza, como son la clonación o la secuenciación, se llevó a cabo un paso de purificación tras la amplificación mediante PCR. Se utilizó el sistema “*NúcleoSpin PCR cleanup*” (MachereyNagel), siguiendo las instrucciones del fabricante, para limpiar los restos de cebadores, tampones y polimerasa.

### 2.2.4. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Para la cuantificación relativa de la expresión génica se empleó la PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Se diseñaron cebadores específicos para el gen a analizar (**Anexo, Tabla S1**) utilizando el software Primer 3 Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Los parámetros de estos primers intentaron ajustarse a las siguientes condiciones: temperatura de hibridación entre 58-62°C, contenido en GC entre 40-60%, amplicones generados entre 180-300pb.

Para cada una de las parejas diseñadas se hizo una prueba en RT-qPCR con diluciones seriadas (1, 1/5, 1/25 y 1/125) para probar su eficiencia de amplificación y evitar posteriores problemas de la amplificación, como pueden ser la generación de amplicones inespecíficos o dímeros de cebadores. Se descartaron todas aquellas parejas que mostraron valores de eficiencia inferiores a 90% o superiores a 110%.

Las reacciones de RT-qPCR, independientemente de si su objetivo era la cuantificación de la expresión o la eficiencia de los cebadores, se realizaron en un volumen final de 10µL, que incluía 2µL de cDNA molde (0.02ng/µL), 2µL de “*Premix PyroTaq Eva Green qPCR Mix Plus*” (GMC) (5X), y 0.4µL de cada uno de los cebadores (5µM). Cada reacción se llevó a cabo con 3 repeticiones técnicas, y se llevaron a cabo en un termociclador “*QuantStudio™ 3 – 96-Well 0.1 mL Block*” (Thermo). El cDNA del gen de interés fue cuantificado durante la fase exponencial de la reacción de PCR, en función al número de ciclos necesarios para superar el umbral determinado de fluorescencia (Ct). La expresión relativa del gen se calculó respecto al gen constitutivo *TIP41-like* (Czechowsky *et al.*, 2005) según el método “ $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct)” mediante la siguiente fórmula:

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

#### 2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se llevaron a cabo siguiendo protocolos estándar (Maniatis *et al.*, 1982), utilizando en cada reacción el tampón y las condiciones recomendadas por el fabricante. El análisis de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración 1% en tampón TBE 1X [Tris 44.5mM (pH 8.0), ácido bórico 44.5mM, EDTA 1.25mM].

### 2.3. Generación de las líneas de sobreexpresión

#### 2.3.1. Vectores plasmídicos utilizados

En este trabajo se emplearon los vectores descritos a continuación (**Tabla MM-7**).

**Tabla MM-7.** Vectores plasmídicos utilizados

NOMBRE	RESISTENCIA (bacteria/planta) CARACTERÍSTICAS	USO	PROCEDENCIA
pCR8/GW/TOPO	Espectinomicina Sitios de unión para	Clonación de productos de PCR. Vector entrada	Invitrogen

	cebadores M13 directo y reverso, GW1 y GW2	sistema <i>Gateway</i>	
<b>pMDC32</b>	Kanamicina/Higromicina Promotor 2x35S	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> . Contiene un promotor 2x35S	Invitrogen

### 2.3.2. Construcciones plasmídicas utilizadas

En este trabajo se emplearon las construcciones plasmídicas descritas a continuación (**Tabla MM-8**).

**Tabla MM-8.** Construcciones plasmídicas empleadas.

NOMBRE	PROPÓSITO	INSERTO	ORIGEN
<b>pCR8/GW/TOPO-P5CS1</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>P5CS1</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pCR8/GW/TOPO-HB12</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>HB12</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pCR8/GW/TOPO-HB16</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>HB16</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pCR8/GW/TOPO-AFP2</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>AFP2</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pCR8/GW/TOPO-AFP4</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>AFP4</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pCR8/GW/TOPO-GBF3</b>	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	Fragmento cDNA del gen <i>GBF3</i> desde ATG a STOP amplificado mediante PCR	Este trabajo
<b>pMDC32-P5CS1</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>P5CS1</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo



<b>pMDC32-HB12</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>HB12</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo
<b>pMDC32-HB16</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>HB16</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo
<b>pMDC32-AFP2</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>AFP2</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo
<b>pMDC32-AFP4</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>AFP4</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo
<b>pMDC32-GBF3</b>	Generación de construcciones del tipo 35S:: <i>GBF3</i> para la obtención de líneas transgénicas de sobreexpresión	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8/GW/TOPO y el vector pMDC32	Este trabajo

### 2.3.3. Obtención de construcciones

Las construcciones de este trabajo se han obtenido mediante el sistema de clonación comercial *Gateway* (Thermo), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se amplificó la CDS completa desde ATG a STOP de los distintos genes (*P5CSI*, *HB12*, *HB16*, *AFP2*, *AFP4* y *GBF3*) utilizando como molde cDNA de plántulas de 12 días (con raíz) usando la polimerasa de alta fidelidad HF Phusion (Thermo) como se describe en el apartado 2.2.2. Las distintas parejas de cebadores empleadas se detallan en el (Anexo, **Tabla S1**).

#### 2.4. Secuenciación Sanger

Los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR para los procedimientos de clonaje se secuenciaron en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Valencia) con el secuenciador capilar “ABI 3130 XL” (Applied).

#### 2.5. Generación de organismos transgénicos

##### 2.5.1. Transformación de bacterias

La transformación de bacterias se realizó mediante electroporación, con un aparato “GenePulser™” (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaron células de *E. coli* o de *A. tumefaciens* electrocompetentes, obtenidas mediante el protocolo descrito en “Pulse controller, operation instructions and applications guide, accesory for bacterial and fungal electro-transformation” (Bio-Rad Laboratories, 1992), en el caso de *E. coli*; y según Wen-Jun y Forde (1989) para los cultivos de *A. tumefaciens*. El pulso eléctrico aplicado fue de 200Ω, 25μF, 1.8kV para *E. coli*; y 400Ω, 25μF, 1.8kV para *A. tumefaciens*.

En algunos casos en los que la electroporación de *E. coli* no tenía la eficacia suficiente, la transformación se realizó mediante *heat-shock*. Para ello se utilizaron células de *E. coli* de la cepa One Shot™ TOP10 (Invitrogen), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcr8gwtopo\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pcr8gwtopo_man.pdf)).

##### 2.5.2. Generación de plantas transgénicas de Arabidopsis

###### 2.5.2.1. Transformación de Arabidopsis

Para generar plantas transgénicas de *A. thaliana* se utilizaron plantas silvestres de Arabidopsis del ecotipo Col-0. La transformación de Arabidopsis con las construcciones generadas en este trabajo (**Tabla MM-8**) se realizó siguiendo el protocolo de agroinfiltración de Clough y Bent (1998).

###### 2.5.2.2. Selección de plantas transgénicas

Para identificar las plantas transgénicas T1, transformantes primarios, las semillas procedentes de las plantas agroinfiltradas se sembraron en cajas Petri de 15cm de diámetro, con unas 1500 semillas por caja, en medio de cultivo MS sólido, suplementado con Higromicina y Timentina. Después de unos 10 días de cultivo *in vitro*, las plantas T1 resistentes se transfirieron a tierra y se cultivaron en el invernadero de acuerdo con las condiciones descritas en la sección 1.1.3.

Para estimar el número de inserciones de T-DNA en las líneas transgénicas T1, se sembraron por cada línea 60 semillas T2 en cajas Petri de 9cm de diámetro con medio MS suplementado

con Higromicina y, después de ser cultivadas durante unos 15 días, se cuantificó el porcentaje de plantas T2 que resistían al antibiótico.

### 3. Análisis fenotípico de las plantas mutantes y líneas transgénicas

#### 3.1. Fotografía a bajo aumento

Los fenotipos observados en las diferentes líneas transgénicas y/o mutantes se documentaron, entre otros métodos, mediante fotografía a bajo aumento utilizando una cámara Leica V-LUX1. Para la obtención de imágenes a un mayor aumento, se empleó una Lupa binocular (Olympus SZ60) con la ayuda del software de análisis de imagen *Leica Application Suite* (Leica).

#### 3.2. Técnicas microscópicas para el análisis del tamaño de semillas

Para el análisis del tamaño de las semillas, las plantas se cultivaron en condiciones de día largo. Se recogieron las semillas de las plantas seleccionadas y se secaron durante 5 días a 37°C. Se fotografiaron entre 30 y 32 semillas, escogidas al azar entre la población total de semillas, mediante una Lupa binocular (Olympus SZ60) y el tamaño de las semillas se determinó con la ayuda del software de análisis de imagen Fiji (<https://fiji.sc/>).

### 4. Análisis bioinformáticos

#### 4.1. Análisis de secuencias

El análisis de las secuencias provenientes de la secuenciación Sanger, el diseño de los cebadores para PCR y los análisis de mapas de restricción se realizaron mediante *benchling* (<https://www.benchling.com/>).

#### 4.2. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de significatividad de los diferentes experimentos se realizaron mediante la plataforma online *Astata* ([https://astata.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](https://astata.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/)).



## RESULTADOS

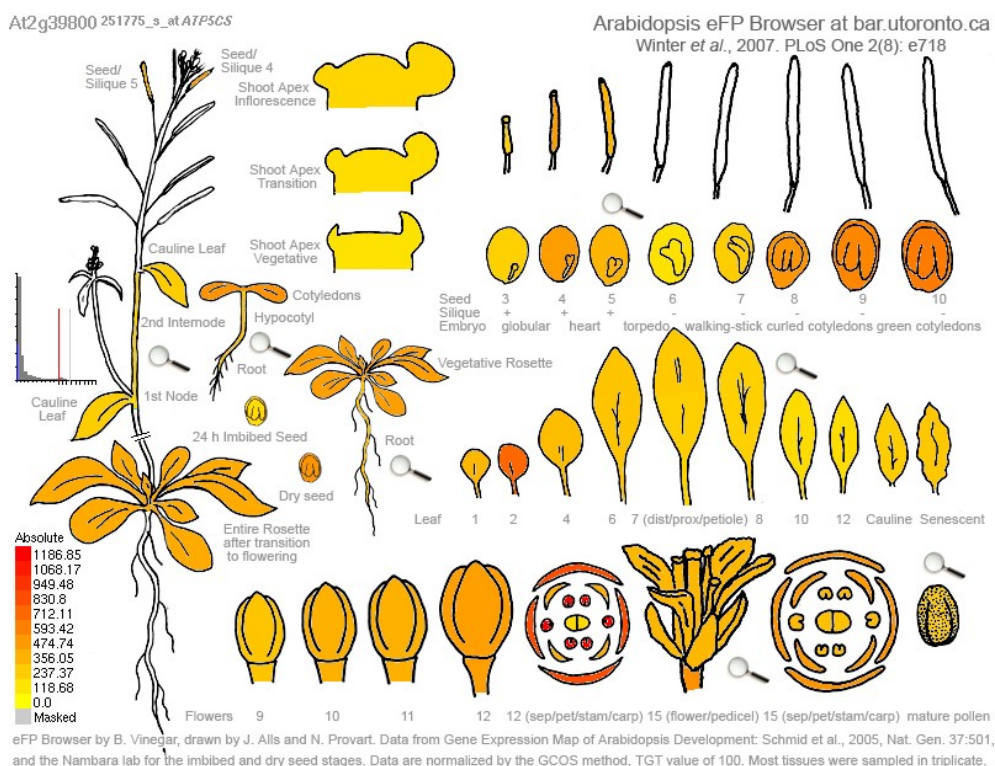
Los resultados de este Trabajo de Fin de Máster, que se presentan en esta sección, incluyen una caracterización del patrón de expresión de seis genes dianas directas de TFL1 implicados en la señalización por ABA [*DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1 (P5CS1)*, *HOMEBOX 12 (HB12)*, *HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER 16 (HB16)*, *ABI5 BINDING PROTEIN 2 (AFP2)*, *ABI5 BINDING PROTEIN 4 (AFP4)* y *G-BOXBINDING FACTOR 3 (GBF3)*]; así como una caracterización del papel de los mismos en el control del desarrollo, con énfasis en el proceso de la floración.

### 1. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1 (P5CS1)*

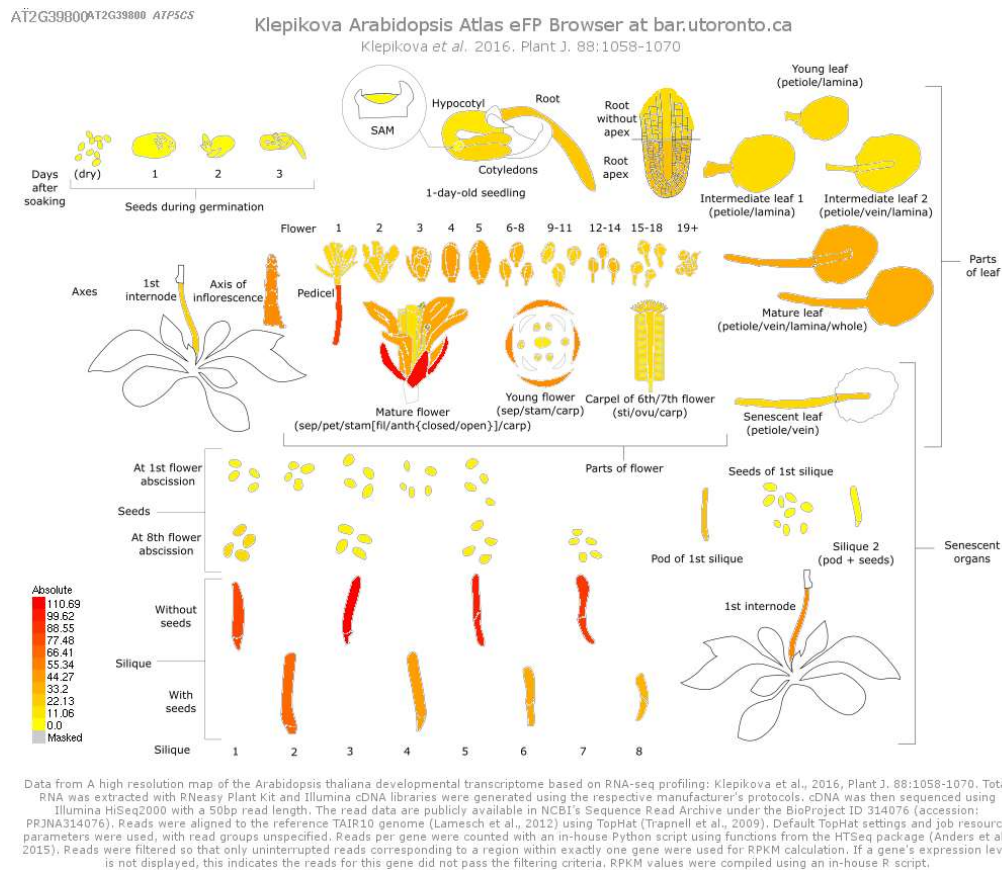
#### 1.1. Análisis del patrón de expresión de *P5CS1*

El primer paso en la caracterización de *P5CS1* fue estudiar su patrón de expresión utilizando la información de bases de datos públicas.

Mediante el análisis de información de expresión de *P5CS1* en bases de datos pudimos observar que este gen se expresa con mayor intensidad en las silicuas sin semillas y en los sépalos; pero también se encuentra presente en otros tejidos, tanto durante el desarrollo vegetativo como durante el desarrollo reproductivo (**Figuras R-1 y R-2**). Por otra parte, al igual que *TFL1* este gen se expresa en semillas, en plántula y en las hojas de roseta.



**Figura R-1. Patrón de expresión de *P5CS1* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *P5CS1* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



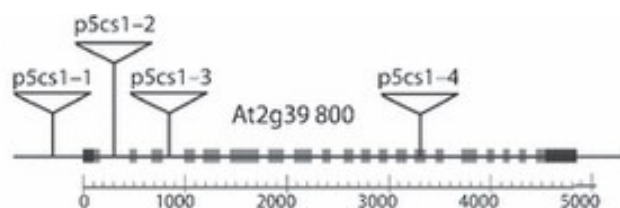
**Figura R-2. Patrón de expresión de *P5CS1* en Arabidopsis.** Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

## 1.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *P5CS1*

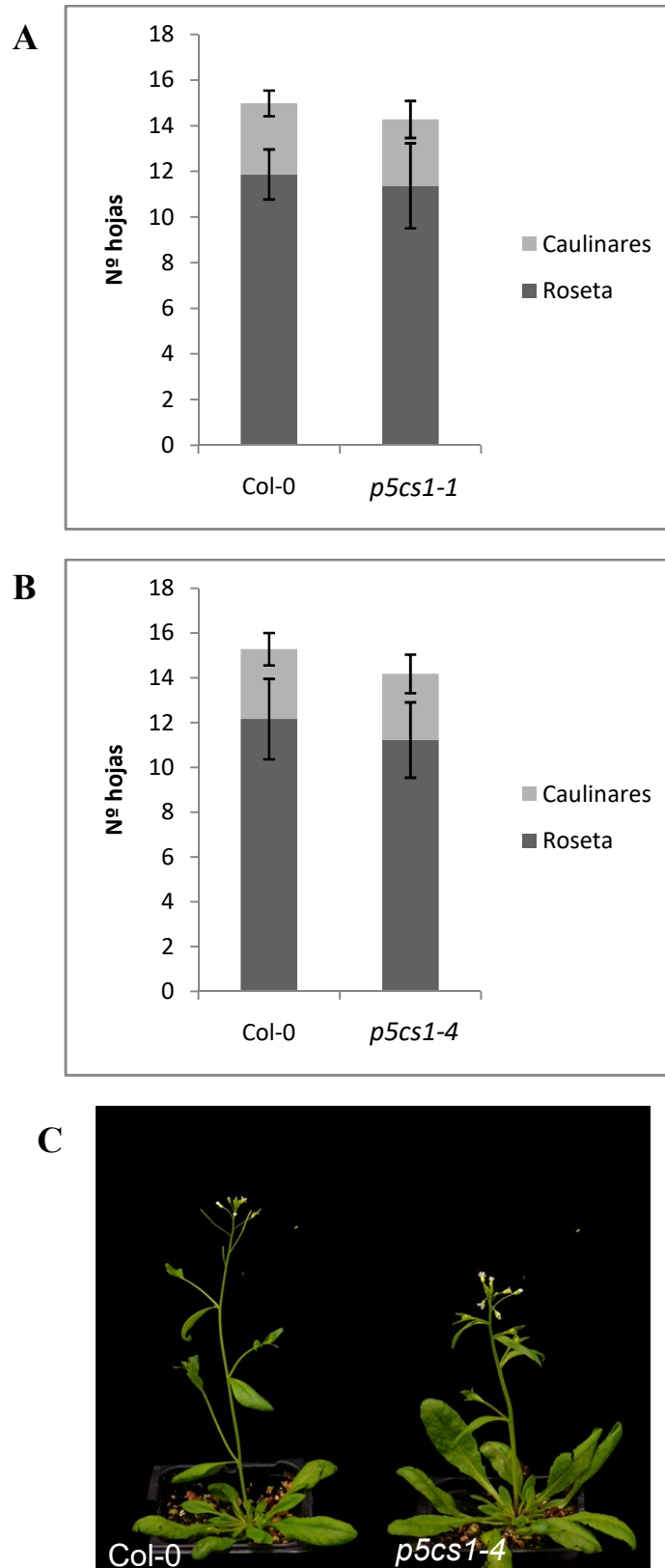
### 1.2.1. Identificación y análisis del mutante *p5cs1*

Para profundizar en el estudio de la función de *P5CS1* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de Arabidopsis, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función.

Para ello se identificaron y se obtuvieron dos mutantes de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de las líneas mutantes *p5cs1-1* (SALK\_058000) y *p5cs1-4* (SALK\_063517) (**Figura R-3**) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA mediante PCR con cebadores específicos. De este modo se seleccionaron aquellas plantas que portaban la inserción del T-DNA en homocigosis.



**Figura R-3. Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes estudiados.** Posiciones de las inserciones de T-DNA en los mutantes *p5cs1-1* y *p5cs1-4* (Székely et al., 2007).



**Figura R-4. Fenotipos asociados a los mutantes *p5cs1-1* y *p5cs1-4* en condiciones de fotoperiodo de día largo.** A) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal ( $n \geq 25$ ). Las barras de error representan la desviación estándar. B) Imágenes del silvestre y el mutante *p5cs1-4* tras 4 semanas creciendo en condiciones de día largo.

Para la caracterización fenotípica de ambos mutantes se sembraron un mínimo de 25 plantas por cada genotipo en condiciones de día largo en dos experimentos independientes. El tiempo de floración se midió como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se observó la arquitectura de la planta y la inflorescencia del mutante en busca de otras alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función (**Figura R-4**).

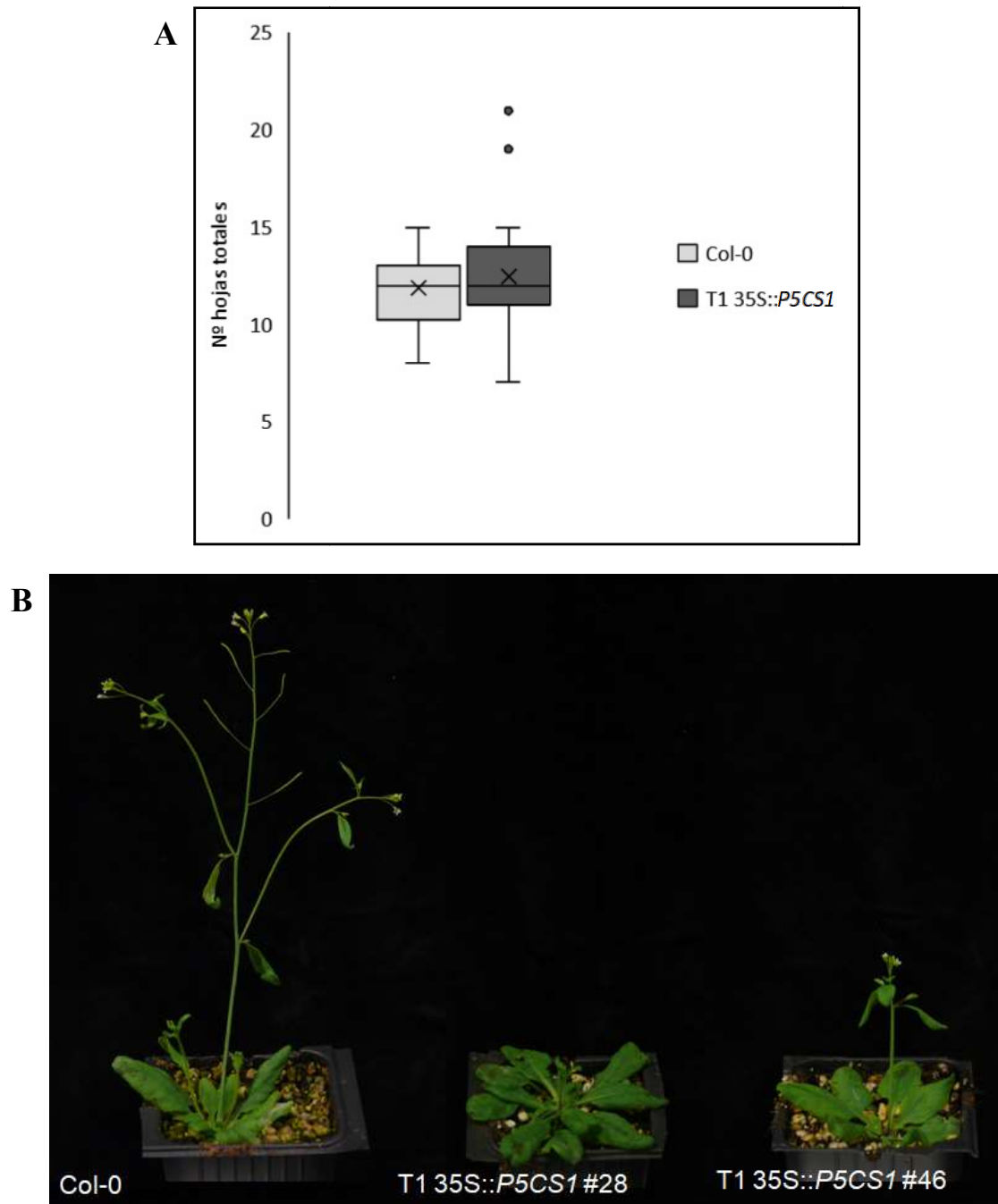
Ninguno de los mutantes mostró diferencias significativas en el tiempo de floración respecto al parental silvestre Col-0 ni ninguna otra alteración evidente.

#### 1.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *P5CSI*

Con frecuencia, debido a una alta redundancia funcional con genes de una misma familia, los mutantes de pérdida de función no muestran alteraciones fenotípicas notables. A pesar de no observar ningún fenotipo relevante ni en el tiempo de floración ni en la arquitectura de la planta en el mutante de pérdida de función, decidimos intentar profundizar en la función de *P5CSI*, mediante la generación y caracterización fenotípica de líneas de sobreexpresión en el genotipo silvestre Col-0. Se realizó un análisis en una población de 46 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*P5CSI* en busca de fenotipos asociados al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la inflorescencia.

A pesar de observar algunas plantas con un fenotipo tardío respecto al parental silvestre Col-0 (**Figura R-5**), en general la población T1 35S::*P5CSI* no mostró diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración respecto al parental silvestre Col-0.





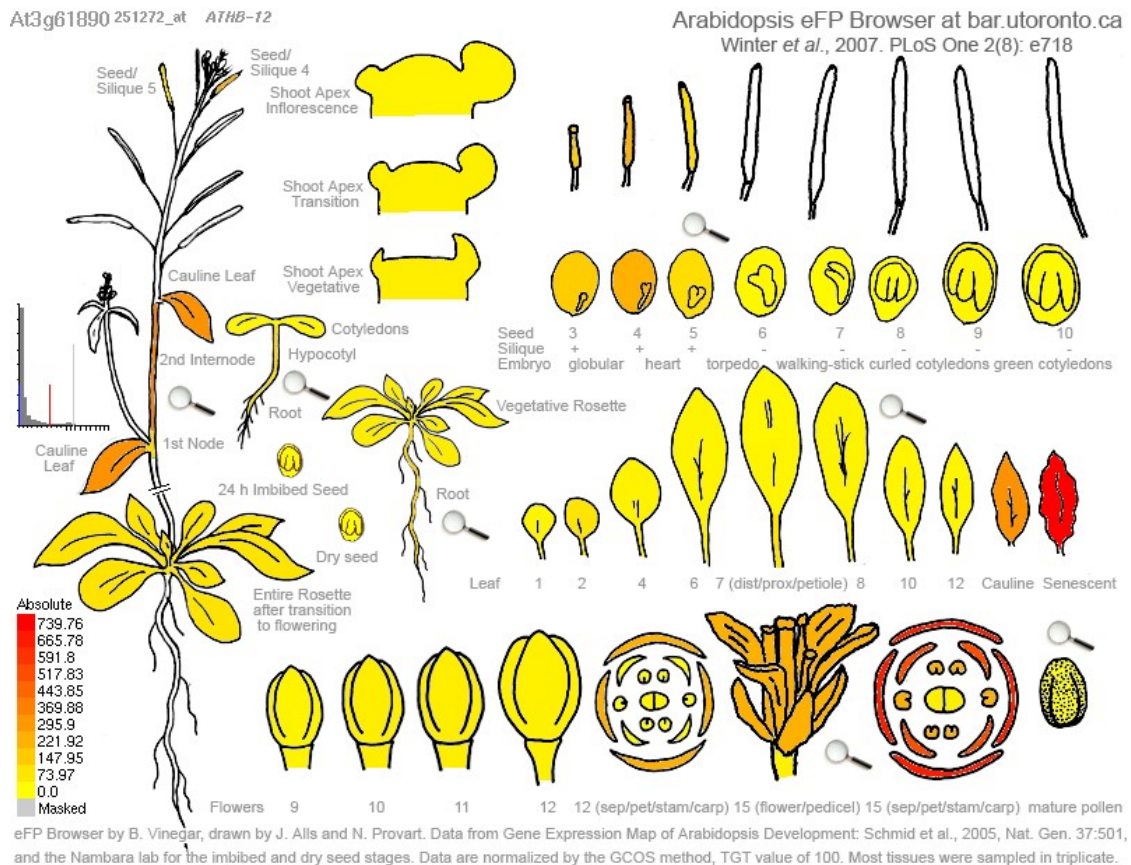
**Figura R-5. Fenotipo de plantas T1 35S::P5CS1.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1. B) Imágenes de las plantas adultas tras 3 semanas de cultivo en condiciones de día largo.

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *HOMEOBOX 12 (HB12)*

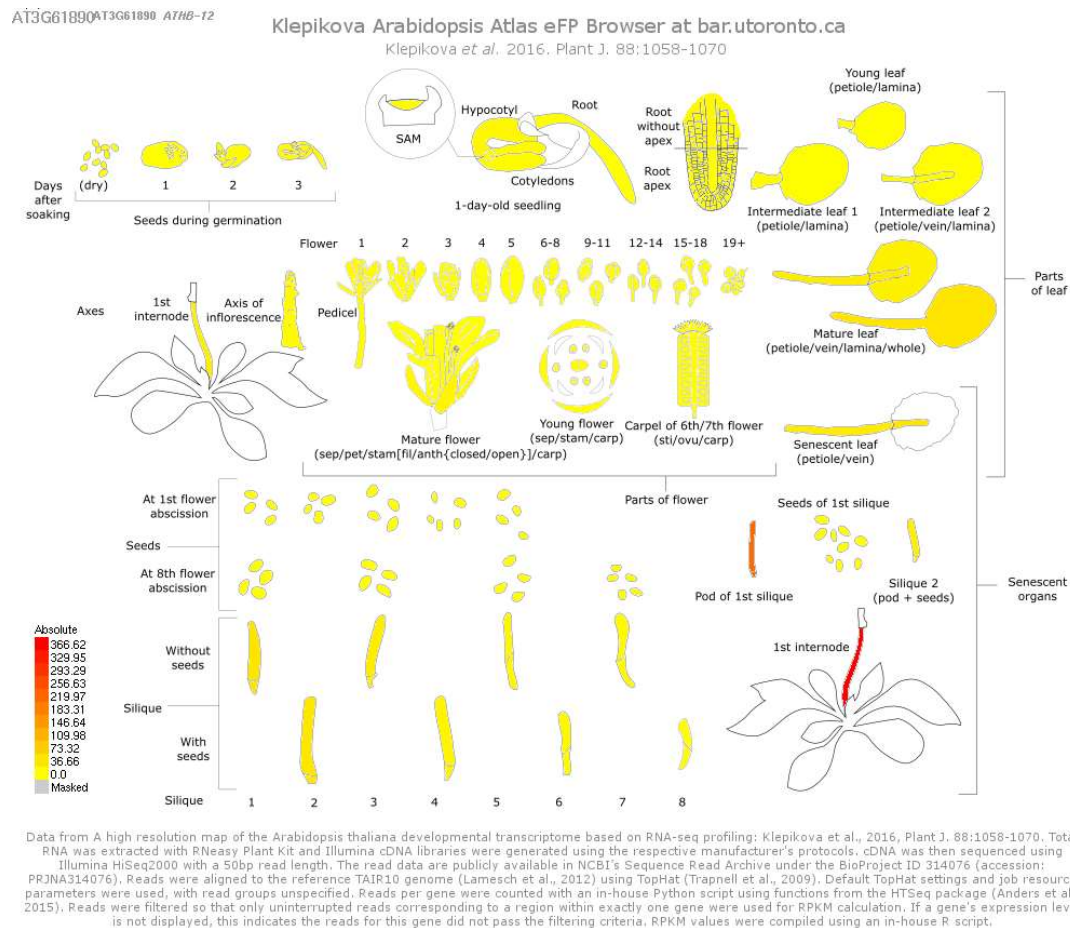
### 2.1. Análisis del patrón de expresión de *HB12*

El primer paso en la caracterización de *HB12* fue estudiar su patrón de expresión utilizando la información de bases de datos públicas.

Mediante el análisis de información de expresión de *HB12* disponible en bases de datos pudimos observar que este gen se expresa principalmente en hojas senescentes y en sépalos y pétalos de flores maduras. Al igual que *TFL1*, también vimos que se expresa en los entrenudos del tallo de la inflorescencia y, a nivel moderado, en semilla (**Figuras R-6 y R-7**).



**Figura R-6. Patrón de expresión de *HB12* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *HB12* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



**Figura R-7. Patrón de expresión de *HB12* en *Arabidopsis*.** Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

## 2.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *HB12*

### 2.2.1. Identificación y análisis del mutante *hb12*

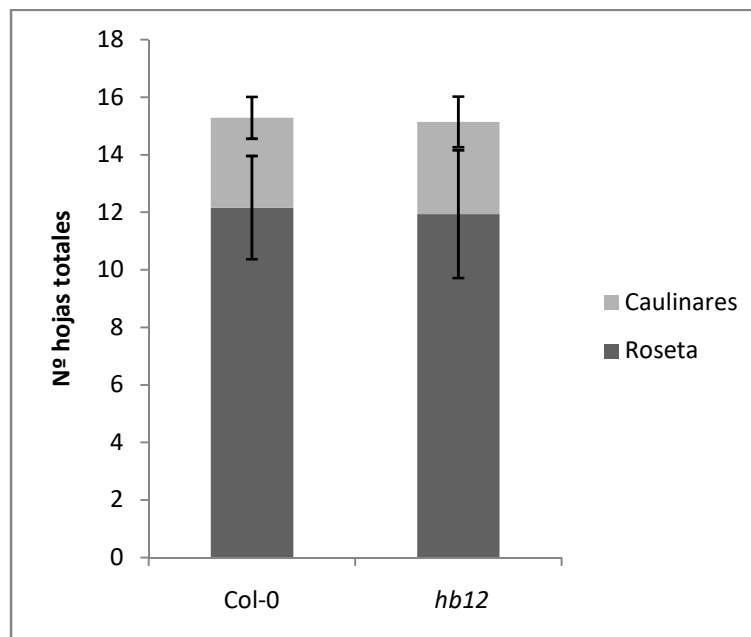
Para profundizar en el estudio de la función de *HB12* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función. Para ello se identificó y se obtuvo un mutante de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de la línea mutante (GK-174E09\_013516) (**Figura R-8**) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA en homocigosis mediante la siembra de 40 semillas en medio selectivo de MS con Sulfadiazina. Posteriormente se analizó la presencia del T-DNA en homocigosis mediante PCR con cebadores específicos.



**Figura R-8. Esquema de las inserciones T-DNA en los mutantes estudiados.** Posiciones de las inserciones de T-DNA en el mutante *hb12*.

Para la caracterización fenotípica del mutante se sembraron un mínimo de 25 plantas por genotipo en condiciones de día largo. El tiempo de floración se midió como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se analizó la arquitectura de la planta y la inflorescencia del mutante con el fin de identificar otras posibles alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función (**Figura R-9**).

Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas en el tiempo de floración entre el parental silvestre Col-0 y el mutante *hb12*, ni tampoco se observaron alteraciones en la arquitectura de la planta en el mutante *hb12* respecto al parental silvestre Col-0.



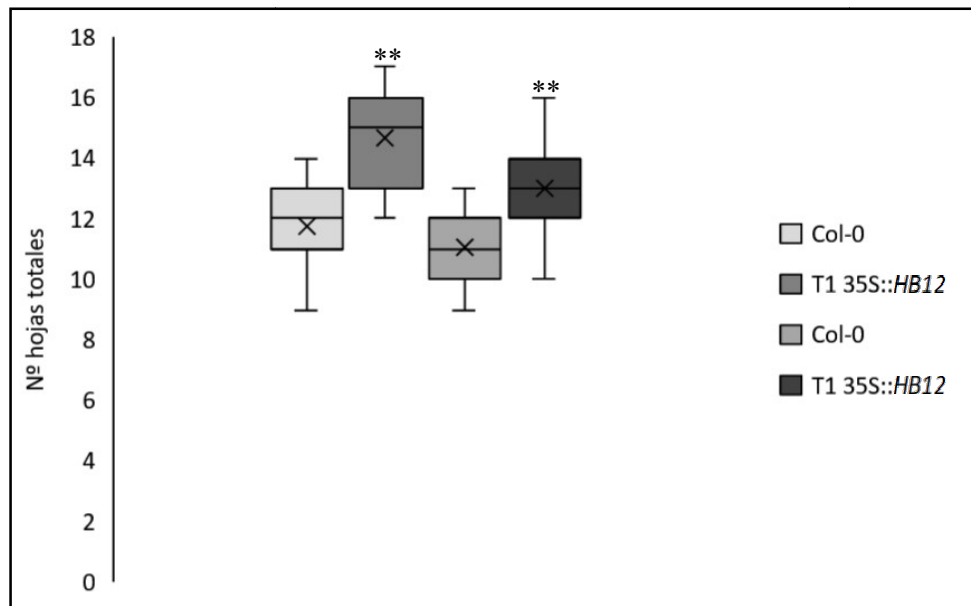
**Figura R-9. Fenotipo asociado al mutante *hb12* en condiciones de fotoperiodo de día largo.** A) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal ( $n \geq 25$ ). Las barras de error representan la desviación estándar.

#### 2.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *HB12*

Con frecuencia, debido a una alta redundancia funcional con genes de una misma familia, los mutantes de pérdida de función no muestran alteraciones fenotípicas notables.

A pesar de no observar ningún fenotipo relevante en el tiempo de floración ni en la arquitectura de la planta en el mutante de pérdida de función, decidimos intentar profundizar en la función de *HB12*, mediante la caracterización fenotípica asociada a su sobreexpresión en plantas del genotipo silvestre Col-0. Se realizó un análisis en dos experimentos independientes con poblaciones de al menos 46 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*HB12* en busca de fenotipos asociados al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la inflorescencia.

Se observó en la población T1 35S::*HB12* la presencia de diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración, siendo algunas de las líneas T1 tardías respecto al parental silvestre Col-0 (**Figura R-10**).



**Figura R-10. Fenotipo asociado a la generación T1 35S::HB12.** Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1 de dos experimentos independientes. Nivel de significatividad estadística test de Tukey \*\* $p \leq 0.01$

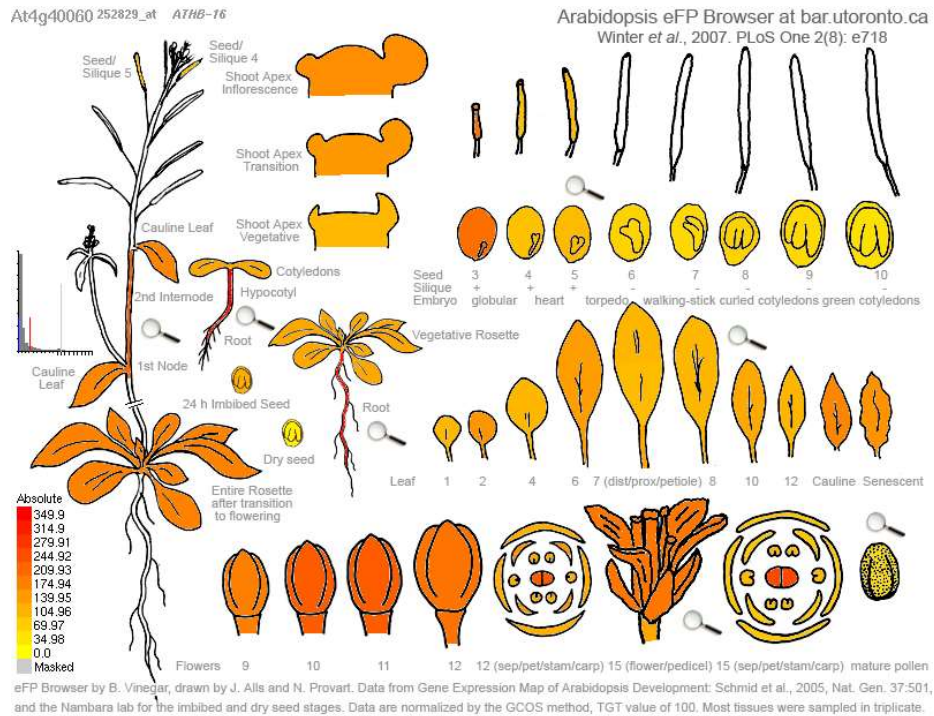
### 3. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER 16 (HB16)*

#### 3.1. Análisis del patrón de expresión *HB16*

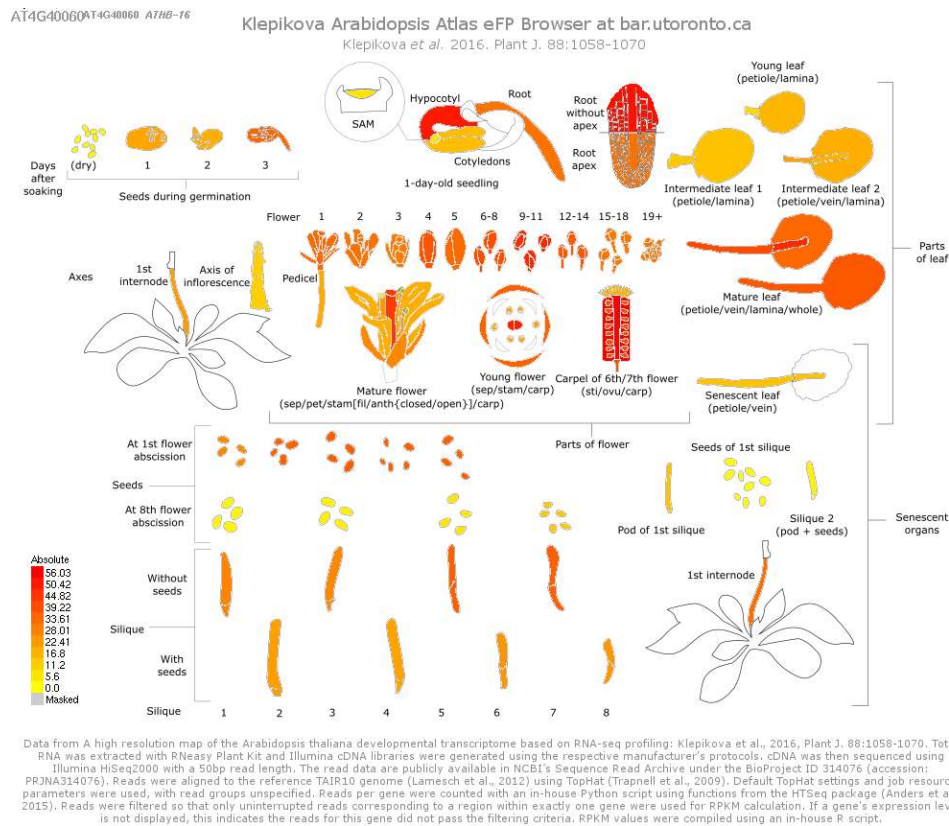
El primer paso en la caracterización de *HB16* fue estudiar su patrón de expresión, utilizando información de bases de datos públicas; así como mediante RT-qPCR de muestras del genotipo silvestre y de genotipos de pérdida de función y sobreexpresión de *TFL1*.

##### 3.1.1. Análisis del patrón de expresión de *HB16* usando transcriptomas disponibles en bases de datos

Mediante el análisis de información de expresión de *HB16* en bases de datos, pudimos observar que este gen se expresa de forma generalizada en los diferentes tejidos de la planta durante su desarrollo, siendo particularmente elevado su nivel de expresión en hipocótilo, en carpelo y en raíz de plántula (**Figuras R-11 y R-12**). También se observa que el nivel de expresión de *HB16* en el ápice del tallo sube con la transición floral, en el ápice inflorescente (**Figura R-12**), lo que recuerda a lo que ocurre con la expresión de *TFL1*.



**Figura R-11. Patrón de expresión de *HB16* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *HB16* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



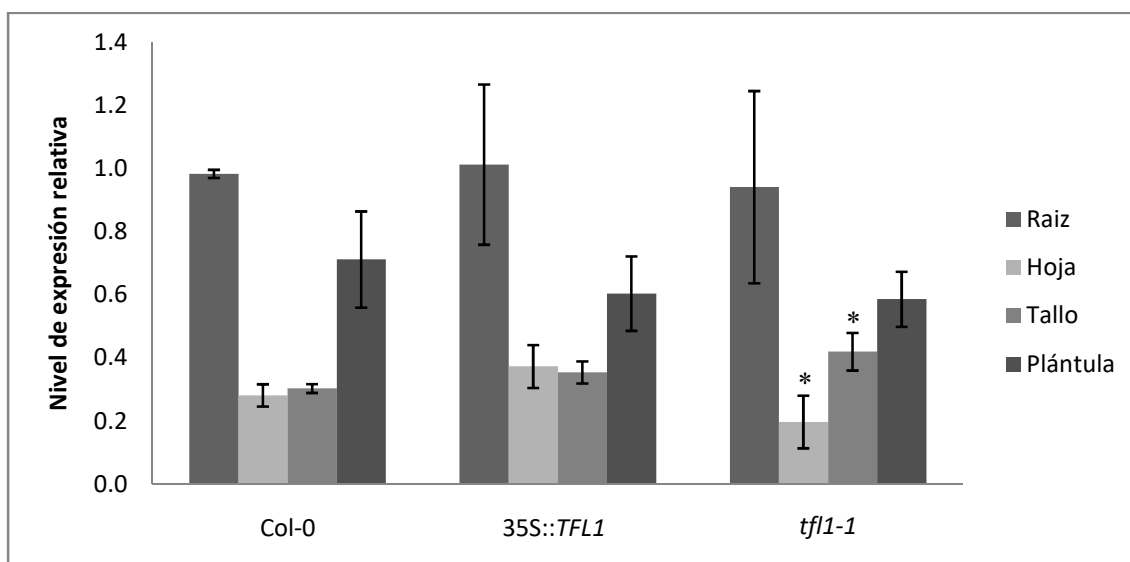
**Figura R-12. Patrón de expresión de *HB16* en *Arabidopsis*.** Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron tomados de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

### 3.1.2. Análisis del patrón de expresión de *HB16* mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo

Para llevar a cabo un análisis más completo de la expresión de *HB16*, gen diana de *TFL1*, se estudió cómo varía esta en relación a cambios en *TFL1*. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de RT-qPCR.

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión de *HB16* en distintos tejidos de líneas de pérdida de función, mutante *tfl1-1*, y de ganancia de función, *35S::TFL1*. Como control se utilizó el genotipo silvestre Col-0. Se recogieron muestras a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Las muestras de plántula se recogieron a los 7 días tras la germinación; las muestras de tallo, sin hoja caulinar ni yemas axilares, y las de hoja de roseta, se recogieron a los 12 días tras la germinación; y las muestras de raíz se recogieron a los 21 días tras la germinación.

La expresión de *HB16* se detectó principalmente en la raíz y en la plántula, siendo considerablemente más baja en la hoja y en el tallo (**Figura R-13**). Este patrón de expresión se mantenía entre los diferentes fondos genéticos analizados, observándose una notable disminución de la expresión en la hoja en el mutante *tfl1-1* en comparación con el genotipo parental Col-0.



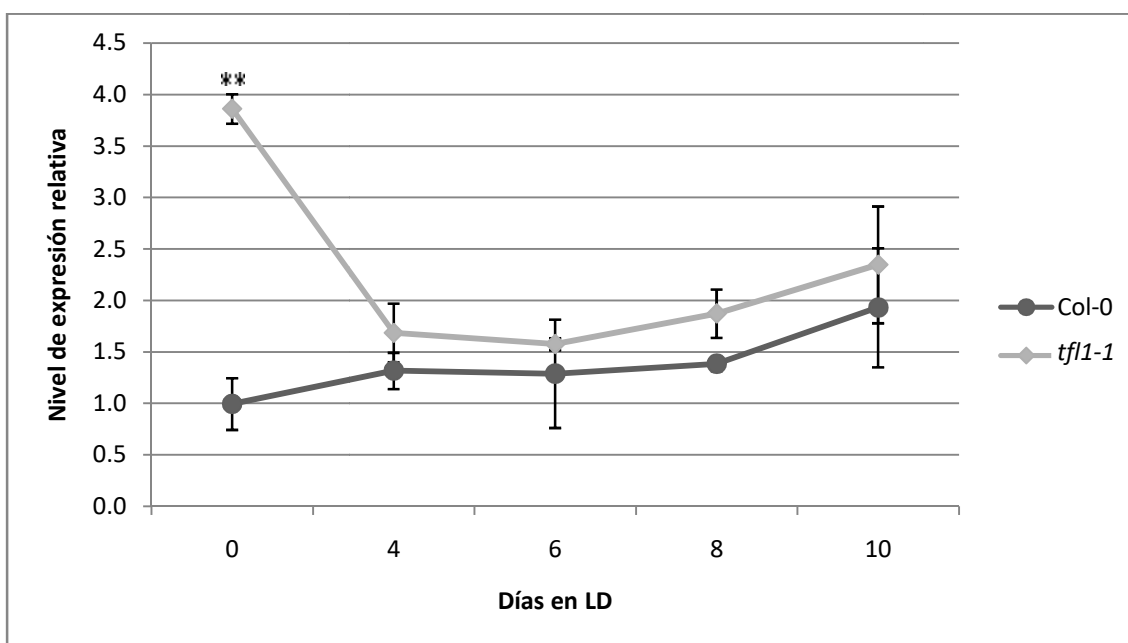
**Figura R-13. Expresión relativa de *HB16* en diferentes tejidos.** Las muestras de cada tejido fueron recogidas a partir de plantas en cultivo *in vitro* cultivadas en condiciones de día largo. Los niveles de expresión de *HB16* fueron medidos mediante RT-qPCR. Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tejido y cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas en cada réplica biológica. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo. Las barras de error representan la desviación estándar. Nivel de significatividad estadística test de t-student \* $p \leq 0.05$ .

### 3.1.3. Análisis del patrón de expresión de *HB16* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR

*TFL1* se expresa sobre todo en el ápice del tallo, a nivel más bajo en la fase vegetativa y sensiblemente más alto en la fase reproductiva, principalmente en el meristemo inflorescente. Para analizar la variación en el nivel de expresión de *HB16* en el ápice del tallo durante el desarrollo se recogieron muestras de ápices de plantas silvestres Col-0 y de mutantes *tfl1-1* en

distintas fases de desarrollo. Para ello, las plantas se sembraron, y tras 3 días de estratificación a 4°C se cultivaron durante 3 semanas en día corto, transfiriéndose posteriormente a día largo para inducir la floración. Consideramos este momento como T0. En las plantas Col-0 la transición floral se inicia a los pocos días en esas condiciones de cultivo. Las muestras de ápice se recogieron a T0, y a los 4, 6, 8 y 10 días desde su paso a día largo.

Se observó que el nivel de expresión de *HB16* es mucho más alto durante la fase del desarrollo vegetativo en el mutante *tf11-1* que en Col-0, aunque a partir de T4 el nivel de expresión en ambos genotipos tiene una tendencia similar, incrementándose ligeramente a medida que se produce el proceso de la transición floral. Sin embargo, en general en las plantas Col-0, *HB16* parece expresarse a un nivel algo menor que en el mutante *tf11-1* (Figura R-14).



**Figura R-14. Expresión relativa de *HB16* en Col-0 y el mutante *tf11-1* en el ápice del tallo durante el desarrollo.** Evolución de la expresión de *HB16* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo. Las plantas se cultivaron 3 semanas en día corto y, tras este tiempo, fueron transferidas a día largo. Las muestras se recogieron a partir de este momento y durante un periodo de tiempo de 10 días. Los niveles de expresión de *HB16* se midieron mediante RT-qPCR. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Se analizó 1 réplica biológica por cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas en cada réplica biológica. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $**p \leq 0.01$ .

### 3.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *HB16*

#### 3.2.1. Identificación y análisis del mutante *hb16*

Para profundizar en el estudio de la función de *HB16* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función.

Para ello se identificó y se obtuvo un mutante de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de la línea mutante (GK-310A04) (Figura R-15) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA en homocigosis mediante la

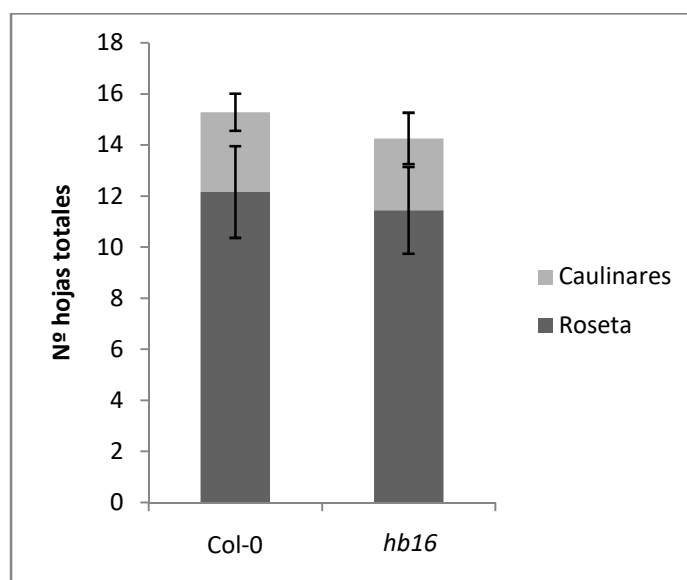


siembra de 40 semillas en medio selectivo con Sulfidiazina. Posteriormente se confirmó la presencia del T-DNA en homocigosis mediante PCR con cebadores específicos.



**Figura R-15. Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes estudiados.** Posiciones de las inserciones de T-DNA en los mutantes *hb16*.

Para la caracterización fenotípica del mutante se sembraron un mínimo de 25 plantas por genotipo en condiciones de día largo. El tiempo de floración se midió como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se analizó la arquitectura del mutante con el fin de identificar otras posibles alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función (**Figura R-16**).



**Figura R-16. Fenotipo asociado al mutante *hb16* en condiciones de fotoperiodo de día largo.** A) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal ( $n \geq 25$ ). Las barras de error representan la desviación estándar.

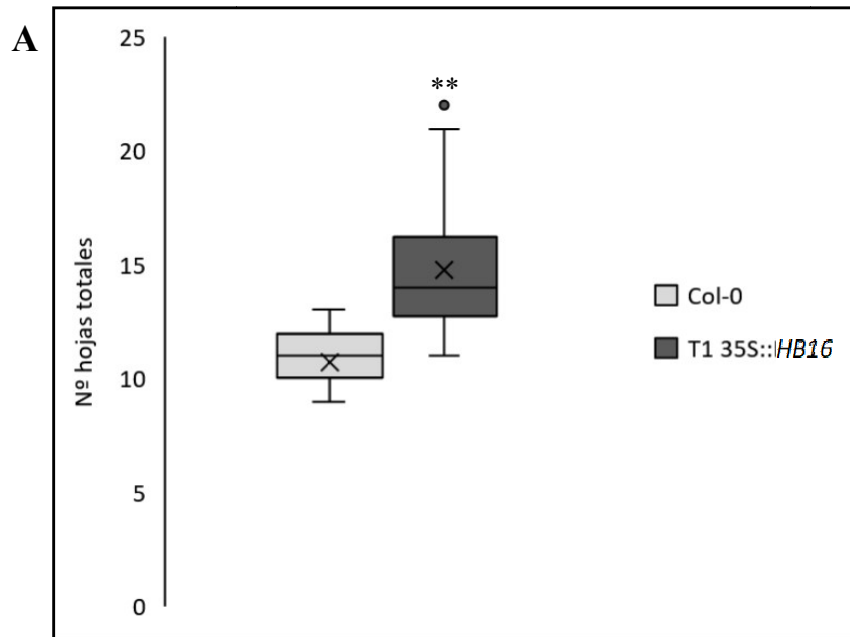
Los resultados indicaron que no existen diferencias significativas en el tiempo de floración entre el parental silvestre Col-0 y el mutante *hb16*; ni tampoco se observaron alteraciones en la arquitectura de la planta en el mutante *hb16* respecto del parental silvestre.

### 3.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *HB16*

A pesar de no observar ningún fenotipo relevante ni en el tiempo de floración ni en la arquitectura de la planta en el mutante de pérdida de función, decidimos intentar profundizar en la función de *HB16*, mediante la caracterización fenotípica asociada a su sobreexpresión en plantas del genotipo silvestre Col-0. Se realizó un primer análisis en una población de 65 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*HB16* en busca de posibles

alteraciones fenotípicas asociadas al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la planta o la inflorescencia (**Figura R-17**).

Se observó en la población T1 35S::*HB16* la presencia de diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración, siendo algunas de las líneas T1 tardías en comparación con el parental silvestre Col-0 (**Figura R-17**). En base a estos resultados, se seleccionaron 13 líneas T1 independientes que habían mostrado un fenotipo tardío. Se recogieron sus semillas individualmente para continuar con la caracterización.

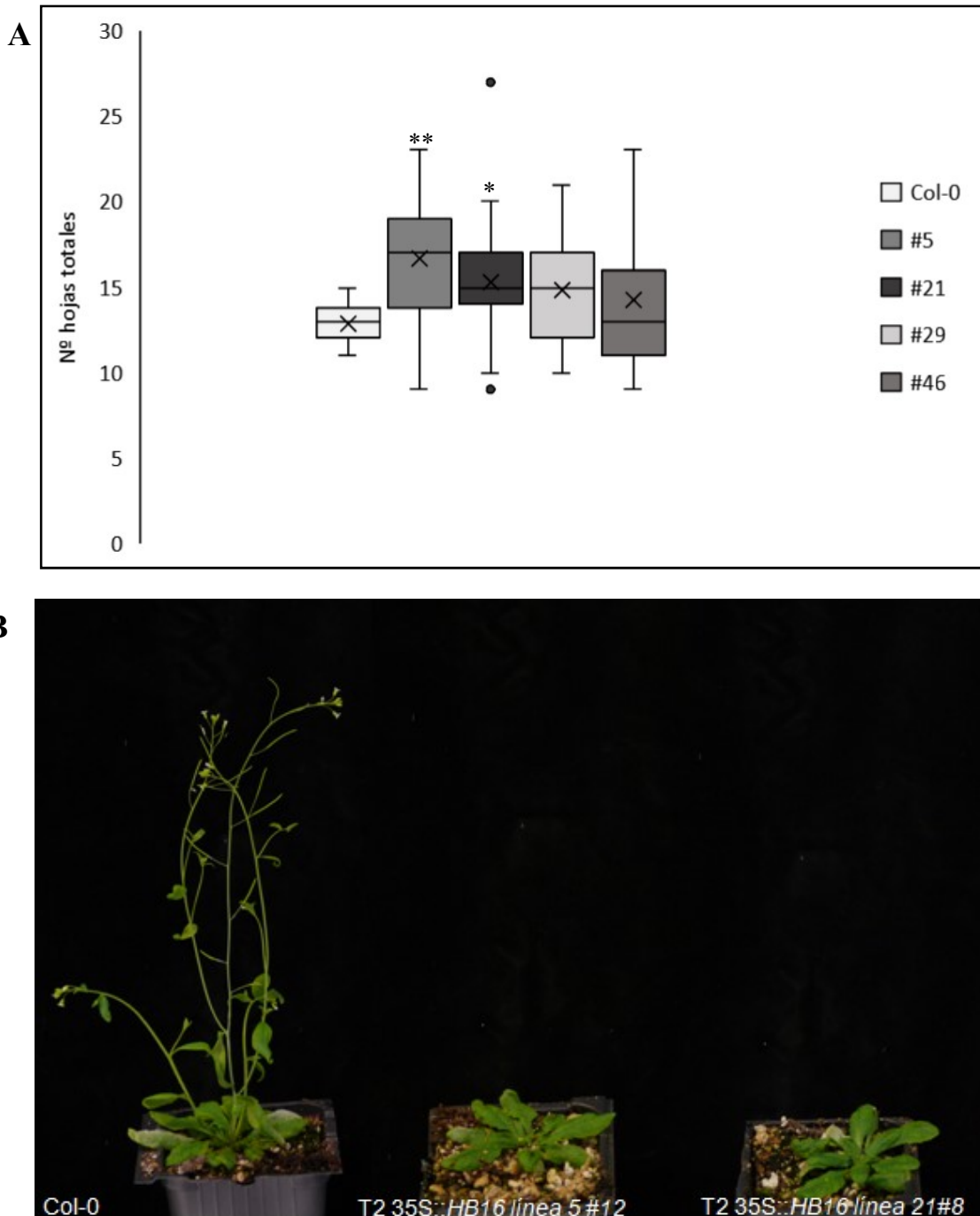


**Figura R-17. Fenotipo asociado a la generación T1 35S::*HB16*.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1.35S::*HB16*. B) Imágenes de plantas adultas tras 4 semanas de cultivo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $**p \leq 0.01$

Se sembraron 60 semillas por línea T2 en medio MS con Higromicina para poder analizar si los fenotipos descritos en esta primera generación eran heredables, y por tanto, causados por la

construcción; y para determinar el número de inserciones de cada una de estas líneas. Se seleccionaron cuatro líneas independientes con una única inserción del T-DNA.

Para cada una de estas cuatro líneas se sembraron un mínimo de 23 plantas (T2), que se cultivaron en condiciones de día largo. De las líneas seleccionadas, únicamente las líneas #5 y #21 presentaron diferencias significativas en el tiempo de floración, permitiendo confirmar el fenotipo de floración tardía que había sido observado en la generación anterior (**Figura R-18**).



**Figura R-18. Fenotipo asociado a las plantas T2 35S::HB16.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T2, líneas #5, #21, #29 y #46. B) Imágenes de plantas adultas tras 5 semanas en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de Bonferroni y Holm  $*p \leq 0.05$  y  $**p \leq 0.01$ .

#### 4. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *ABIS BINDING PROTEIN 2 (AFP2)*

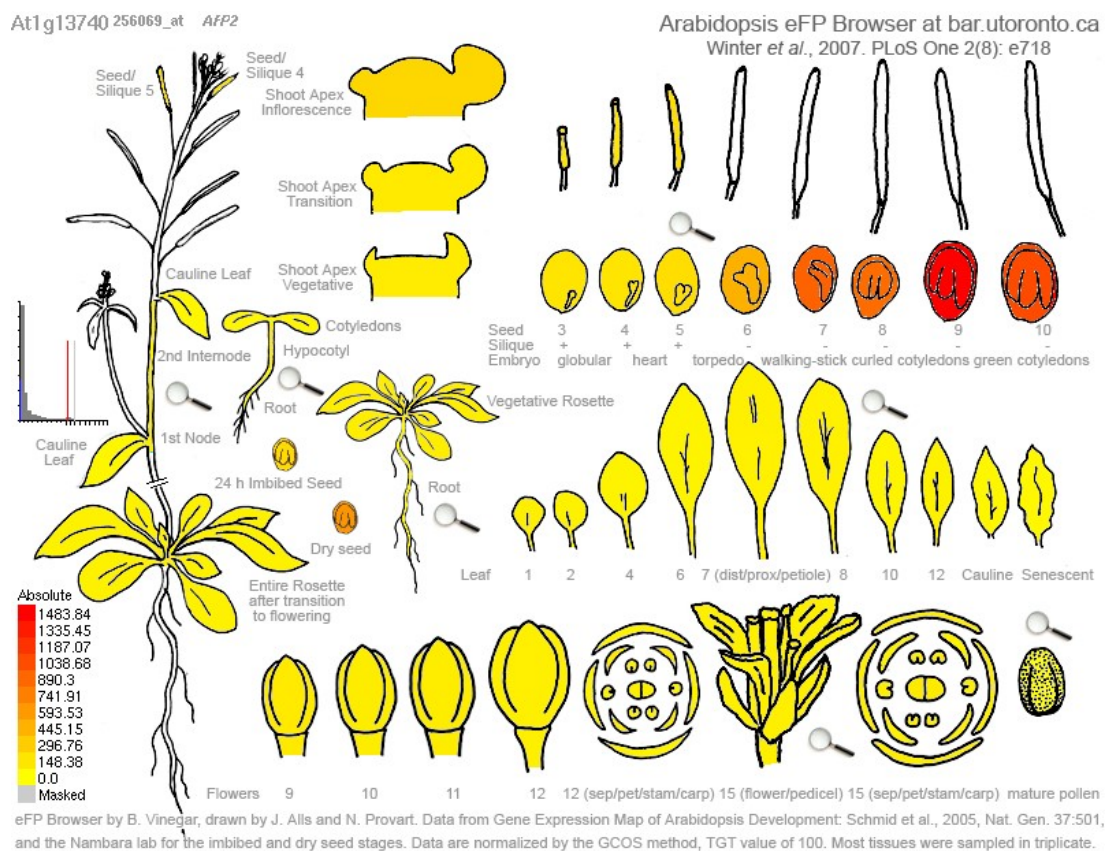
##### 4.1. Análisis del patrón de expresión de *AFP2*

El primer paso en la caracterización de *AFP2* fue estudiar su patrón de expresión, utilizando información de bases de datos públicas; así como el análisis mediante RT-qPCR de muestras del genotipo silvestre y de genotipos de pérdida de función y sobreexpresión de *TFL1*.

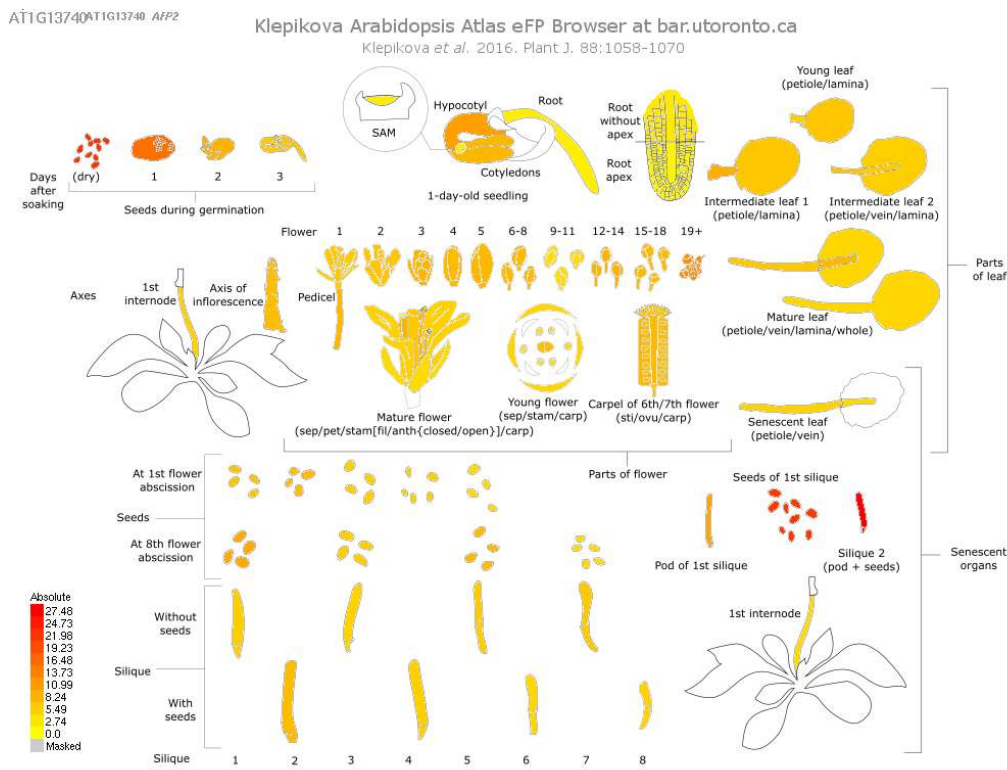
##### 4.1.1. Análisis del patrón de expresión de *AFP2* usando transcriptomas disponibles en bases de datos

Mediante el análisis de información de expresión de *AFP2* en bases de datos, pudimos observar que este gen se expresa con mayor intensidad en las semillas; y aunque también se localiza en otros tejidos, tanto durante el desarrollo vegetativo como durante el desarrollo reproductivo, su nivel de expresión en estos es considerablemente inferior (**Figuras R-19 y R-20**).

Cabe señalar que el nivel de expresión en el ápice del tallo, aunque no es muy elevado, sube con la transición floral en el ápice inflorescente, lo que recuerda a lo que ocurre con *TFL1*.



**Figura R-19. Patrón de expresión de *AFP2* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource (BAR)* [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *AFP2* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



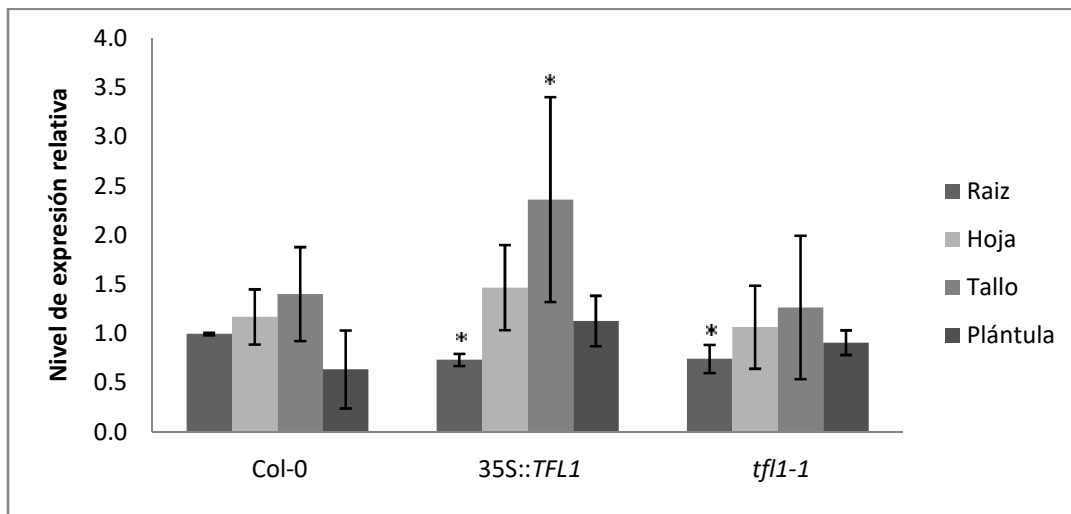
**Figura R-20. Patrón de expresión de *AFP2* en *Arabidopsis*.** Atlas Klepikova *Arabidopsis* extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron extraídos de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

#### 4.1.2. Análisis del patrón de expresión de *AFP2* mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo

Para llevar a cabo un análisis más completo de la expresión de *AFP2*, gen diana de *TFL1*, se estudió cómo varía esta en relación a cambios en la actividad de la proteína *TFL1*. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de RT-qPCR.

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión de *AFP2* en distintos tejidos de líneas de pérdida de función, mutante *tfl1-1*, y de ganancia de función, *35S::TFL1*. Como control se utilizó el genotipo silvestre Col-0. Se recogieron muestras a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Las muestras de plántula se recogieron a los 7 días tras la germinación; las muestras de tallo, sin hoja caulinar ni yemas axilares, y las de hoja de roseta, se recogieron a los 12 días tras la germinación; y las muestras de raíz se recogieron a los 21 días tras la germinación.

Se observó que la expresión de *AFP2* en los distintos genotipos se localiza principalmente en la hoja y el tallo. Además, se puede observar que la expresión en el tallo se incrementa significativamente en el fondo genético *35S::TFL1*; mientras que la expresión en la raíz disminuye significativamente tanto en el fondo mutante *tfl1-1* como en *35S::TFL1* (Figura R-21).

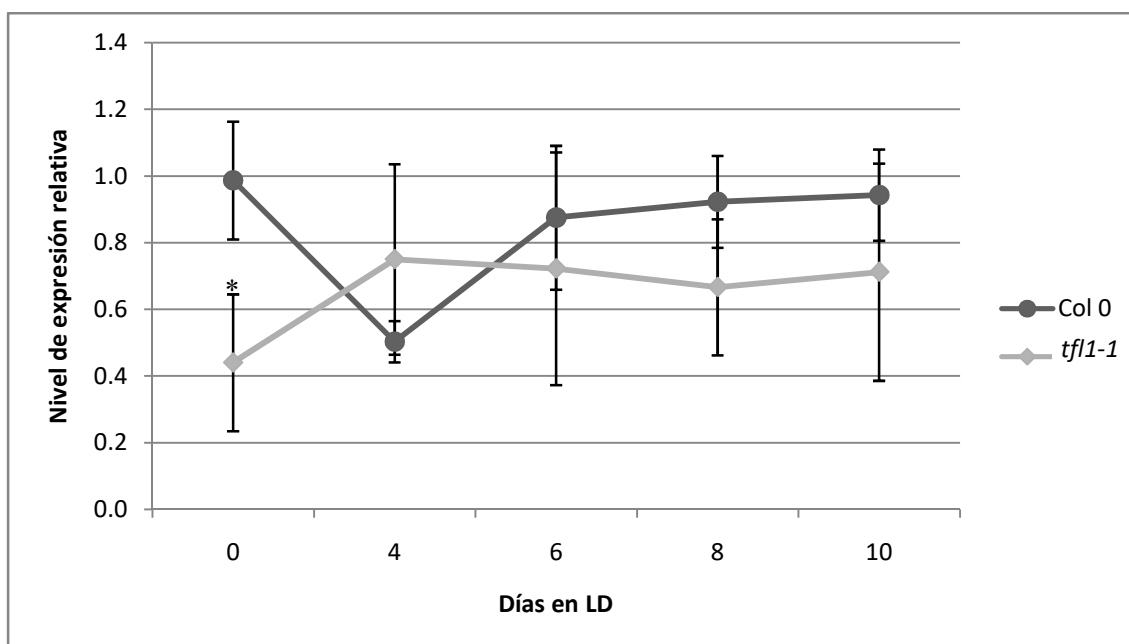


**Figura R-21. Expresión relativa de *AFP2* en diferentes tejidos.** Las muestras de cada tejido fueron recogidas a partir de plantas en cultivo *in vitro* cultivadas en condiciones de día largo. Los niveles de expresión de *AFP2* se midieron mediante RT-qPCR. Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tejido y cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas de cada réplica biológica. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo. Las barras de error representan la desviación estándar. Nivel de significatividad estadística test de Tukey \* $p \leq 0.05$ .

#### 4.1.3. Análisis del patrón de expresión de *AFP4* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR

Para analizar la variación en el nivel de expresión de *AFP2* en el ápice del tallo durante el desarrollo se recogieron muestras de ápices de plantas silvestres Col-0 y de mutantes *tf1-1* en distintas fases de desarrollo. Para ello, las plantas se sembraron, y tras 3 días de estratificación a 4°C se cultivaron durante 3 semanas en día corto, transfiriéndose posteriormente a día largo para inducir la floración. Consideramos este momento como T0. Las muestras de ápice se recogieron a T0, y a los 4, 6, 8 y 10 días desde su paso a día largo.

La expresión de *AFP2* parece mostrar una tendencia opuesta en el genotipo silvestre Col-0 a su expresión en el mutante *tf1-1*. En Col-0 parece disminuir drásticamente en T4, previo a la fase de transición floral; y posteriormente, su nivel de expresión vuelve a incrementarse y a estabilizarse durante la fase reproductiva. Por el contrario, en el mutante *tf1-1*, el nivel de expresión de *AFP2* parece aumentar a T4 y estabilizarse luego, una vez iniciada la transición floral; y salvo los primeros tiempos, previos a la transición floral, su nivel de expresión a lo largo del desarrollo es inferior en el mutante *tf1-1* que en las plantas Col-0 (**Figura R-22**).



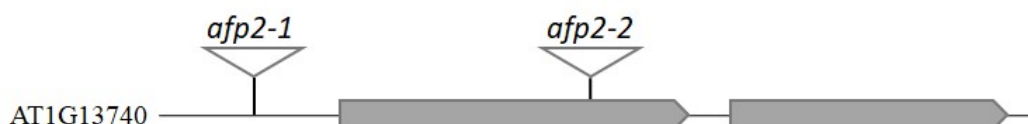
**Figura R-22. Expresión relativa de *AFP2* en Col-0 y el mutante *tfl1-1* en el ápice del tallo durante el desarrollo.** Evolución de la expresión de *AFP2* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo. Las plantas se cultivaron 3 semanas en día corto y, tras este tiempo, fueron transferidas a día largo. Las muestras se recogieron a partir de este momento y durante un periodo de tiempo de 10 días. Los niveles de expresión de *AFP2* se midieron mediante RT-qPCR. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Se analizó 1 réplica biológica por cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas en cada réplica biológica. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $*p \leq 0.05$ .

#### 4.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *AFP2*

##### 4.2.1. Identificación y análisis de los mutantes *afp2*

Para profundizar en el estudio de la función de *AFP2* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*, decidimos llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función del gen.

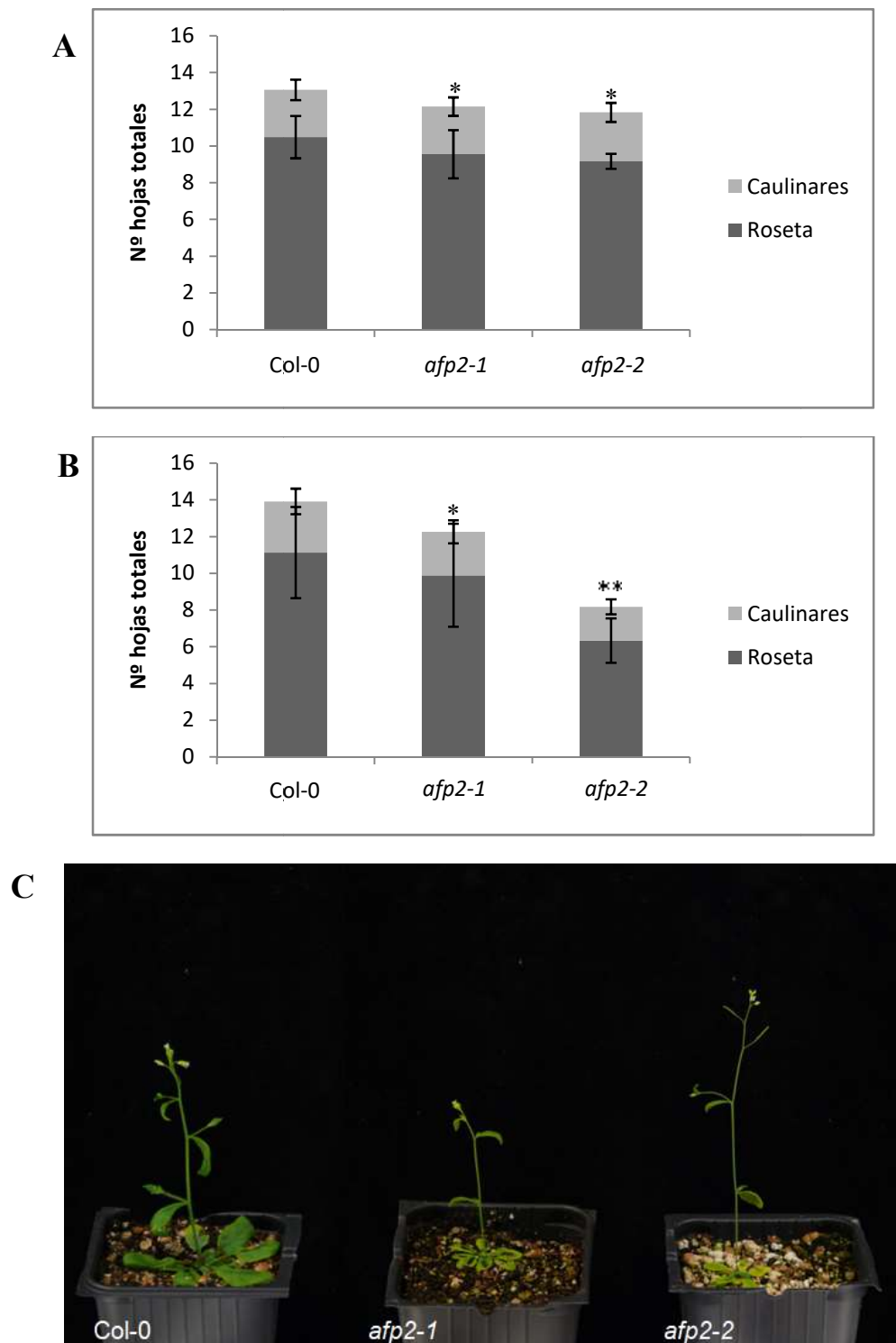
Para ello se identificaron y se obtuvieron dos mutantes de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de las líneas mutantes *afp2-1* (SALK\_131676) y *afp2-2* (SALK\_145086C) (**Figura R-22**) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA mediante PCR con cebadores específicos. De este modo se seleccionaron para cada una de las líneas mutantes aquellas plantas que portaban la inserción del T-DNA en homocigosis.



**Figura 22. Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes estudiados.** Posiciones de las inserciones de T-DNA en los mutantes *afp2-1* y *afp2-2*.

Para la caracterización fenotípica de cada uno de los mutantes se sembraron un mínimo de 20 plantas por genotipo en condiciones de día largo, en dos experimentos independientes (réplicas

biológicas). El tiempo de floración se midió como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se analizó la arquitectura del mutante con el fin de identificar otras posibles alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función.



**Figura R-24. Fenotipo asociado a los mutante *afp2* en condiciones de fotoperiodo de día largo.** A y B) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. En las gráficas se representan dos experimentos independientes. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal ( $n \geq 20$ ). Las barras de error representan la



desviación estándar. C) Imágenes de los mutantes tras 4 semanas creciendo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de Tukey \* $p \leq 0.05$  y \*\* $p \leq 0.01$ .

En ambos experimentos se pudo observar la existencia de diferencias significativas en el tiempo de floración, mostrando ambos mutantes floración temprana respecto al parental silvestre Col-0. Asimismo, se observó que las hojas de los mutantes parecen tener un menor tamaño que las del genotipo silvestre (**Figura R-24**).

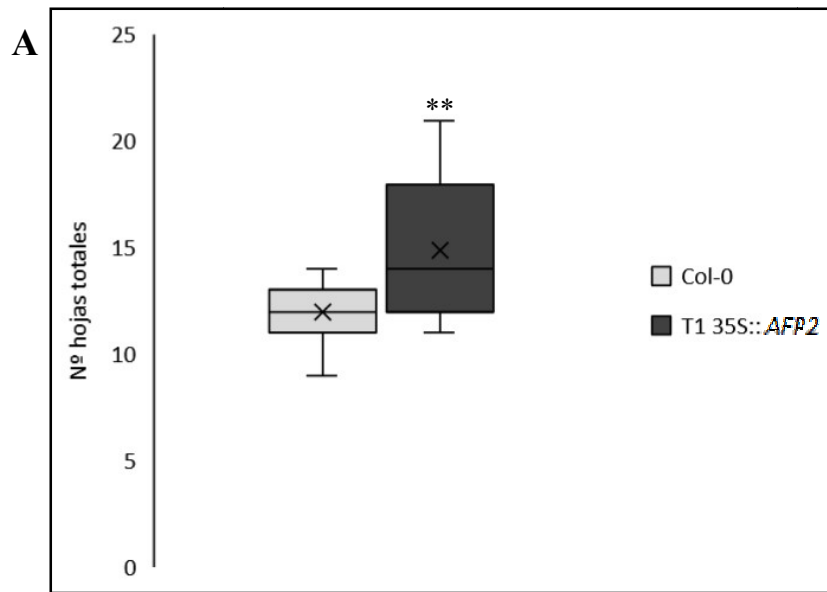
#### 4.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *AFP2*

Con el objetivo de profundizar en la función de *AFP2*, también se llevó a cabo la caracterización fenotípica asociada a su expresión constitutiva en plantas del genotipo silvestre Col-0. Se realizó un primer análisis en una población de 71 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*AFP2* en busca de fenotipos asociados al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la planta o la inflorescencia (**Figura R-25**).

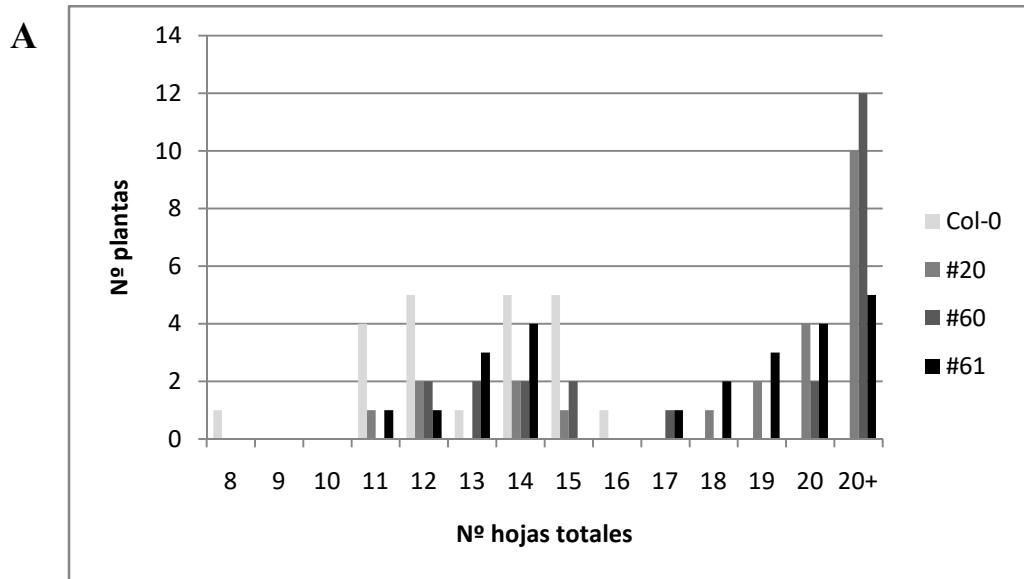
Se observó en la población T1 35S::*AFP2* la presencia de diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración, siendo algunas de las líneas T1 tardías en comparación con el parental silvestre Col-0 (**Figura R-25**), aunque no mostrando alteraciones en la arquitectura de la planta. En base a estos resultados, se seleccionaron 7 líneas T1 independientes que habían mostrado un fenotipo tardío para continuar con la caracterización fenotípica.

Se sembraron 60 semillas por línea en medio MS con Higromicina para poder analizar si los fenotipos descritos en esta primera generación eran heredables, y por tanto, causados por la construcción; y para determinar el número de inserciones de cada una de estas líneas. Se seleccionaron tres líneas independientes con una única inserción del T-DNA. Para cada una de estas líneas se sembraron un mínimo de 23 plantas, que se cultivaron en condiciones de día largo.

Los resultados preliminares muestran una clara tendencia a la floración tardía en las plantas T2, lo que confirma el fenotipo de tiempo de floración que había sido observado en la generación anterior (**Figura R-26**).



**Figura R-25. Fenotipo asociado a la generación T1 35S::AFP2.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1.35S::AFP2. B) Imágenes de plantas adultas tras 4 semanas de cultivo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $**p \leq 0.01$



**B**



**Figura R-26. Fenotipo asociado a las plantas T2 35S::AFP2.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T2, líneas #20, #60 y #61. La gráfica muestra una distribución de las poblaciones T2 según el número de plantas que han alcanzado un determinado número de hojas totales (roseta y caulinares) antes de la floración. B) Imágenes de plantas adultas tras 5 semanas en condiciones de día largo.

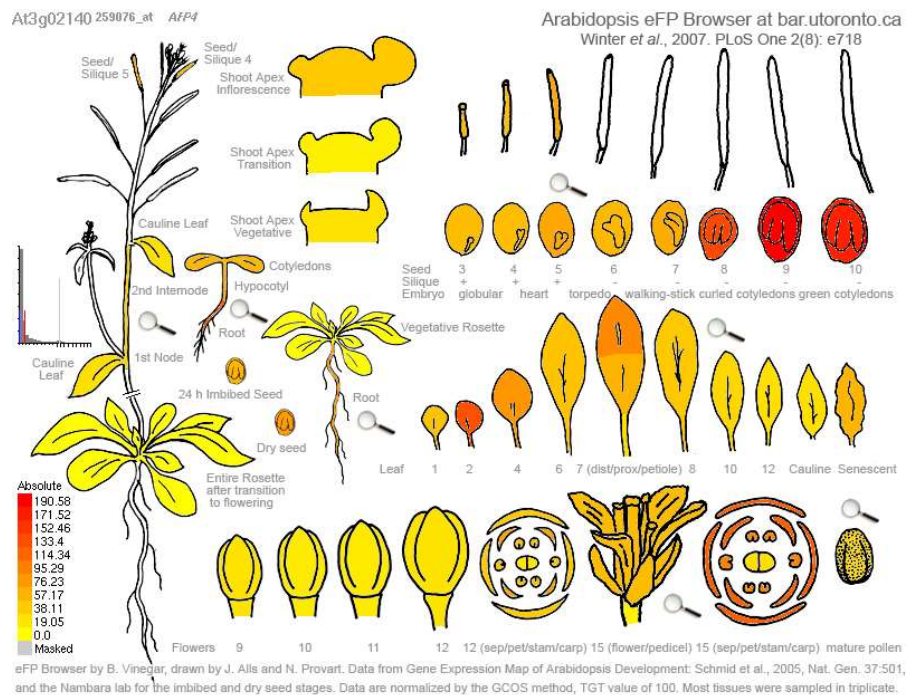
## 5. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *ABI5 BINDING PROTEIN 4 (AFP4)*

### 5.1. Análisis del patrón de expresión de *AFP4*

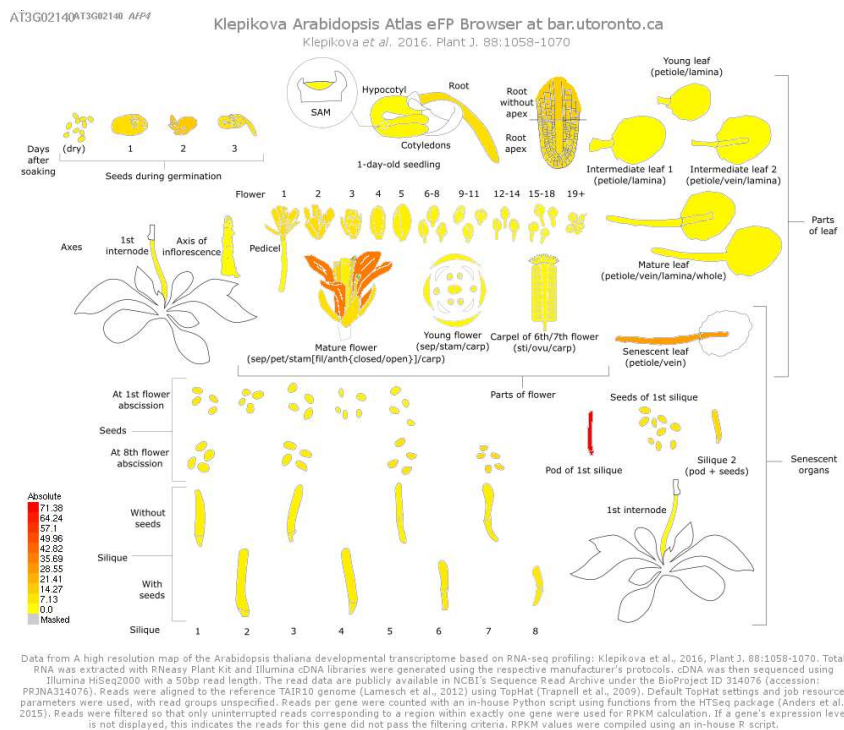
El primer paso en la caracterización de *AFP4* fue estudiar su patrón de expresión utilizando la información de bases de datos públicas.

Mediante el análisis de información de expresión de *AFP4* disponible en bases de datos pudimos observar que este gen se expresa principalmente en semillas, en hojas y en pétalos de flores maduras. Cabe señalar que el nivel de expresión en el ápice del tallo, aunque no es muy

elevado, sube con la transición floral en el ápice inflorescente, lo que recuerda a lo que ocurre en la expresión de *TFL1* (Figuras R-27 y R-28).



**Figura R-27. Patrón de expresión de *AFP4* en *Arabidopsis*.** Figura tomada del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca); resultado del análisis por microarrays del patrón de expresión de *AFP4* en diferentes órganos de *Arabidopsis thaliana*.



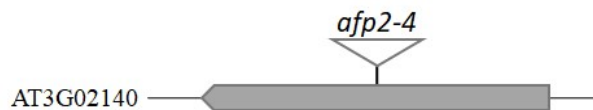
**Figura R-28. Patrón de expresión de *AFP4* en *Arabidopsis*.** Atlas Klepikova Arabidopsis extraído del *Bio-Analytic Resource* (BAR) [www.bar.utoronto.ca](http://www.bar.utoronto.ca). Los datos fueron extraídos de un mapa de alta resolución del transcriptoma durante el desarrollo de *A. thaliana* basado en perfiles de RNA-seq realizados por Klepikova et al., 2016.

## 5.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *AFP4*

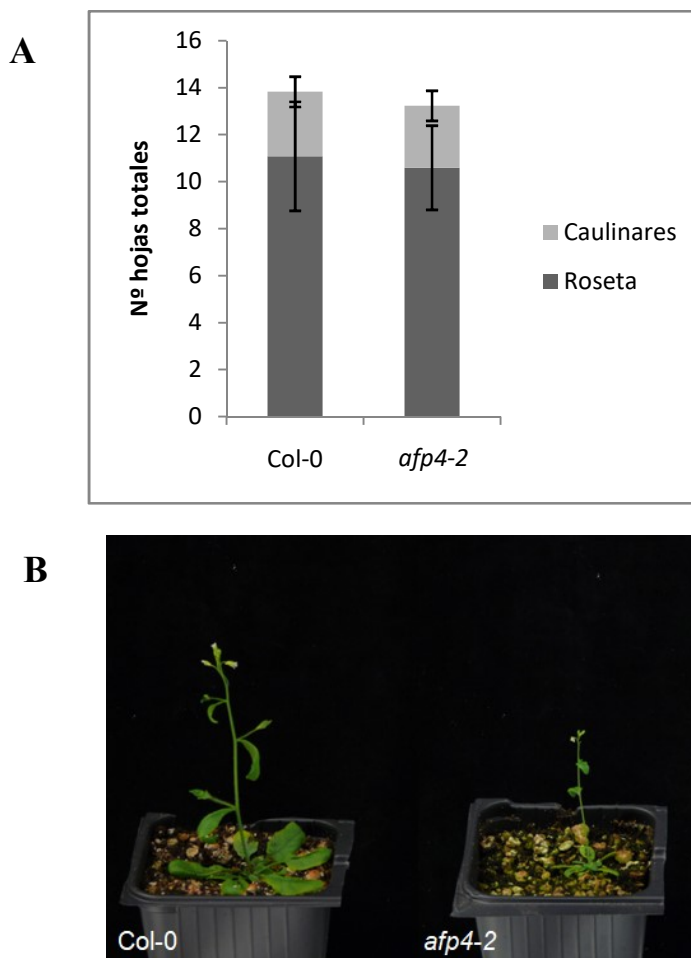
### 5.2.1. Identificación y análisis de los mutantes *afp4*

Para profundizar en el estudio de la función de *AFP4* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función.

Para ello se identificó y se obtuvo un mutante de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de la línea mutante *afp4-2* (SALK\_208284C) (**Figura R-29**) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA mediante PCR con cebadores específicos. De este modo se seleccionaron aquellas plantas que portaban la inserción del T-DNA en homocigosis.



**Figura R-29.** Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes estudiados. Posiciones de las inserciones de T-DNA en el mutante *afp4-2*.



**Figura R-30.** Fenotipo asociado a los mutante *afp4* en condiciones de fotoperiodo de día largo. A) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal

( $n \geq 20$ ). Las barras de error representan la desviación estándar. B) Imágenes de los mutantes tras 4 semanas creciendo en condiciones de día largo.

Para la caracterización fenotípica del mutante se sembraron un mínimo de 47 plantas en condiciones de día largo. El tiempo de floración se estimó como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se analizó la arquitectura del mutante con el fin de identificar otras posibles alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función.

Ninguno de los mutantes *afp4* mostró diferencias significativas en el tiempo de floración respecto al parental silvestre Col-0 (**Figura R-30**). No obstante, se observó que las hojas del mutante *afp4-2* parecen tener un menor tamaño que las del genotipo silvestre Col-0, tal como se muestra más arriba para los mutantes *afp2* (**Figuras R-24 y R-30**).

### 5.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *AFP4*

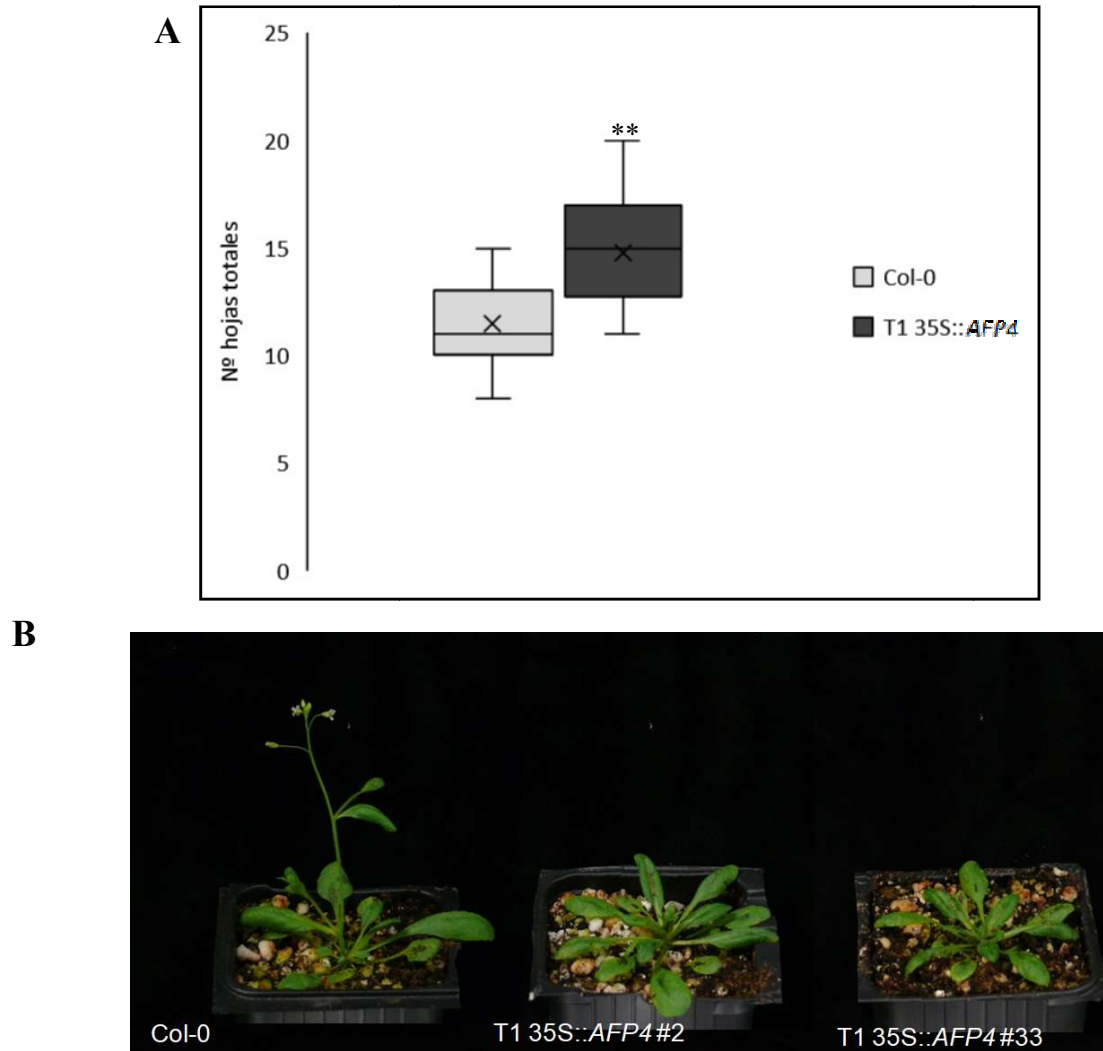
A pesar de no observar ningún fenotipo relevante ni en el tiempo de floración en el mutante de pérdida de función *afp4-2*, decidimos intentar profundizar en la función de *AFP4*, mediante la caracterización fenotípica asociada a su sobreexpresión en plantas del genotipo silvestre Col-0. Se realizó un primer análisis en una población de 51 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*AFP4* en busca de fenotipos asociados al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la planta o la inflorescencia.

Se observó en la población T1 35S::*AFP4* la presencia de diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración, siendo algunas de las líneas T1 tardías en comparación con el parental silvestre Col-0 (**Figura R-31**). En base a estos resultados, se seleccionaron 13 líneas T1 independientes que habían mostrado un fenotipo tardío. Se recogieron sus semillas individualmente para continuar con el proceso de caracterización.

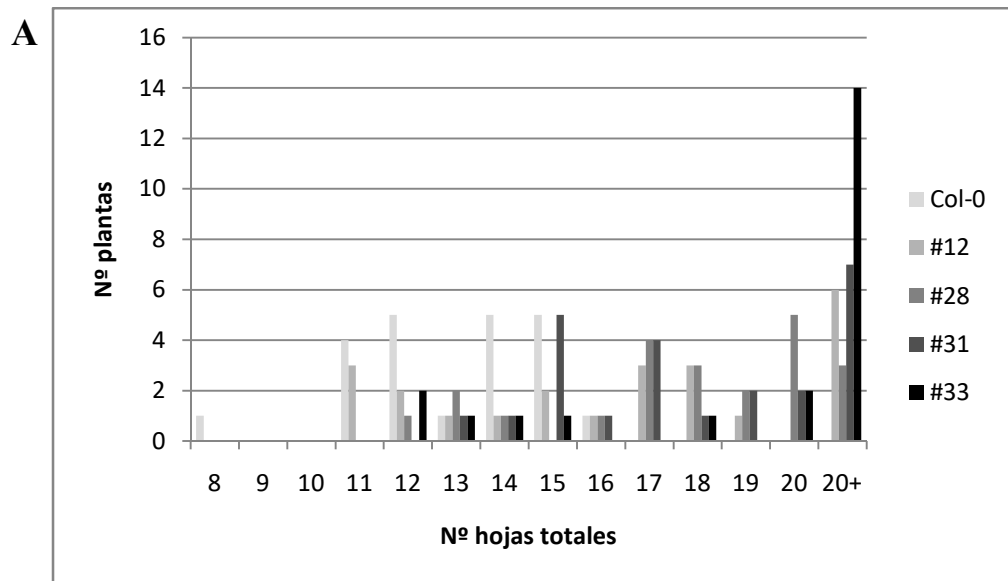
Se sembraron 60 semillas por línea en medio MS con Higromicina para poder analizar si los fenotipos descritos en esta primera generación eran heredables, y por tanto, causados por la construcción; y para determinar el número de inserciones de cada una de estas líneas. Se seleccionaron cuatro líneas independientes con una única inserción del T-DNA.

Para cada una de estas líneas se sembraron un mínimo de 23 plantas (T2), que se cultivaron en condiciones de día largo, permitiendo confirmar el fenotipo de floración tardía que había sido observado en la generación anterior (**Figura R-32**).

Los resultados preliminares muestran una clara tendencia a la floración tardía en las plantas T2, lo que confirma el fenotipo de tiempo de floración que se había observado en la generación anterior (**Figura R-32**).



**Figura R-31. Fenotipo asociado a la generación T1 35S::AFP4.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1.35S::AFP4. B) Imágenes de plantas adultas tras 4 semanas de cultivo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $**p \leq 0.01$ .



**B**



**Figura R-32. Fenotipo asociado a las plantas T2 35S::AFP4.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T2, líneas #12, #28, #31 y #33. La gráfica muestra una distribución de las poblaciones T2 según el número de plantas que han alcanzado un determinado número de hojas totales (roseta y caulinares) antes de la floración. B) Imágenes de plantas adultas tras 5 semanas en condiciones de día largo.

## 6. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *G-BOX BINDING FACTOR 3* (*GBF3*)

### 6.1. Análisis del patrón de expresión de *GBF3*

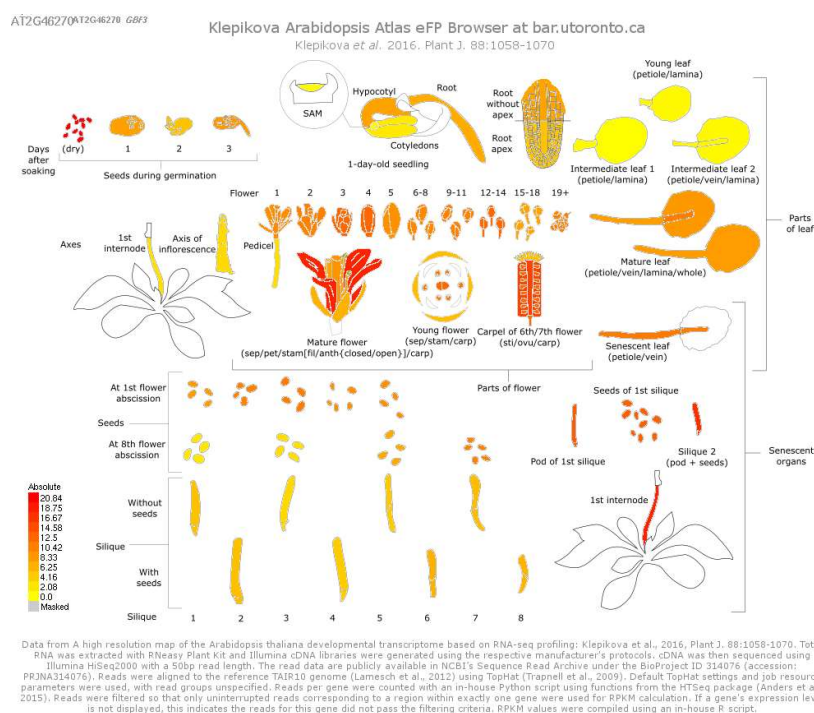
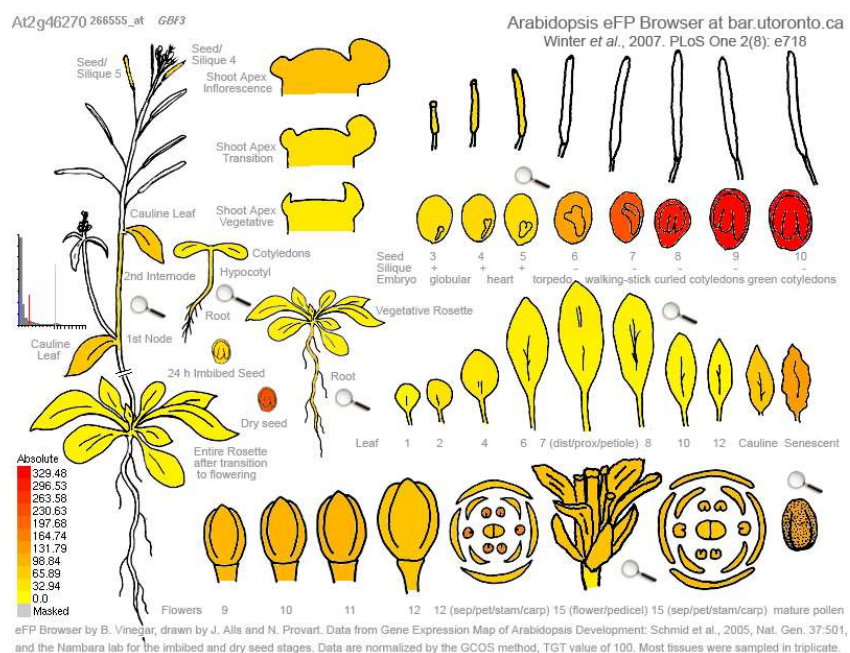
El primer paso en la caracterización de *GBF3* fue estudiar su patrón de expresión, utilizando información de bases de datos públicas; así como el análisis mediante RT-qPCR de muestras del genotipo silvestre y de genotipos de pérdida de función y sobreexpresión de *TFL1*.

#### 6.1.1. Análisis del patrón de expresión de *GBF3* usando transcriptomas disponibles en bases de datos

Mediante el análisis de información de expresión de *GBF3* disponible en bases de datos pudimos observar que este gen se expresa con mayor intensidad en las semillas y las flores, principalmente los pétalos; pero también se encuentra presente en otros tejidos, tanto durante el



desarrollo vegetativo como durante el desarrollo reproductivo (**Figura R-33 y R-34**). Cabe señalar que el nivel de expresión en el ápice del tallo, aunque no muy elevado, sube con la transición floral en el ápice inflorescente (**Figura R-33**), lo que recuerda a lo que sucede con la expresión de *TFL1*.

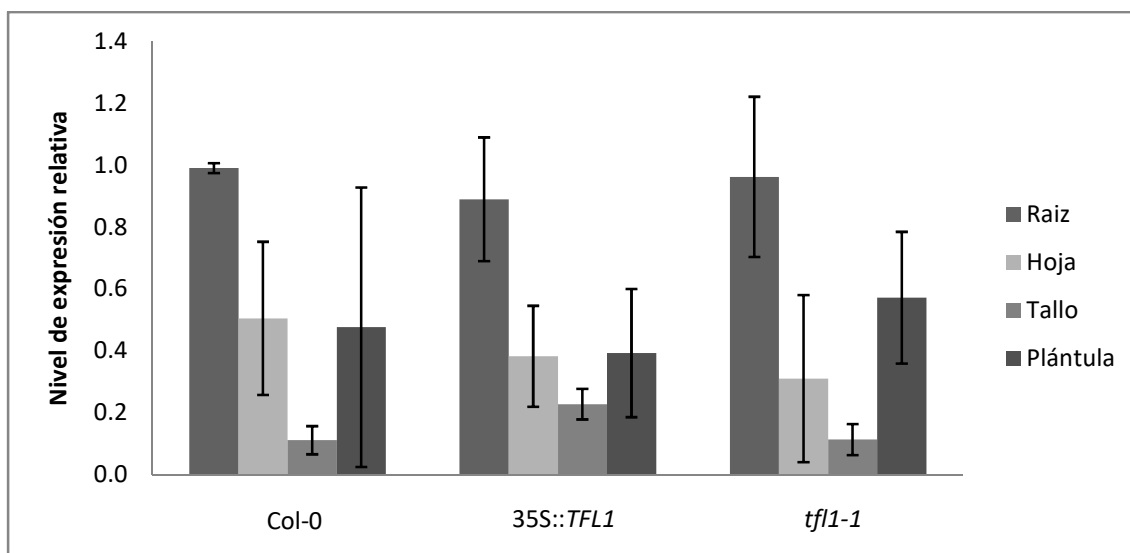


### 6.1.2. Análisis del patrón de expresión de *GBF3* mediante RT-qPCR en diferentes tejidos durante el desarrollo vegetativo

Para llevar a cabo un análisis más completo de la expresión de *GBF3*, gen diana de TFL1, se estudió cómo varía esta en relación a cambios en la actividad de la proteína TFL1. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de RT-qPCR.

En primer lugar, se estudió el patrón de expresión de *GBF3* en distintos tejidos de líneas de pérdida de función, mutante *tfl1-1*, y de ganancia de función, *35S::TFL1*. Como control se utilizó el genotipo silvestre Col-0. Se recogieron muestras a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Las muestras de plántula se recogieron a los 7 días tras la germinación; las muestras de tallo, sin hoja caulinar ni yemas axilares, y las de hoja de roseta, se recogieron a los 12 días tras la germinación; y las muestras de raíz se recogieron a los 21 días tras la germinación.

Se observó que la expresión de *GBF3* en los distintos genotipos se localiza principalmente en la raíz y en la plántula, disminuyendo en las hojas y reduciéndose considerablemente en el tallo. Esta expresión mantiene el mismo patrón sin diferencias significativas entre los diferentes fondos genéticos analizados (**Figura R-35**).



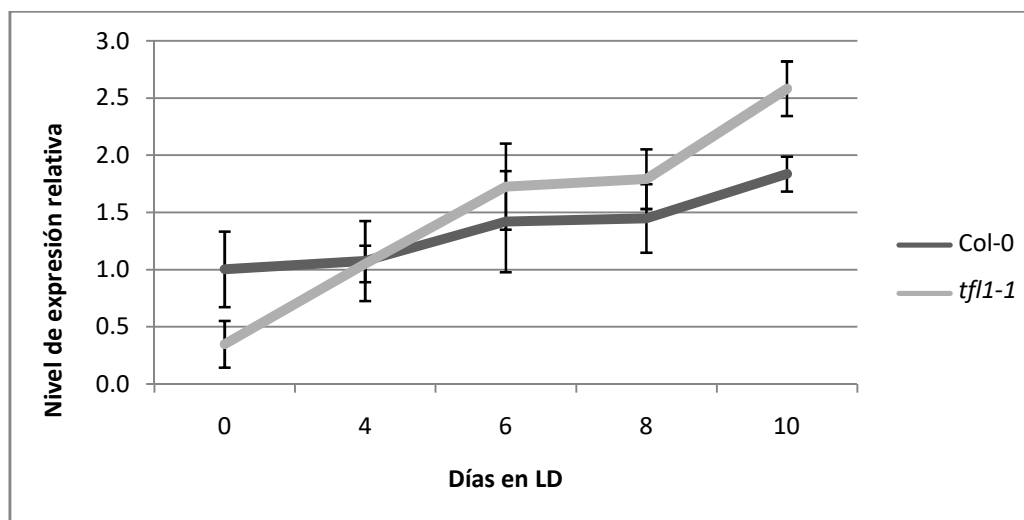
**Figura R-35. Expresión relativa de *GBF3* en diferentes tejidos.** Las muestras de cada tejido fueron recogidas a partir de plantas en cultivo *in vitro* cultivadas en condiciones de día largo. Los niveles de expresión de *GBF3* fueron medidos mediante RT-qPCR. Se analizaron 3 réplicas biológicas por cada tejido y cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas en cada réplica biológica. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo. Las barras de error representan la desviación estándar.

### 6.1.3. Análisis del patrón de expresión de *GBF3* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo mediante RT-qPCR

Para analizar la variación en el nivel de expresión de *GBF3* en el ápice del tallo durante el desarrollo se recogieron muestras de ápices de plantas silvestres Col-0 y de mutantes *tfl1-1* en distintas fases de desarrollo. Para ello, las plantas se sembraron, y tras 3 días de estratificación a 4°C se cultivaron durante 3 semanas en día corto, transfiriéndose posteriormente a día largo para inducir la floración. Consideramos este momento como T0. En las plantas Col-0 la transición

floral se inicia a los pocos días en esas condiciones de cultivo. Las muestras de ápice se recogieron a T0, y a los 4, 6, 8 y 10 días desde su paso a día largo.

Se observó que la expresión de *GBF3* en ambos genotipos tiene una tendencia similar, incrementándose a medida que se produce el proceso de la transición floral. Sin embargo, en general, en las plantas Col-0 parece que *GBF3* se expresa a menor nivel que en el mutante *tf1-1*, salvo en el T0 (**Figura R-36**).



**Figura R-36. Expresión relativa de *GBF3* en Col-0 y el mutante *tf1-1* en el ápice del tallo durante el desarrollo.** Evolución de la expresión de *GBF3* en el ápice del tallo en distintas fases del desarrollo. Las plantas se cultivaron 3 semanas en día corto y, tras este tiempo, fueron transferidas a día largo. Las muestras se recogieron a partir de este momento y durante un periodo de tiempo de 10 días. Los niveles de expresión de *GBF3* se midieron mediante RT-qPCR. El gen *TIP41* se utilizó como gen de referencia. Se analizó 1 réplica biológica por cada genotipo, así como 3 réplicas técnicas en cada réplica biológica. Para su representación gráfica se calcularon medias de expresión para cada tejido y genotipo.

## 6.2. Caracterización del fenotipo morfológico asociado a *GBF3*

### 6.2.1. Identificación y análisis del mutante *gbf3*

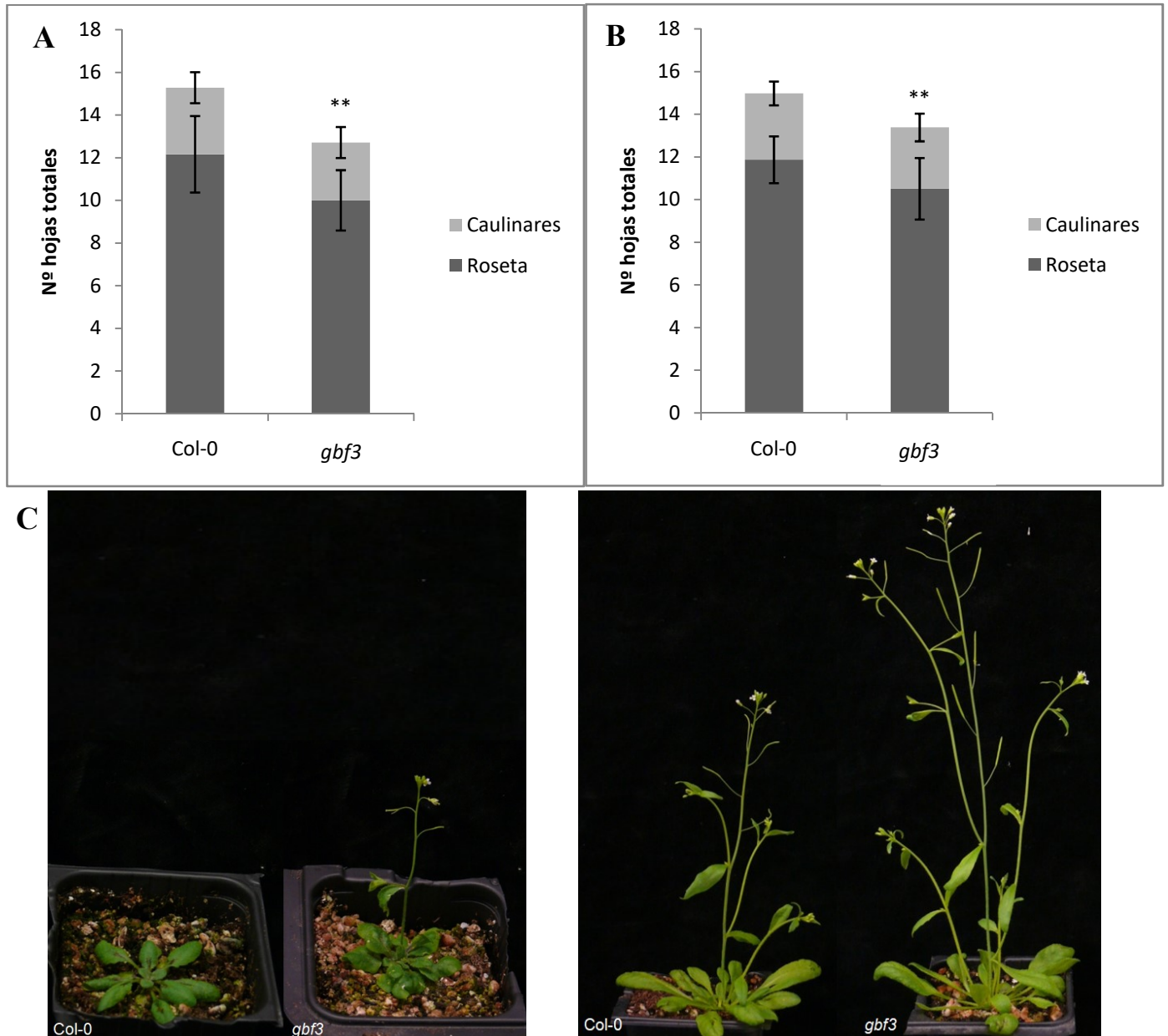
Para profundizar en el estudio de la función de *GBF3* y su posible papel en el desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis*, se decidió llevar a cabo la caracterización fenotípica de mutantes de pérdida de función.

Para ello se identificó y se obtuvo un mutante de inserción de T-DNA a partir de colecciones públicas. Las semillas de la línea mutante (SALK-082840C) (**Figura R-37**) se sembraron en condiciones de día largo y se analizó la presencia del T-DNA mediante PCR con cebadores específicos. De este modo se seleccionaron aquellas plantas que portaban la inserción del T-DNA en homocigosis.



**Figura R-37. Esquema de las inserciones de T-DNA en los mutantes estudiados.** Posiciones de las inserciones de T-DNA en el mutante *gbf3*.

Para la caracterización fenotípica del mutante se sembraron un mínimo de 24 plantas en condiciones de día largo, en dos experimentos independientes. El tiempo de floración se midió como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor. También se analizó la arquitectura del mutante con el fin de identificar otras posibles alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función (**Figura R-38**).

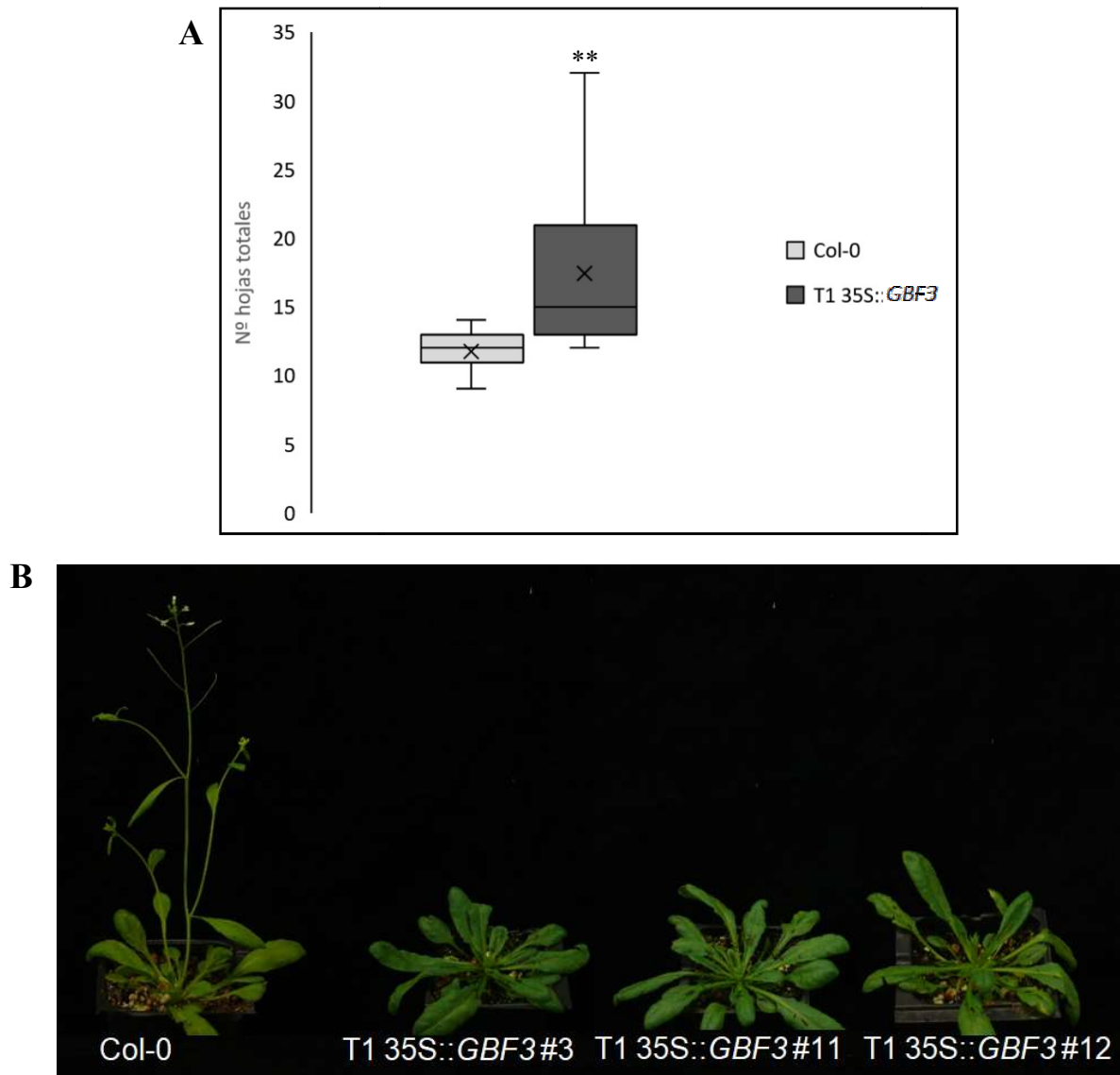


**Figura R-38. Fenotipo asociado a los mutante *gbf3* en condiciones de fotoperiodo de día largo.** A y B) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal. Se representa la media aritmética del número de hojas de roseta y del número de hojas caulinares del tallo principal ( $n \geq 24$ ). Las barras de error representan la desviación estándar. C) Imágenes de los mutantes tras 4 semanas (izquierda) y 8 semanas (derecha) creciendo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de t-student  $**p \leq 0.01$ .

En ambos experimentos se pudo observar la existencia de diferencias significativas en el tiempo de floración, mostrando los mutantes *gbf3* floración temprana respecto al parental silvestre Col-0.

### 6.2.2. Caracterización fenotípica de la sobreexpresión de *GBF3*

Con el objetivo de profundizar en la función de *GBF3*, también se llevó a cabo la caracterización fenotípica asociada a su sobreexpresión en plantas del genotipo silvestre Col-0. Se realizó un primer análisis en una población de 46 plantas T1 independientes transformadas con la construcción 35S::*GBF3* en busca de fenotipos asociados al tiempo de floración y/o a la arquitectura de la planta o la inflorescencia (**Figura R-39**).

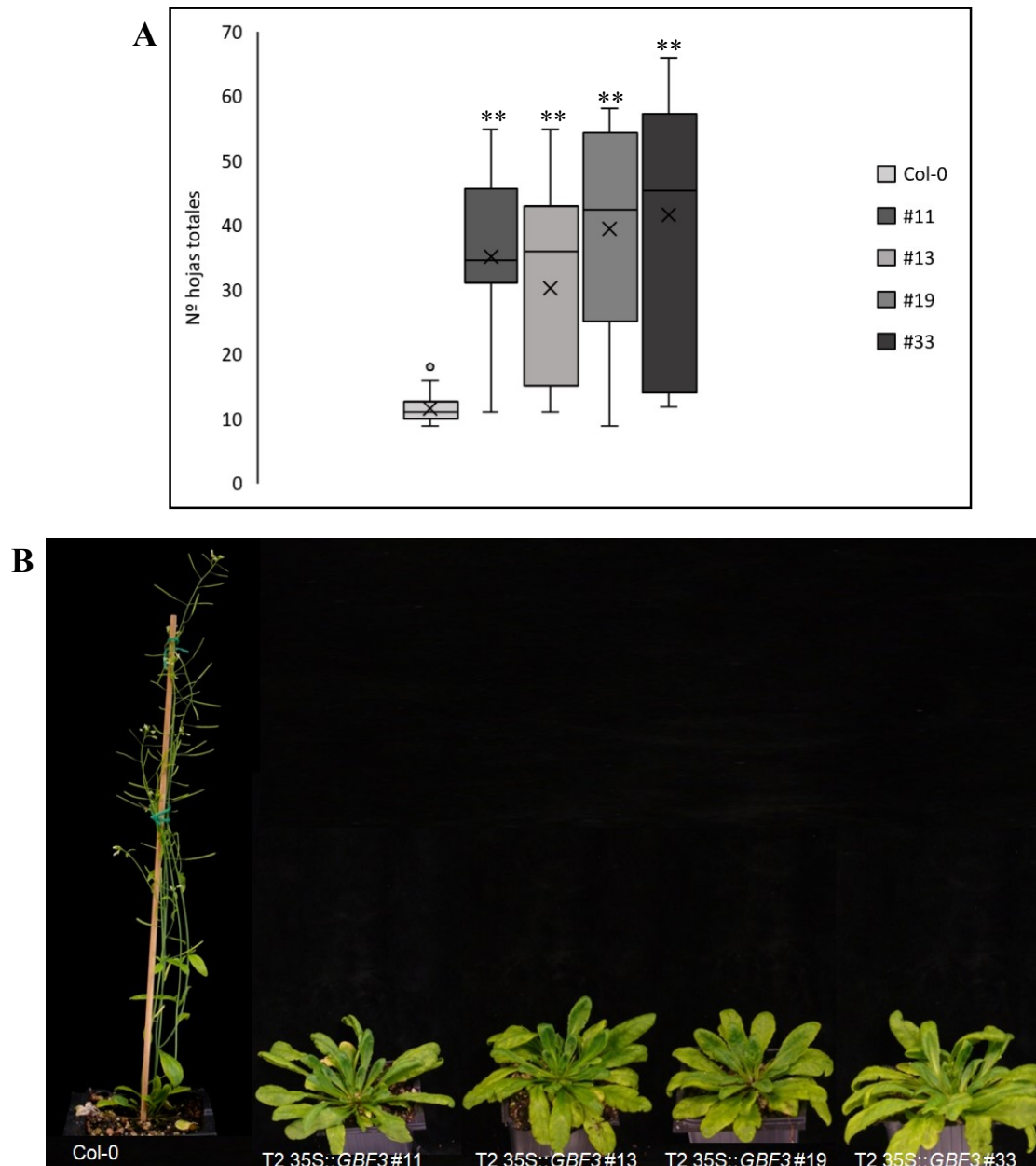


**Figura R-39. Fenotipo asociado a las plantas T1 35S::*GBF3*.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T1. B) Imágenes de las plantas adultas tres 4 semanas de cultivo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de student  $**p \leq 0.01$ .

Se observó en la población T1 35S::*GBF3* la presencia de diferencias significativas en cuanto a tiempo de floración, siendo algunas de las líneas T1 tardías respecto al parental silvestre Col-0 (**Figura R-39**). En vista de estos resultados, se seleccionaron 8 líneas T1 independientes que habían mostrado un fenotipo tardío para continuar con la caracterización.

Se sembraron 60 semillas por línea T2 en medio MS con Higromicina para poder analizar si los fenotipos descritos en esta primera generación eran heredables, y por tanto, causados por la

construcción; y para determinar el número de inserciones de cada una de estas líneas. Se seleccionaron cuatro líneas independientes con una única inserción del T-DNA. Para cada una de estas líneas se sembraron un mínimo de 23 plantas (T2), que se cultivaron en condiciones de día largo, permitiendo confirmar el fenotipo de floración tardía que había sido observado en la generación anterior (**Figura R-40**).



**Figura R-40. Fenotipo asociado a plantas T2 35S::GBF3.** A) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo en las plantas transgénicas T2, líneas #11, #13, #19 y #33. B) Imágenes de plantas adultas tras 4 semanas de cultivo en condiciones de día largo. Nivel de significatividad estadística test de Tukey  $**p \leq 0.01$ .

Este análisis también permitió identificar un nuevo fenotipo asociado a la arquitectura de la inflorescencia: una compresión extrema de los entrenudos de la inflorescencia. Esta compresión es evidente desde la producción de las primeras flores, permitiendo que las ramas de las coflorescencias laterales crezcan más rápido que el tallo principal y lo superen en altura (**Figura R-41, A y B**); y se mantiene durante todo el desarrollo de la inflorescencia.

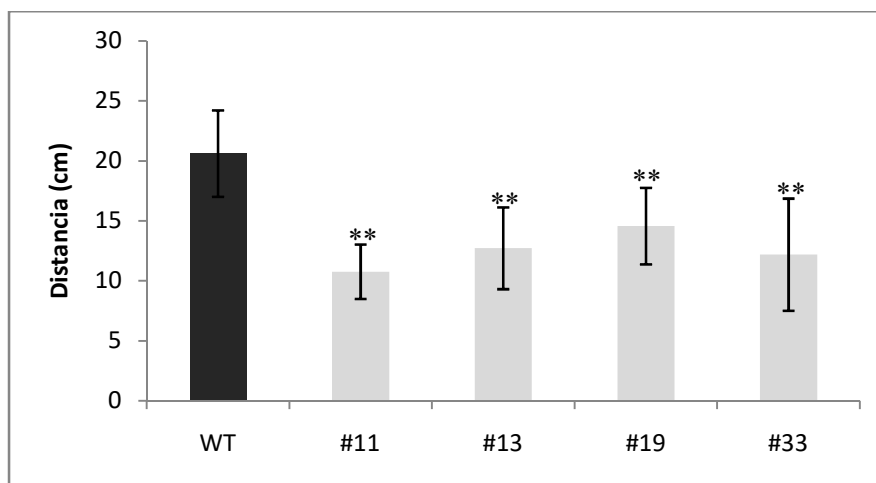


**Figura R-41. Alteraciones fenotípicas asociadas a T2 35S::GBF3.** A) Plantas adultas 35S::GBF3 muestran una compresión de los entrenudos del tallo de la inflorescencia principal que retrasa su crecimiento respecto a las coflorescencias. B) Imagen donde se aprecia con mayor claridad la compresión de los entrenudos del tallo principal en estadios tempranos de la fase de inflorescencia. C) Ápice principal comprimido y con crecimiento detenido. D) Comparación de la compresión entre el genotipo silvestre Col-0 (izquierda) y una planta 35S::GBF3 en estadios tardíos de la fase de inflorescencia (derecha). E) Comparación del grosor del tallo del genotipo parental Col-0 (izquierda) y una planta T2 35S::GBF3 (derecha). F) Detalle de tres flores de Col-0 (izquierda) y tres flores de una planta T2 35S::GBF3 (derecha).

En ocasiones, el fenotipo de *gbf3* llega a ser muy severo y algunos de estos ápices no progresan y el ápice principal acaba dañado y su crecimiento se detiene (**Figura R-41, C**). También se observó que las plantas que mostraban los fenotipos más severos de retraso del tiempo de floración presentaban tallos muy engrosados en comparación con su parental silvestre Col-0 (**Figura R-41, E**). Se ha observado también que en las inflorescencias comprimidas con frecuencia aparecen frutos más cortos y ligeramente engrosados (**Figura R-41, D**); asimismo se observó una diferencia en el tamaño de las flores, siendo ligeramente mayor en las líneas T2 35S::*GBF3* que el de las flores de las plantas de genotipo silvestre, y además se mostraban ligeramente más abiertas (**Figura R-41, F**).

Para poder hacer un análisis estadístico del fenotipo de compresión, se tomaron medidas de todas las plantas T2 de cada línea. También se genotiparon individualmente las plantas de cada línea estudiada, para poder diferenciar entre plantas silvestres, hemicigotas y homocigotas en las poblaciones T2. Este genotipado se llevó a cabo sembrando 60 semillas T3 en medio MS con Higromicina.

La medición de la compresión se realizó en el ápice principal, midiendo la distancia entre el nodo de la última coflorescencia y la vigésima flor. Los resultados mostraron que existe una diferencia significativa entre la longitud del tallo que sustenta las 20 primeras flores producidas en las plantas 35S::*GBF3* hemicigotas y homocigotas y la longitud del tallo equivalente de las plantas silvestres de las poblaciones T2 (**Figura R-42**). El fenotipo observado de compresión de la inflorescencia principal se observó también en las coflorescencias.



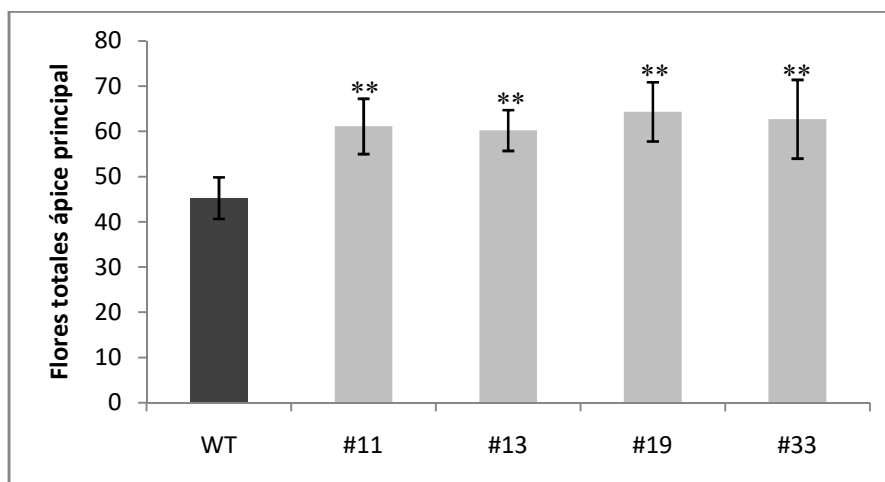
**Figura R-42. Alteraciones fenotípicas de 35S::*GBF3* relacionadas con la compresión de la inflorescencia principal.** Distancia (cm) entre la última hoja caulinar y la vigésima flor. Se representa la media aritmética de las distancias recogidas para cada línea. Las barras de error representan la desviación típica. Nivel de significatividad estadística test de Tukey  $**p \leq 0.01$ .

Asimismo, también se contabilizó el número total de flores en el tallo principal. Se observó que las plantas T2 35S::*GBF3* hemicigotas y homocigotas producen un número significativamente mayor de flores que las plantas del genotipo silvestre (**Figura R-43**).

Debido a las diferencias fenotípicas observadas en las flores y en los frutos (**Figura R-41, D y F**) decidimos recolectar semillas para observar si había también diferencias fenotípicas. Se recolectaron semillas de plantas individuales de distintas poblaciones segregantes T3 para las distintas líneas 35S::*GBF3*. Se midió el tamaño medio de entre 30-32 semillas recolectadas de 3 plantas independientes de genotipo silvestre y de 4 plantas que mostraban un fenotipo evidente

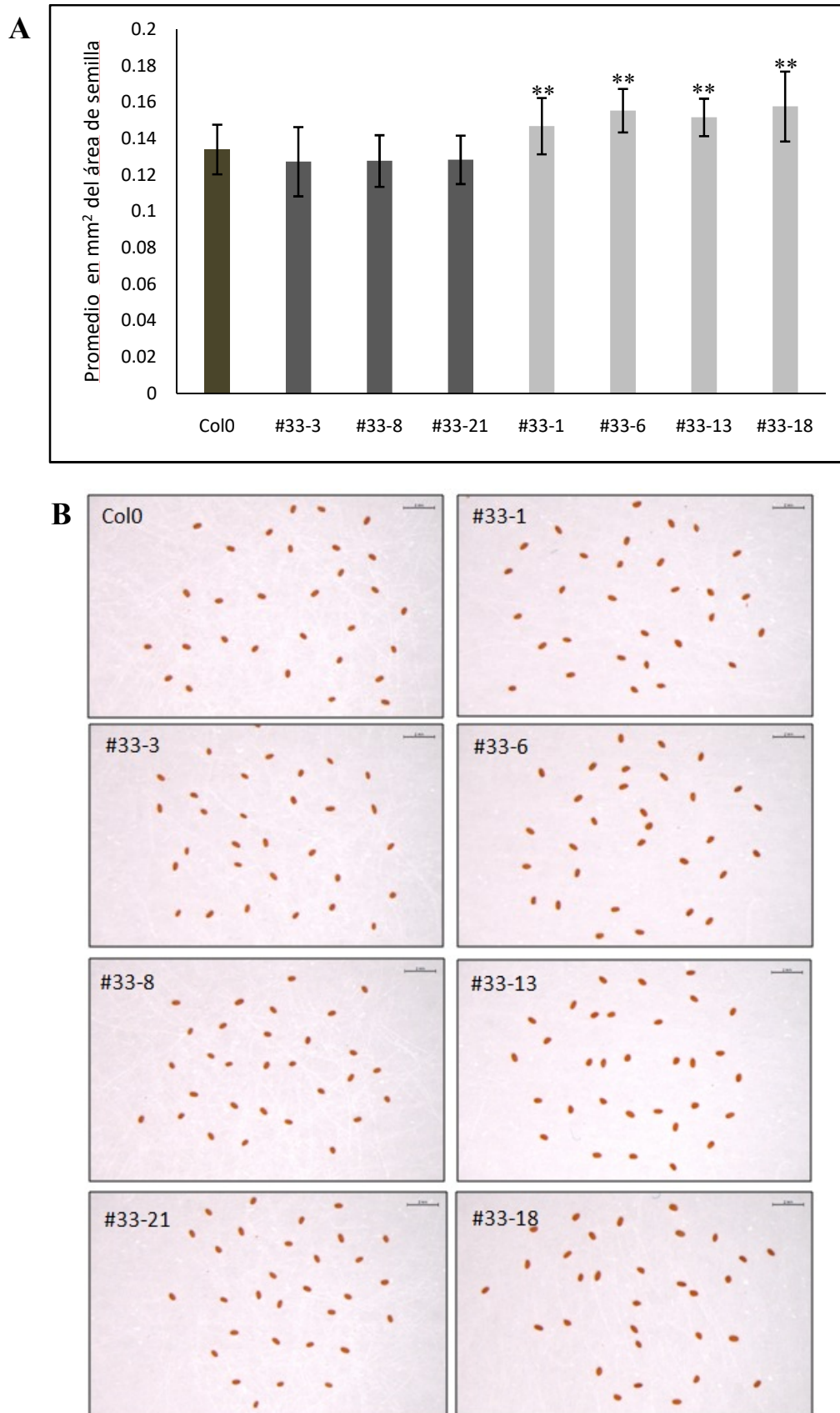


de compresión y retraso severo del tiempo de floración. También se tomaron semillas de 2 plantas Col-0 utilizadas como control positivo en los experimentos de floración.



**Figura R-43. Alteraciones fenotípicas de 35S::GBF3 relacionadas con el número total de flores.** Número total de flores en la inflorescencia principal. Se representa la media aritmética del número total de flores para cada línea. Las barras de error representan la desviación típica. Nivel de significatividad estadística test de Tukey \*\* $p \leq 0.01$ .

Las imágenes se tomaron en la lupa Leica MZ16F con el objetivo 0.5X y el posterior análisis del tamaño se llevó a cabo usando el programa Fiji para la medida del área proyectada de cada una de las semillas. Con este análisis pudimos observar que las semillas de plantas con fenotipo de floración tardía muestran un promedio de tamaño de semilla significativamente mayor que el de las plantas silvestres (**Figura R-44**).



**Figura R-44. Tamaño de la semilla de plantas T3 35S::*GBF3* de la línea #33.** A) Media del área proyectada de 30-32 semillas secas de cada línea. Las barras de error representan la desviación estándar. B) Semillas secas de Col-0 y de plantas T3: WT (3, 8, 21) y de plantas de fenotipo tardío (1, 6, 13, 18). Nivel de significatividad estadística test de Tukey \*\* $p \leq 0.01$

## DISCUSIÓN

La floración es un proceso clave para el éxito reproductivo de la planta, por lo que es de crucial importancia que se produzca en el momento adecuado. Esto se consigue gracias a complejas redes genéticas fuertemente interconectadas y que convergen en los llamados “genes integradores” (Srikanth y Schmid, 2011), que son los que finalmente regulan la expresión de los genes responsables de la iniciación de las flores.

Los resultados de este trabajo apoyan la idea de que la regulación de los procesos de desarrollo de la planta llevados a cabo por *TFL1* están relacionados con la ruta de señalización del ABA.

El análisis de expresión de algunos genes clave de la ruta de señalización del ABA (dianas directas de *TFL1*) realizados en este estudio han mostrado patrones de expresión que recuerdan al de *TFL1*. Entre los genes estudiados, observamos que *AFP2*, *AFP4* y *GBF3* muestran un aumento de su expresión en el ápice de la inflorescencia durante el inicio de la transición floral, similar al cambio de expresión que muestra *TFL1* durante la transición floral (Serrano-Mislata *et al.*, 2016), lo que sugiere un papel de estos genes relacionado con el de *TFL1* durante la transición floral.

*AFP2*, *AFP4* y *GBF3* también muestran una alta expresión en las semillas. Estudios recientes han mostrado que *TFL1* juega un papel importante en la regulación del tamaño de las semillas, participando en el control de la celularización del endospermo a través de su interacción con ABI5, un factor de transcripción de tipo bZIP clave en la respuesta del ABA (Cheng *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2020). Es posible que, para llevar a cabo este papel en la regulación de la semilla, *TFL1* actúe sobre otros genes de la ruta de señalización del ABA, pudiendo ser especialmente relevante *GBF3*, ya que plantas que expresan constitutivamente 35S::*GBF3* muestran un incremento significativo del tamaño de la semilla.

Otros datos provenientes de los perfiles de expresión obtenidos mediante RT-qPCR son más complicados de interpretar. En el estudio llevado a cabo en diferentes tejidos observamos variaciones en algunos genes: *HB16* disminuye su expresión en hoja de *tfl1-1*, pero aumenta en tallo; la expresión de *AFP2* es más baja en raíz tanto en las plantas *tfl1-1* como en las 35S::*TFL1*, además de aumentar su expresión en tallo en 35S::*TFL1*; mientras que *GBF3* aumenta su expresión en plántulas de *tfl1-1* y en tallo de 35S::*TFL1*. Con estos resultados no se observa un patrón claro que pueda esclarecer la relación entre *TFL1* los genes analizados. Estos datos quizás podrían mejorarse intentando disminuir la heterogeneidad de las muestras, especialmente en plántula, donde algunos genes como *GBF3* mostraban una alta variación debido posiblemente a la proporción raíz/tallo que hubiera en cada muestra.

Por otro lado, en los datos del análisis de expresión durante la transición floral podemos observar que *AFP2* muestra un nivel de expresión menor en *tfl1-1* que en el genotipo silvestre Col-0. Esto concuerda con la observación de que *TFL1* activa la expresión de estos genes durante la transición (Goretti *et al.*, 2020). Sin embargo, los datos del análisis de *HB16* y *GBF3* no apoyan que *TFL1* induzca la expresión de estos dos genes durante la transición. Siendo estos datos el resultado de un experimento de RT-qPCR con una sola réplica biológica, es posible que se requiera más información, otras réplicas, para poder hacer una confirmar la observación.

En cuanto a las líneas mutantes analizadas, sólo *afp2-1*, *afp2-2* y *gbf3* mostraron un fenotipo claro en cuanto al tiempo de floración. En el caso de los mutantes *afp2*, este fenotipo ya se había observado con anterioridad (Chang *et al.*, 2019). Esta falta de alteraciones fenotípicas en los

mutantes de los otros genes probablemente puede atribuirse a la presencia de redundancias genéticas que enmascaran la aparición de fenotipos mutantes.

Por el contrario, casi todas las líneas de sobreexpresión mostraron alteraciones fenotípicas claras. El único caso en que no observamos fenotipo fue en las plantas 35S::*P5CSI*. Para este tipo de plantas se había descrito anteriormente que mostraban un fenotipo de floración temprana, sin embargo, no hemos observado este fenotipo (Mattioli *et al.*, 2008, 2009). Sin embargo, dos de las líneas 35S::*P5CSI* producidas muestran un fenotipo de retraso del tiempo de floración, lo que podría deberse a un fenómeno de co-supresión que estaría interfiriendo con la expresión del gen endógeno (Waterhouse *et al.*, 2003).

Las líneas de sobreexpresión del resto de los genes de señalización de ABA estudiados mostraron un fenotipo de floración tardía, similar al que muestran las plantas 35S::*TFL1* (Ratcliffe *et al.*, 1998). Que la sobreexpresión de estos genes lleve a un retraso en la floración sugiere que su función sea represora de la floración, al igual que *TFL1* (Bradley *et al.*, 1997). Puesto que *TFL1* aparentemente induce, de manera directa, la expresión de estos genes (Goretti *et al.*, 2020), este resultado sugiere que estos genes podrían estar mediando la acción de *TFL1* para reprimir la floración.

Entre los genes estudiados, *GBF3* es el que ha mostrado resultados más sugerentes, ya que las alteraciones que provoca en el tiempo de floración, tanto en el mutante como en las líneas de sobreexpresión, así como los defectos en el desarrollo de la inflorescencia no habían sido descritos con anterioridad. Un efecto notable que causa su sobreexpresión es el drástico acortamiento de los entrenudos, exclusivamente del tallo de la inflorescencia que sustenta las flores. En otros mutantes con defectos de compresión se han observado cambios en hormonas, por ejemplo, cambios en los niveles de brasinoesteroides (Azpiroz *et al.*, 1998; Noguchi *et al.*, 1999); o de giberelinas (Fukazawa *et al.*, 2000). Además, la inflorescencia de las plantas 35S::*GBF3* produce un número de flores significativamente mayor que la de las del genotipo silvestre Col-0, lo que indica que el meristemo de inflorescencia de estas plantas permanece activo durante más tiempo y sugiere que el GPA de estas plantas está retrasado (Balanza *et al.*, 2018).

En resumen, en este trabajo se ha profundizado en la relación entre *TFL1* y la ruta de señalización del ABA. Se ha observado que algunos de los genes clave de esta ruta tienen patrones de expresión que se solapan con el de *TFL1*, lo cual sugiere que *TFL1* actúa sobre ellos en estos tejidos. También se ha observado que la sobreexpresión de estos genes da lugar a fenotipos similares a la sobreexpresión de *TFL1*. Este trabajo, además, ha permitido observar los efectos que tiene *GBF3* tanto en el tiempo de floración como en la arquitectura de la planta, abriendo la puerta a futuras investigaciones.

Se han descrito genes de la misma familia que *GBF3* que actúan en diferentes procesos de desarrollo: *COP1* interacciona con *GBF1* durante el desarrollo de la plántula (Mallappa *et al.*, 2008) y *GBF1* y *GBF2* participan en la regulación de genes de identidad de tejidos vasculares (Smit *et al.*, 2020). Dado que estas proteínas actúan formando homodímeros y heterodímeros y que las tres son dianas directas de *TFL1* (Goretti *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020a) sería interesante estudiar con más detalle estos genes y su relación con *TFL1*.

Además de esto, en el futuro sería muy importante entender si estos genes de señalización de ABA, en efecto, median la actividad de *TFL1* para controlar el desarrollo de *Arabidopsis*. Para ello, se pueden hacer cruces entre los mutantes nulos de estos genes y la línea de sobreexpresión

35S::*TFL1*. Si estos genes son activados por TFL1, eso debería modificar el fenotipo de las plantas 35S::*TFL1*, aunque de nuevo habría que tener en cuenta que la redundancia genética podría enmascarar el posible resultado. Por otra parte, otro abordaje sería cruzar el mutante *tfl1-1* con las líneas de sobreexpresión generadas en este trabajo. Si la expresión de estos genes dirigida por el promotor 35S, independiente de la posible activación por TFL1, alivia el fenotipo de floración temprana del mutante, esto indicaría que estos genes están siendo activados por *TFL1* para realizar su función en la floración.



## CONCLUSIÓN

Los resultados de nuestro trabajo nos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Nuestro análisis de expresión de los genes *GBF3*, *HB12*, *HB16*, *AFP2*, *AFP4* y *P5CSI*, relacionados con la señalización del ácido abscísico (ABA), indica que todos ellos tienen dominios de expresión parcialmente solapantes con los de la expresión del gen *TFL1*. Aquellos que hemos podido analizar durante la transición floral muestran una expresión con una tendencia ascendente similar a la de *TFL1*. Estos datos, junto con que *TFL1* se une a su región promotora *in vivo*, apoyan la idea de que *TFL1* actúe como un regulador de la expresión de estos genes relacionados con ABA.
2. Las líneas de pérdida de función o de sobreexpresión de estos genes relacionados con ABA, en general, muestran fenotipos relacionados con el tiempo de floración. Cuando se observó fenotipo en los mutantes de pérdida de función, este fue de adelanto en la floración, como los mutantes *tfl1*; mientras que en casi todos los casos la sobreexpresión de los diferentes genes estudiados causó retraso en la floración, como la sobreexpresión de *TFL1*. Estos datos sugieren que estos genes, regulados por *TFL1*, podrían mediar la acción de este en la regulación de la floración.
3. Los fenotipos de desarrollo en las líneas con alteración de *GBF3*, especialmente en las de sobreexpresión, no descritos previamente, indican que este gen participa no solo en la regulación de la floración, sino también en la de otros aspectos del desarrollo, como la arquitectura de la inflorescencia y el desarrollo de la semilla, aspectos en los que también participa *TFL1*. No obstante, la acción de *GBF3* en esos aspectos también podría estar mediada por otros factores, tales como la actividad de distintas hormonas.





## REFERENCIAS

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., ...Araki, T.**(2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex.*Science*, **309**(5737), pp. 1052–1056. doi: 10.1126/science.1115983.
- Alvarez, J., Guli, C., Catherine, L., Yu, X. y Smyth, D.R.** (1992) Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **2**(1), pp. 103–116. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00103.x>.
- Amasino, R.** (2010). Seasonal and developmental timing of flowering, *The Plant Journal*, **61**(6),pp. 1001–1013. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x.
- Andrés, F. y Coupland, G.** (2012) The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nature Reviews Genetics*, **13**(9), pp. 627–639. doi: 10.1038/nrg3291.
- Azpiroz, R., Wu, Y., Locascio, J. C. y Feldmann, K. A.**(1998) An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell*, **10**(2), pp. 219–230. doi: 10.1105/tpc.10.2.219.
- Balanzà, V., Martínez-Fernández, I., Sato, S., Yanofsky, M. F., Kaufmann, K., Angenent, G. C., ... Ferrándiz, C.**(2018). Genetic control of meristem arrest and life span in *Arabidopsis* by a FRUITFULL-APETALA2 pathway. *Nature Communications*, **9**(1). doi: 10.1038/s41467-018-03067-5.
- Baumann, K., Venail, J., Berbel, A., Domenech, M. J., Money, T., Conti, L., ... Bradley, D.**(2015). Changing the spatial pattern of TFL1 expression reveals its key role in the shoot meristem in controlling *Arabidopsis* flowering architecture. *Journal of Experimental Botany*, **66**(15), pp. 4769–4780. doi: 10.1093/jxb/erv247.
- Bäurle, I. y Dean, C.** (2006). The Timing of Developmental Transitions in Plants. *Cell*, **125** pp. 655–664. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.005.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A. yMadueño, F.**(2007). Floral initiation and inflorescence architecture: A comparative view. *Annals of Botany*, **100**(3), pp. 659–676. doi: 10.1093/aob/mcm146.
- Bowman, J. L., Álvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E. M. y Smyth, D. R.** (1993). Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA 1 and interacting genes. *Development*, **119**(3), pp. 721–743.
- Bowman, J. L.** (1994). *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. (Springer-verlag, Ed.). New York.
- Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R. y Coen, E.**(1997). Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*.*Science*, **275**(5296), pp. 80–83. doi: 10.1126/science.275.5296.80.
- Chang, G., Yang, W., Zhang, Q., Huang, J., Yang, Y. y Hu, X.** (2019). ABI5-BINDING PROTEIN2 Coordinates CONSTANS to Delay Flowering by Recruiting the Transcriptional Corepressor TPR2. *Plant Physiology*, **179**(2), p. 477 LP-490. doi: 10.1104/pp.18.00865.
- Cheng, Z. J., Zhao, X. Y., Shao, X. X., Wang, F., Zhou, C., Liu, Y. G., ... Zhang, X. S.**(2014). Abscisic Acid Regulates Early Seed Development in *Arabidopsis* by ABI5-Mediated Transcription of SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1. *The Plant Cell*, **26**(3), p. 1053 LP-1068. doi: 10.1105/tpc.113.121566.

- Clough, S. J. y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **16**(6), 735–43.
- Coen, E. y Nugent, J. M.** (1994). Evolution of flowers and inflorescences. *Development*, 1994, pp. 107–116.
- Conti, L.** (2017). Hormonal control of the floral transition: Can one catch them all?, *Developmental Biology*, **430**(2), pp. 288–301. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.03.024.
- Conti, L.** (2019). The A-B-A of Floral Transition: The to Do List for Perfect Escape. *Molecular Plant*, **12**(3), pp. 289–291. doi: 10.1016/j.molp.2019.02.002.
- Conti, L. y Bradley, D.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *Plant Cell*, **19**(3), pp. 767–778. doi: 10.1105/tpc.106.049767.
- Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., Finkelstein, R. R. y Abrams, S. R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, **61**, pp. 651–679. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112122.
- Czechowsky, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, K. y Scheible, W.-R.** (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **139**, 5–17.
- El-Antably, H. M. M. y Wareing, P. F.** (1966). Stimulation of Flowering in Certain Short-day Plants by Abscisin. *Nature*, **210**(5033), pp. 328–329. doi: 10.1038/210328a0.
- Fornara, F. y Coupland, G.** (2009). Plant Phase Transitions Make a SPLash. *Cell*, **138**(4), pp. 625–627. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.011>.
- Fouracre, J. P. y Poethig, R. S.** (2019). Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**(20), pp. 10168–10177. doi: 10.1073/pnas.1817853116.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y., y Takahashi, Y.** (2000). REPRESSION OF SHOOT GROWTH, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, **12**(6), pp. 901–915. doi: 10.1105/tpc.12.6.901.
- Golembeski, G. S. y Imaizumi, T.** (2015). Photoperiodic Regulation of Florigen Function in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis book*, **13**, p. e0178. doi: 10.1199/tab.0178.
- Golembeski, G. S., Kinmonth-schultz, H. A. y Song, Y. H.** (2014). Photoperiodic Flowering Regulation in *Arabidopsis thaliana*, *BS:ABR72C*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-417162-6.00001-8.
- Goretti, D., Silvestre, M., Colani, S., Langenecker, T., Méndez, C., Madueño, F. y Schmid, M.** (2020). TERMINAL FLOWER1 functions as a mobile transcriptional cofactor in the shoot apical meristem. *Plant Physiology*, **182**(4), pp. 2081–2095. doi: 10.1104/pp.19.00867.
- Gregory, F. G. y Hussey, G. G.** (1953). Photoperiodic responses of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings Linnean Society London*, **164**(2), pp. 137–139. doi: 10.1111/j.1095-8312.1953.tb00676.x.
- Hanano, S. y Goto, K.** (2011). *Arabidopsis* terminal flower1 is involved in the regulation of

- flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell*, **23**(9), pp. 3172–3184. doi: 10.1105/tpc.111.088641.
- Hewitt, E. J.** (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition (2nd ed.). Farnham Royal, England: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Huijser, P. y Schmid, M.** (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development*, **138**, pp. 4117–4129. doi: 10.1242/dev.063511.
- Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J. Y. y Ahn, J. H.** (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Molecular Plant*, **12**(4), pp. 489–505. doi: 10.1016/j.molp.2019.01.002.
- Irish, V. F.** (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant journal*, **61**(6), pp. 1014–1028. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04065.x.
- Jin, S., Nasim, Z., Susila, H. y Ahn, J. H.** (2021). Evolution and functional diversification of FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 family genes in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier, **109**(June 2020), pp. 20–30. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.05.007.
- Kinoshita, A.** (2020). Genetic and molecular basis of floral induction in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, **71**(9), pp. 2490–2504. doi: 10.1093/jxb/eraa057.
- Klepikova, A. V., Kasianov, A. S., Gerasimov, E. S., Logacheva, M. D., & Penin, A. A.** (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, **88**(6), 1058–1070.
- Koncz, C. y Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, **204**(3), 383–396.
- Kobayashi, Y. y Weigel, D.** (2007). Move on up, it's time for change - Mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes and Development*, **21**(19), pp. 2371–2384. doi: 10.1101/gad.1589007.
- Liu, L., Zhu, Y., Shen, L. y Yu, H.** (2013). Emerging insights into florigen transport. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, **16**(5), pp. 607–613. doi: 10.1016/j.pbi.2013.06.001.
- Mallappa, C., Singh, A., Ram, H. y Chattopadhyay, S.** (2008). GBF1, a transcription factor of blue light signaling in Arabidopsis, is degraded in the dark by a proteasome-mediated pathway independent of COP1 and SPA1. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(51), pp. 35772–35782. doi: 10.1074/jbc.M803437200.
- Martignago, D., Siemiatkowska, B., Lombardi, A., y Conti, L.** (2020). Abscisic acid and flowering regulation: Many targets, different places. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(24), pp. 1–14. doi: 10.3390/ijms21249700.
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M. M., Costantino, P. y Trovato, M.** (2008). Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **66**(3), pp. 277–288. doi: 10.1007/s11103-007-9269-1.
- Mattioli, R., Marchese, D., D'Angeli, S., Altamura, M. M., Constantino, P. y Trovato, M.** (2009). The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in

- Arabidopsis flower transition but not in embryo development. *Physiologia plantarum*. Denmark, **137**(1), pp. 72–85. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01261.x.
- Meyerowitz, E. M. y Somerville, C. R.** (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Mcgarry, R. C. y Ayre, B. G.** (2012). Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Science*, 188–189, pp. 71–81. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.03.002.
- Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., ... Frans, E. T.** (1999). Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids. *Plant Physiology*, **121**(3), pp. 743–752. doi: 10.1104/pp.121.3.743.
- Périlleux, C., Bouché, F., Randoux, M. y Orman-Ligeza, B.** (2019). Turning Meristems into Fortresses. *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, **24**(5), pp. 431–442. doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.004.
- Ratcliffe, O., Amaya, I., Vincent, C., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. y Bradley, D.** (1998). A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*. 125, 1609–1615.
- Reinhardt, D. y Kuhlemeier, C.** (2002). Plant architecture. *EMBO Rep* **3**(9), pp. 846–851.
- Riboni, M., Galbiati, M., Tonelli, C. y Conti, L.** (2013). GIGANTEA enables drought escape response via abscisic acid-dependent activation of the florigens and SUPPRESSOR of OVEREXPRESSION of CONSTANS11. *Plant Physiology*, **162**(3), pp. 1706–1719. doi: 10.1104/pp.113.217729.
- Riboni, M., Test, A. R., Galbiati, M., Tonelli, C. y Conti, L.** (2016). ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, **67**(22), pp. 6309–6322. doi: 10.1093/jxb/erw384.
- Romera-Branchat, M., Severing, E. Pocard, C., Ohr, H., Vincent, C., Née, G., ... Coupland, G.** (2020). Functional Divergence of the *Arabidopsis* Florigen-Interacting bZIP Transcription Factors FD and FDP. *Cell Reports*, **31**(9). doi: 10.1016/j.celrep.2020.107717.
- Romera-branchat, M., Andre, F. y Coupland, G.** (2014). Flowering responses to seasonal cues: what's new?. *Current Opinion in Plant Biology*, pp. 120–127. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.006.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Serrano-Mislata, A., Fernández-Nohales, P., Doménech, M. J., Hanzawa, Y. Bradley, D. y Madueño, F.** (2016). Separate elements of the TERMINAL FLOWER 1 cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development (Cambridge)*, **143**(18), pp. 3315–3327. doi: 10.1242/dev.135269.
- Silvestre, M.** (2021). Identificación de dianas e interactores de TFL1, un regulador clave en la floración y la arquitectura de la inflorescencia. [Tesis de doctorado no publicada]. Universitat de València
- Shannon, S. y Meeks-Wagner, D. R.** (1991). A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. *The Plant Cell*, **3**, 877–892.

- Shu, K., Luo, X., Meng, Y. y Yang, W.**(2018). Toward a Molecular Understanding of Abscisic Acid Actions in Floral Transition.*Plant and Cell Physiology*, **59**(2), pp. 215–221. doi: 10.1093/pcp/pcy007.
- Smit, M. E., Llavata-Peris, C. I., Roosjen, M., van Beijnum, H., Novikova, D., Levitsky, V., ... Weijers, D.** (2020) Specification and regulation of vascular tissue identity in the Arabidopsis embryo, *Development (Cambridge)*, **147**(8). doi: 10.1242/dev.186130.
- Srikanth, A. y Schmid, M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome.*Cellular and molecular life sciences*, **68**(12), pp. 2013–2037. doi: 10.1007/s00018-011-0673-y.
- Tiwari, S. B., Shen, Y., Chang, H. C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S. F., ... Ratcliffe, O. J.** (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist*, **187**(1), pp. 57–66. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03251.x.
- Verslues, P. E. y Juenger, T. E.** (2011). Drought, metabolites, and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments.*Current opinion in plant biology*, **14**(3), pp. 240–245. doi: 10.1016/j.pbi.2011.04.006.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S.**(2017). Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects.*Frontiers in plant science*, **8**, p. 161. doi: 10.3389/fpls.2017.00161.
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X. y Wu, Y.** (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in Arabidopsis.*Journal of experimental botany*, **64**(2), pp. 675–684. doi: 10.1093/jxb/ers361.
- Waterhouse, P. M. y Helliwell, C. A.** (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature reviews. Genetics*, **4**(1), pp. 29–38. doi: 10.1038/nrg982.
- Weigel, D. y Glazebrook, J.** (2009). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N.Y.): Cold Spring Harbor laboratory press.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U. y Weigel, D.** (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis.*Science*, **309**(5737), pp. 1056–1059. doi: 10.1126/science.1114358.
- Zhang, B., Li, C., Li, Y. y Yu, H.**(2020). Mobile TERMINAL FLOWER1 determines seed size in Arabidopsis. *Nature Plants*, **6**(9), pp. 1146–1157. doi: 10.1038/s41477-020-0749-5.
- Zhu, Y., Klasfeld, S., Jeong, C. W., Jin, R., Goto, K., Yamaguchi, M. y Wagner, D.** (2020a). Florigen family chromatin recruitment, competition and target genes. bioRxiv. doi: 10.1101/2020.02.04.934026.
- Zhu, Y., Klasfeld, S., Jeong, C. W., Jin, R., Goto, K., Yamaguchi, M. y Wagner, D.**(2020b). TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nature Communications*, **11**(1). doi: 10.1038/s41467-020-18782-1.
- Zhu, Y., Klasfeld, S. y Wagner, D.** (2021). Molecular regulation of plant developmental transitions and plant architecture via PEPB family proteins: an update on mechanism of action. *Journal of Experimental Botany*, **72**(7), pp. 2301–2311. doi: 10.1093/jxb/eraa598.



## ANEXO

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo y sus características.

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	USO
<b>Primers para clonación Gateway</b>		
<b>CGG1(HB16.ATG)</b>	ATGAAGAGACTAAGCAGCTC	Primer directo para amplificar el CDS de <i>HB16</i>
<b>CGG2(HB16.STOP)</b>	TCAAGTCCAATGATCTGAAG	Primer reverso para amplificar el CDS de <i>HB16</i>
<b>CGG3(GBF3.ATG)</b>	ATGGGAAATAGCAGCGAG	Primer directo para amplificar el CDS de <i>GBF3</i>
<b>CGG4(GBF3.STOP)</b>	TCAGCCTGCAGCTACTG	Primer reverso para amplificar el CDS de <i>GBF3</i>
<b>CGG5(P5CS1.ATG)</b>	ATGGAGGAGCTAGATCGTTC	Primer directo para amplificar el CDS de <i>P5CS1</i>
<b>CGG6(P5CS1.STOP)</b>	TTAAGCTTGGATGGGAATGT	Primer reverso para amplificar el CDS de <i>P5CS1</i>
<b>CGG7(HB12.ATG)</b>	ATGGAAGAAGGAGATTTTTTC	Primer directo para amplificar el CDS de <i>HB12</i>
<b>CGG8(HB12.STOP)</b>	TTATGACCAAACTCCCAC	Primer reverso para amplificar el CDS de <i>HB12</i>
<b>Genotipado</b>		
<b>LBb1.3</b>	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Primer directo para genotipar alelos mutantes de líneas Salk con inserción de T-DNA
<b>GABI-Kat</b>	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Primer directo para genotipar alelos mutantes de líneas GABI-Kat con inserción de T-DNA
<b>CGG9-GBF3.LP</b>	AAATGGGAATCCTGAAAATGG	Primer directo para el genotipado del mutante <i>gbf3</i>
<b>CGG10-GBF3.RP</b>	GAGCATTTTCAGTTTGTCTCTGC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>gbf3</i>
<b>CGG11-P5CS1-LP</b>	CTCTGCAACTTCGTGATCCTC	Primer directo para el genotipado del mutante <i>p5cs1-4</i>
<b>CGG12-P5CS1-RP</b>	TGATCACTGATGCAATTCCAG	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>p5cs1-4</i>
<b>CGG13-HB12.LP-1</b>	GATCGAGAATTTACATCCCCC	Primer directo para el

<b>CGG14-HB12.RP-1</b>	TAAAAGTATCGCAAGGCCTTG	genotipado del mutante <i>hb12</i> Primer reverso para el genotipado del mutante <i>hb12</i>
<b>CGG15-HB12.LP-2</b>	CCCGTCAAACATCCTGATATG	Primer directo para el genotipado del mutante <i>hb12</i>
<b>CGG16-HB12.RP-2</b>	AGCCAAATTGTTGTAATTGGC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>hb12</i>
<b>CGG17-HB16-LP</b>	AAAAGCTGCGTCTTTCTTTCC	Primer directo para el genotipado del mutante <i>hb16</i>
<b>CGG18-HB16-RP</b>	CCTCTGGTTTTAACTACCGGC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>hb16</i>
<b>CGG45_P5CS1_LP_Salk</b>	CTCTGCAACTTCGTGATCCTC	Primer directo para el genotipado del mutante <i>p5cs1-1</i>
<b>CGG46-P5CS1_RP_Salk</b>	TGATCACTGATGCAATTCCAG	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>p5cs1-1</i>
<b>CGG51-AFP2.1_LP</b>	CTCCATCAAACGATTAGTCGC	Primer directo para el genotipado del mutante <i>afp2-1</i>
<b>CGG51-AFP2.1_RP</b>	GTCATTTCTCTGTTCCATGCC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>afp2-1</i>
<b>CGG51-AFP2.2_LP</b>	ACGACACGTTTCTTGAAGCAG	Primer directo para el genotipado del mutante <i>afp2-2</i>
<b>CGG51-AFP2.2_RP</b>	GATTTTCGGGCTTCTTTCATC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>afp2-2</i>
<b>CGG51-AFP4.2_LP</b>	TGTTGGTAGTCTTGGCTTTGC	Primer directo para el genotipado del mutante <i>afp4-2</i>
<b>CGG51-AFP4.2_RP</b>	GGGTCGATCTTCTTCGATACC	Primer reverso para el genotipado del mutante <i>afp4-2</i>
<b>Secuenciación del interior en plásmidos</b>		
<b>M13 reverso</b>	CAGGAAACAGCTATGAC	Primer reverso para la secuenciación de las inserciones en pCR8/GW/TOPO
<b>CGG19_P5CS1int.fw1</b>	ACTTAATGAAACTGTCAAGTCTATG	Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de <i>P5CS1</i> en pCR8/GW/TOPO
<b>CGG19_P5CS1int.fw2</b>	AGATTCTAATGCTCGTGACATG	Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción



<b>CGG19_GBF3int.rev</b>	TAGATTTAGTAGGAGTGTCGATG	de <i>P5CS1</i> en pCR8/GW/TOPO Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de <i>GBF3</i> en pCR8/GW/TOPO
<b>CGG19_HB12int.rev</b>	TCAAATTGTGAAGCCAAATTGTTG	Primer directo para la secuenciación del interior de la inserción de <i>HB12</i> en pCR8/GW/TOPO

Primers qRT-PCR		
-----------------	--	--

<b>qAtTIP41.Fw1</b>	ATCAGGGTAGGGTGGATTGG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>TIP41</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtTIP41.Rv1</b>	GGTTTGGCTTTTGGGTCGTT	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>TIP41</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG25_qAtP5CS1.Fw1</b>	AACGCCAGCACAAGATTC	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG26_qAtP5CS1.Rv1</b>	CCTCTCATTATCCATCTCGTTGT	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG27_qAtP5CS1.Fw2</b>	AACGCCAGCACAAGATTCTC	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG28_qAtP5CS1.Rv2</b>	TAATCCTTCGACCCCGACTG	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG29_qAtP5CS1.Fw3</b>	ACTGCATTGTGACAGAGGATCACG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG30_qAtP5CS1.Rv3</b>	TGTGGAACACAGCAGCGCTATC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>P5CS1</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG31_qAtGBF3.Fw1</b>	GTTAAGAACTCAGGAGCTGGAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>GBF3</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG32_qAtGBF3.Rv1</b>	GCTTCGTATCGAGCAGTTGATG	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>GBF3</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG33_qAtGBF3.Fw2</b>	GAGTCCCCGAAATATGTTGTC	Primer directo para

<b>CGG34_qAtGBF3.Rv2</b>	AGGCTTCGTATCGAGCAGTTG	cuantificar la expresión endógena de <i>GBF3</i> mediante RT-qPCR
		Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>GBF3</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG35_qAtHB16.Fw1</b>	ACTGGCGGGAGTTTCTTACAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>HB16</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG36_qAtHB16.Rv1</b>	TCGGAGAAGAAACCACAAGC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>HB16</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG37_qAtHB16.Fw2</b>	CCGATAGTTGCGATTCAAGCG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>HB16</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG38_qAtHB16.Rv2</b>	TAAGAAACTCCCGCCAGTAACC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>HB16</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG39_qAtHB12.Fw1</b>	TAGACCAAGGGAGTGTTCTATGT	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG40_qAtHB12.Rv1</b>	CAATTCTCAGAAGATGTCAAGCAACT	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG41_qAtHB12.Fw2</b>	CCAGAAGGGAGGTTAGACCA	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG42_qAtHB12.Rv2</b>	GCTTTCTCCACAATGTTTCATCA	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG43_qAtHB12.Fw3</b>	TTTGGGTTTCGAGGAAGAGACTG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>CGG44_qAtHB12.Rv3</b>	TCCCACCAGTTAGGGTAATTGC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>HB12</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Fw1</b>	AGGAGGTAGTTCATCGAGCTTG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Rv1</b>	ACATCCTGCCACGATTTTCG	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR

<b>qAtAFP2.Fw2</b>	AACGGGAGGAGGTAGTTCATCGAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Rv2</b>	TGCAGCTGTTTGATGATCCTTGC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Fw3</b>	TGTTTCATCGAACAGCGGAAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Rv3</b>	AAACCAGTAGACGTAGCCATCC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Fw4</b>	AAGAGTCTTTCACGGCGGAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP2.Rv4</b>	CGTTTCAGCTTCCTCGGAGT	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP2</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Fw1</b>	AAGCCGTCGAAACAGAGAAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Rv1</b>	TGCTTCTTCGCCGTATTTCC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Fw2</b>	AAAGAGCGGAAGGTGTCAGAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Rv2</b>	TTCTCTGTTTCGACGGCTTG	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Rv3</b>	ACATGCCTTGTGTGTCGACGAG	Primer directo para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR
<b>qAtAFP4.Rv3</b>	CCCTCCGTACCAGTAAAGAAACCC	Primer reverso para cuantificar la expresión endógena de <i>AFP4</i> mediante RT-qPCR