

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS E INTERACTORES DE TFL1,
UN REGULADOR CLAVE EN LA FLORACIÓN
Y LA ARQUITECTURA DE LA INFLORESCENCIA

Autor: Marina

Silvestre Vañó

Director: Francisco

Madueño Albi



2020
Octubre

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Identificación de dianas e interactores de TFL1, un
regulador
clave en la floración y la arquitectura de la
inflorescencia**

Memoria presentada por

MARINA SILVESTRE VAÑÓ

Para optar al grado de

DOCTOR POR LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Programa de doctorado

BIODIVERSIDAD Y BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Director

Dr. Francisco Madueño Albi

Tutora

Isabel Arrillaga Mateos

Valencia, Octubre 2020



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN



FRANCISCO MADUEÑO ALBI, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en calidad de director de la Tesis Doctoral, e **ISABEL ARRILLAGA MATEOS**, Catedrática de la Universidad de Valencia, en calidad de tutora, habiendo revisado el trabajo de la memoria de la Tesis Doctoral “**Identificación de dianas e interactores de TFL1, un regulador clave en la floración y la arquitectura de la inflorescencia**”, realizada por la graduada **Marina Silvestre Vañó**, consideramos que es correcta y autorizamos su presentación, para que Marina Silvestre Vañó opte al título de Doctora por la Universitat de València, programa de biodiversidad y biología evolutiva.

Y para que conste a todos los efectos oportunos, firmamos el presente escrito,

Francisco Madueño Albi

Isabel Arrillaga Mateos

**MADUEÑO
ALBI
FRANCISCO**
-
27283307V
Firmado digitalmente por
MADUEÑO ALBI
FRANCISCO -
27283307V
Fecha: 2020.10.30
10:48:40 +01'00'

**ARRILLAGA
MATEOS
MARIA
ISABEL**
-
15931004P
Firmado digitalmente por
ARRILLAGA
MATEOS MARIA
ISABEL -
15931004P
Fecha: 2020.11.02
15:20:56 +01'00'

En Valencia a 29 de Octubre de 2020



UPV - Ciudad Politécnica de la Innovación
Ingeniero Fausto Elio, s/n - 46022 Valencia
Tel. +34 96 387 78 56 Fax +34 96 387 78 59
ibmcp@ibmcp.upv.es - www.ibmcp.upv.es



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

— Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Sois muchos los que me habéis acompañado a lo largo de estos años, así que de entrada perdón si en estos momentos olvido a alguien, no estáis todos los que sois, pero si sois todos los que estáis.

Si por algún sitio debo empezar mis agradecimientos es por supuesto por mi director, Paco, muchísimas gracias por todo tu apoyo y tu esfuerzo en que este proyecto, que en algunos momentos parecía imposible, se hiciese realidad, pero sobretodo muchísimas gracias por haber sido todo un referente tanto a nivel científico como humano. Me gustaría agradecer también a Cristina Ferrándiz, muchas gracias tu apoyo, tus consejos y por tu energía.

Como no agradecerles a todos mis compañeros del L.1.02 y L1.03, en especial a Ana Berbel y Majo por todo su cariño y por haberme enseñado tantísimo a lo largo de estos años, y como no a mis Supernenas, tanto a las nuevas como a las viejas; habéis sido y seréis mi familia dentro y fuera del IBMCP, nunca os podré devolver todo lo que me habéis dado.

I cannot forget to acknowledge the doctors Markus Schmid, Richard Immink and Marcio Alves, to invite and accept me in their laboratories, and thank you for all your support and advice that made my thesis better.

Ja per últim agrair a la família que s'escull "Friends forever", per acompanyar-me tots aquests anys, per aguantar els alts i els baixos, i per estar sempre quan ha fet falta. Així com tampoc puc oblidar les noves amistats, Vane i Nuel moltes gràcies per tots els "superplans", per ajudar-me a desconectar i a reconectar quan calia.

I m'agradaria agrair a la meua família, en especial als meus iaies, als meus pares i la meua germana Joana pel seu suport, incondicional i incansable, moltes gràcies per tindre clar que podia aplegar fins aquí, aquesta tesi és tant meua com vostra.

Finalment, i no per això menys important, agrair a Flo per la paciència, el suport, pels consells tant científics com vitals, i per suportar-me que no és poc!

ÍNDICE

Introducción.....	1
1.1 El desarrollo de Arabidopsis.....	3
1.2. El control genético de la floración.....	5
1.2.1. La ruta del fotoperiodo.....	5
1.2.2. La ruta de la vernalización.....	7
1.2.3. La ruta de las giberelinas.....	9
1.2.4. La ruta autónoma.....	10
1.2.5. La ruta de la edad.....	11
1.3. Los genes integradores: Nexos entre las diferentes rutas genéticas de la floración	12
1.4. Los genes de identidad del meristemo floral.....	14
1.5. Los genes de identidad del meristemo inflorescente.....	15
1.6. El gen <i>TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)</i>	16
1.6.1. Patrón de expresión de TFL1.....	17
1.6.2. Función de TFL1 como regulador de la arquitectura de la inflorescencia.....	18
1.6.3. Función de TFL1 como regulador de los genes de identidad del meristemo floral.....	19
1.7. El gen <i>FLOWERING LOCUS T (FT)</i>	20
1.8. Las proteínas TFL1 y FT.....	20
1.9. Los factores de transcripción de tipo bZIP.....	22
1.9.1. Los bZIPs del grupo A.....	22
1.9.2. Los bZIPs del grupo I.....	23
Objetivos.....	25
Materiales y métodos.....	29
1. <u>Material biológico</u>	31
1.1. Material vegetal.....	31
1.1.1. Líneas mutantes.....	31
1.1.2. Líneas transgénicas.....	32
1.1.3. Cultivo de Arabidopsis en invernadero.....	33
1.1.4. Cultivo de Arabidopsis <i>in vitro</i>	33
1.1.5. Fertilización cruzada en Arabidopsis.....	33
1.2. Material bacteriano.....	34
1.2.1. Cultivo de bacterias <i>in vitro</i>	34

1.2.2.	Cultivo de levaduras <i>in vitro</i>	34
1.2.3.	Conservación de los microorganismos en glicerol	35
2.	<u>Métodos de biología molecular</u>	35
2.1	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	35
2.1.1	Extracción de DNA plasmídico de <i>E.coli</i>	35
2.1.2	Extracción de DNA plasmídico de <i>A.tumefaciens</i>	35
2.1.3	Extracción de DNA plasmídico de levadura	36
2.1.4	Extracción de DNA genómico de Arabidopsis	36
2.1.5	Extracción de RNA total de Arabidopsis.....	36
2.2	Manipulación de ácidos nucleicos	37
2.2.1	Síntesis de cDNA.....	37
2.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
2.2.3	Purificación de fragmentos de DNA	38
2.2.4	PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).....	38
2.2.5	Digestión de DNA con enzimas de restricción	39
2.3	Construcciones	40
2.3.1	Vectores plasmídicos utilizados	40
2.3.2	Construcciones plasmídicas utilizadas	42
2.3.3	Obtención de construcciones.....	50
2.4	Secuenciación	50
2.4.1	Secuenciación Sanger.....	50
2.4.2	Secuenciación masiva	50
2.5	Generación de organismos transgénicos.....	51
2.5.1	Transformación de bacterias	51
2.5.2	Transformación de levaduras.....	51
2.5.3	Transformación de Arabidopsis	51
2.5.4	Transformación transitoria de <i>Nicotiana benthamiana</i>	52
2.6	Hibridación <i>in situ</i> de tejidos vegetales.....	52
2.6.1	Generación de sondas marcadas con digoxigenina para la hibridación <i>in situ</i> ..	52
2.6.2	Cuantificación de las sondas de RNA	52
2.6.3	Prehibridación, hibridación e inmunodetección de la sonda	53
2.7	Inmunoprecipitación de cromatina	53
2.8	Co-Inmunoprecipitación de complejos proteicos	54

3	<u>Análisis fenotípico de las plantas mutantes y líneas transgénicas</u>	55
3.1	Fotografía a bajo aumento	55
3.2	Técnicas microscópicas.....	55
3.2.1	Microscopia óptica	55
3.2.2	Microscopia confocal	55
3.2.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	56
3.3	Análisis de la respuesta a estrés biótico	56
3.4	Análisis de la respuesta a ácido jasmónico.....	56
3.5	Análisis del tamaño de semillas.....	56
4	<u>Tratamiento con Dexametasona</u>	57
5	<u>Técnicas de histología vegetal</u>	57
5.1	Fijación e inclusión de muestras vegetales en parafina	57
5.2	Obtención de cortes histológicos	57
5.3	Análisis de la actividad β -glucuronidasa (GUS).....	57
6	<u>Análisis de las interacciones proteína-proteína</u>	58
6.1	Rastreo de doble y triple híbrido en levadura	58
6.1.1	Rastreo frente a una genoteca de cDNA de Arabidopsis.....	58
6.1.2	Rastros frente a una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis	58
6.2	Ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)	59
7	<u>Análisis bioinformáticos</u>	59
7.1	Análisis de datos de secuenciación masiva	59
7.2	Análisis de secuencias.....	59
8	<u>Análisis estadísticos</u>	60
	Resultados	61

1. CAPÍTULO 1:

	Estudio de la actividad de TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) como co-factor transcripcional e identificación de sus genes diana	63
1.1.	Análisis de los genes que responden a la activación de TFL1, mediante RNA-Seq	63
1.1.1.	Identificación de una línea 35S:TFL1-GR inducible por dexametasona	64
1.1.2.	Puesta a punto de las condiciones para la identificación de genes regulados por TFL1 mediante RNA-Seq	65
1.1.3.	RNA-Seq de la línea 35S:TFL1-GR <i>tf1-1</i> #7.9 tras el tratamiento con Dexametasona.....	68

1.1.4. Validación mediante RT-qPCR de los resultados obtenidos en el RNA-Seq de la línea 35S:TFL1-GR <i>tfl1-1</i> #7.9.....	69
1.2. Identificación de dianas directas de TFL1 mediante CHIP-Seq	71
1.3. Comparación de los genes diana de TFL1 y FD.....	75
2. CAPÍTULO 2:	
Caracterización de los factores de transcripción bZIP grupo-I bZIP30, bZIP52 y bZIP59, interactores de TFL1 y FT	77
2.1. Estudio de la interacción de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 con FT y TFL1	77
2.2. Caracterización del patrón de expresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59	82
2.2.1. Generación y análisis de líneas reporteras genómicas pbZIP:bZIP-GUS.....	82
2.2.2. Estudio del patrón de expresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 mediante hibridación “ <i>in situ</i> ”	86
2.3. Análisis de la localización subcelular de bZIP30, bZIP52 y bZIP59.....	88
2.4. Caracterización del fenotipo asociado a la pérdida de función de <i>bZIP30</i> , <i>bZIP52</i> y <i>bZIP59</i>	91
2.4.1. Identificación y análisis de los mutantes simples	91
2.4.2. Caracterización del mutante <i>bzip69</i> SAIL1211H04	94
2.4.3. Generación de nuevos alelos mutantes de bZIP52 y bZIP69 mediante CRISPR-Cas9	99
2.5. Obtención y caracterización de líneas de cambio de función para <i>bZIP30</i> , <i>bZIP52</i> y <i>bZIP59</i>	102
2.5.1. Fenotipo asociado a las líneas dominantes negativas 35S: bZIP30-SRDX.....	103
2.5.2. Fenotipos asociados a las líneas dominantes negativas 35S:bZIP52.1-SRDX y 35S:bZIP52.2-SRDX.....	105
2.5.3. Fenotipos asociados a las líneas dominantes negativas 35S:bZIP59-SRDX	108
2.5.4. Análisis del transcriptoma de la línea dominante negativa 35S:bZIP30-SRDX ..	109
2.6. Obtención y caracterización de mutantes múltiples <i>bZIP</i>	112
2.6.1. Análisis de los fenotipos asociados a los dobles mutantes <i>bZIP</i>	112
2.6.2. Análisis de los fenotipos asociados a los mutantes triple, cuádruple y quintuple <i>bZIP</i>	113
2.7. Caracterización del fenotipo asociado a la sobreexpresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59	116

3. CAPÍTULO 3:

<u>Identificación de nuevas proteínas que forman complejos con TFL1</u>	121
3.1. Identificación de nuevos interactores de TFL1 mediante rastreos de doble y triple híbrido en levadura.....	121
3.1.1. Rastreo de doble híbrido en levadura de TFL1 frente a una genoteca de cDNA de inflorescencia	123
3.1.2. Rastreo de doble híbrido frente a una genoteca de factores de transcripción.	126
3.1.3. Rastreo de tríple híbrido en levadura del complejo TFL1-FD frente a una genoteca de cDNA de Arabidopsis.	126
3.1.4. Rastreo de tríple híbrido en levadura del complejo TFL1-FD frente a una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis.....	128
3.2. Abordaje para la identificación de complejos en los que participa TFL1 <i>in vivo</i> mediante co-inmunoprecipitación.....	129
3.2.1. Obtención de una línea pTFL1:GFP-TFL1 35S:AP1-GR <i>ap1cal</i>	129
3.2.2. Análisis de la funcionalidad de la proteína de fusión GFP-TFL1.....	131
3.2.3. CoIP-MS para la identificación de complejos formados por TFL1 <i>in vivo</i>	131
Discusión	133
1. <u>TFL1 actúa como co-regulador transcripcional con el factor de transcripción de tipo bZIP FD</u>	135
2. <u>Nuevos complejos proteicos en los que participa TFL1</u>	137
3. <u>Los bZIPs del grupo I participan en el desarrollo en Arabidopsis de forma redundante entre ellos</u>	142
4. <u>Papel de los complejos proteicos TFL1-bZIP30, TFL1-bZIP52 y TFL1-bZIP59 en el desarrollo</u>	145
Conclusiones	149
Bibliografía	153

RESUMEN

La transición de la fase vegetativa a la reproductiva, también conocida como transición floral, es un paso crítico en ciclo de vida de las plantas, por lo que se encuentra finamente regulada por una compleja red genética que responde a factores tanto endógenos como ambientales. El gen *TFL1*, y su homólogo *FT*, son dos de los reguladores claves de la transición floral. Ambos codifican para proteínas del tipo PEBP (*Phosphatidil Ethanolamine Binding Proteins*) y, aunque no son factores de transcripción, ambos son capaces de regular la expresión de los genes responsables de la iniciación floral. Sin embargo, el modo de acción de TFL1 como regulador transcripcional no se conoce con detalle. Se ha propuesto que tanto TFL1 como FT regulan la expresión génica de sus genes diana mediante la formación de complejos con FD, un factor de transcripción de tipo bZIP, y que dicha interacción se encuentra mediada por proteínas tipo 14-3-3. Sorprendentemente, pese a su similitud, TFL1 y FT desarrollan funciones opuestas en el control de la floración, siendo el complejo FD-FT un activador de la floración, mientras que FD-TFL1 funciona como represor de la floración. Recientemente, se ha encontrado que tanto la proteína TFL1 como FT son capaces de interactuar también con otros factores de transcripción, aunque la relevancia biológica de dichas interacciones no se conoce con profundidad.

El primer objetivo de esta tesis ha sido el estudio del papel de TFL1 como regulador transcripcional. En primer lugar, el análisis de líneas activables por dexametasona nos ha permitido identificar los genes que responden a la activación postraduccional de TFL1. En segundo lugar, el análisis de las dianas de TFL1 mediante ChIP-Seq nos ha permitido identificar a cuáles de dichos genes se une TFL1. Los resultados obtenidos muestran de manera inequívoca que TFL1 funciona como un co-regulador transcripcional formando un complejo con FD.

En la segunda parte de este trabajo, se han estudiado los interactores de la proteína TFL1. Por un lado, se han llevado a cabo diferentes rastreos en levadura que nos han permitido identificar diversas proteínas capaces de formar complejos con TFL1. Por otro lado, entre los diferentes interactores identificados en estos rastreos, nos hemos centrado en tres factores de transcripción de tipo bZIP, bZIP30, bZIP52 y bZIP59, para analizar su papel en el control de la floración y el desarrollo de *Arabidopsis*. Ensayos de interacción proteína-proteína, así como el análisis de sus patrones de expresión, nos han permitido confirmar que tanto bZIP30 como bZIP52 son capaces de interactuar con TFL1 y que su patrón de expresión solapa con el de TFL1 en el ápice y la vasculatura del tallo, y en la raíz. Asimismo, el análisis de mutantes simples y múltiples, líneas de sobreexpresión y dominantes negativas de los tres genes sugiere que estos bZIP actúan redundantemente en diferentes procesos del desarrollo de la hoja y la semilla, así como en el control de la floración, posiblemente mediante su interacción con TFL1.

Los resultados de nuestro trabajo ponen de manifiesto la importancia de los complejos proteicos en los que participa TFL1 en el control de la floración, al tiempo que sugieren un posible papel de TFL1 en la regulación de otros procesos del desarrollo.

La transició de la fase vegetativa a la reproductiva, també coneguda com transició floral, es un pas crític en el cicle de vida de les plantes, pel que es troba finament regulat per una complexa xarxa genètica que respon a factors tant endògens com ambientals. El gen TFL1, i el seu homòleg FT, són dos dels reguladors claus en la transició floral. Ambdós codifiquen per a proteïnes del tipus PEBP(Phosphatidil Ethanolamine Binding Proteins) i, encara que no són factors de transcripció, ambdós regulen l'expressió dels gens responsables de la iniciació floral. No obstant, el mode d'acció de TFL1 com a regulador transcripcional encara no es coneix amb profunditat. S'ha proposat que tant TFL1 com FT regulen l'expressió gènica de les seues dianes mitjançant la formació de complexos amb FD, un factor de transcripció de tipus bZIP, en una interacció que es troba mediada per proteïnes tipus 14-3-3. Sorprenentment, a pesar de la seva gran similitud, TFL1 y FT desenvolupen funcions oposades en el control de la floració, ja que el complex FD-FT és un activador de la floració mentre que FD-TFL1 funciona com a repressor. Recentment s'ha descrit que tant la proteïna TFL1 com FT poden interaccionar també amb altres factors de transcripció, no obstant la rellevància biològica de dites interaccions encara no es coneix amb detall.

El primer objectiu d'aquesta tesi ha estat el estudi del paper de TFL1 com a regulador transcripcional. En primer lloc, el anàlisi de línies induïbles per dexametasona ens ha permès identificar els gens que responen a l'activació postraducciona de TFL1. En segon lloc, el anàlisi de les dianes de TFL1 mitjançant ChIP-Seq ens ha permès identificar a quins gens es troba unit TFL1. Els resultats d'ambdós aproximacions mostren de forma clara que TFL1 funciona com a co-regulador transcripcional formant un complex amb FD.

En la segona part d'aquest treball s'han estudiat els interactors de la proteïna TFL1. D'una banda, mitjançant la realització de rastrejos en llevat que ens han permès identificar diverses proteïnes que formen complexos amb TFL1. D'altra banda, entre els diferents interactors identificats en estos rastrejos ens hem centrat en tres factors de transcripció de tipus bZIP: bZIP30, bZIP52 i bZIP59, per a estudiar el seu paper en el control de la floració i el desenvolupament en Arabidopsis. Assajos d'interacció proteïna-proteïna, així com l'anàlisi dels seus patrons d'expressió ens han permès confirmar que tant bZIP30 com bZIP52 poden interaccionar amb TFL1, i que el seu patró d'expressió solapa amb el de TFL1 a la vasculatura de la tija, l'arrel i l'àpex. Així mateix, el estudi dels mutants simples i múltiples, les línies de sobre-expressió i les línies dominants negatives dels tres gens suggereix que estos bZIP actuen de forma redundat entre ells a diferents processos del desenvolupament de les fulles i les llavors, així com al control de la floració, possiblement mitjançant la seva interacció amb TFL1.

Els resultats del nostre treball posen de manifest la importància dels complexos proteics als que participa TFL1 en el control de la floració, al temps que suggereix un possible paper de TFL1 a altres processos del desenvolupament.

The switch from the vegetative to the reproductive phase, also known as floral transition, is a crucial step in the life cycle of plants, hence it is finely regulated by a complex genetic network responding to both endogenous and environmental cues. The *TFL1* gene, and its homolog *FT*, are two key regulators of floral transition. Both genes code for phosphatidylethanolamine binding proteins (PEBP) and, despite they are not transcription factors, both are known to regulate the expression of genes that are responsible for floral initiation. Nevertheless, the mode of action of TFL1 as a transcriptional regulator remains unclear. It has been proposed that TFL1 and FT regulate transcription of their target by forming a complex with FD, a bZIP transcription factor, in a complex mediated by 14-3-3 proteins. Interestingly, despite their high similarity, TFL1 and FT have opposite roles in the control of flowering, with the FD-FT complex acting as an activator, and the FD-TFL1 complex as a repressor. Recently, it has been shown that both TFL1 and FT are able to interact with other transcription factors, however, the biological relevance of such interactions has not been unveiled yet.

The first objective of this thesis has been the study of the role of TFL1 as a transcriptional regulator. First, the analysis of dexamethasone-activable lines allowed us to identify all the genes responding to the posttranslational activation of TFL1. Second, the analysis of the TFL1 target genes by ChIP-Seq allowed us to identify which genes are bound by TFL1. Our results provide solid evidence that TFL1 acts as a transcriptional co-regulator forming a complex with FD.

In the second part of this thesis, we studied the interactors of the TFL1 protein. On the one hand, we carried out several screenings in yeast that allowed us to identify different proteins that probably form complexes with TFL1. On the other hand, among the different interactors that we identified, we focused on three bZIP transcription factors, bZIP30, bZIP52 and bZIP59, to study their role in the control of flowering and development of Arabidopsis. Protein-protein interaction assays, as well as the analysis of their expression patterns, have allowed us to confirm that both bZIP30 and bZIP52 are capable of interacting with TFL1 and that their expression pattern overlaps with that of TFL1 in the shoot apex, in the shoot vasculature and in the root. In addition, the results of the analysis of simple and multiple mutants, overexpression lines and negative dominant lines of the three bZIP genes, suggests that they act redundantly in different processes in leaf and seed development, but also in the control of flowering, probably through its interaction with TFL1.

Our results enhance the important of the protein complexes in which TFL1 is involved in the control of flowering and suggest a feasible role of TFL1 in the regulation of other developmental processes.

INTRODUCCIÓN

1.1. El desarrollo de Arabidopsis

Las diferencias en la arquitectura de la planta se han utilizado con frecuencia como criterio para la clasificación sistemática y taxonómica de las distintas especies vegetales (Reinhardt and Kuhlemeier, 2002). Entendemos como arquitectura de la planta la organización tridimensional particular que adquieren los distintos órganos de la misma (Reinhardt and Kuhlemeier, 2002). La forma o arquitectura de una planta depende de la actividad y la identidad de un pequeño grupo de células indiferenciadas totipotentes, los meristemos. Los meristemos son los encargados de generar todos los órganos aéreos de las plantas, y su actividad, determinada o indeterminada, define la arquitectura de la planta. La arquitectura de la planta a su vez determina el hábito de crecimiento de la misma impactando fuertemente en su productividad (McGarry and Ayre, 2012). En el caso de la parte aérea de la planta, todos los órganos derivan de la actividad de los distintos meristemos responsables de iniciar tanto el eje primario o tallo principal (meristemos apicales), como los ejes laterales o ramas (meristemos axilares) (Périlleux et al., 2019). A lo largo de su ciclo de vida las plantas atraviesan diferentes fases en su desarrollo. Tras la germinación la plántula generalmente comienza una fase de crecimiento vegetativo. Esta etapa se divide a su vez en dos fases, una primera fase juvenil en la que la planta no es competente para florecer y que se caracteriza por la producción de órganos vegetativos, seguida por una fase adulta en la que la planta mantiene su crecimiento vegetativo, pero ya es capaz de responder a las señales que inducen la floración. Cuando las condiciones endógenas y exógenas son adecuadas, se produce la transición de la fase vegetativa a la fase reproductiva, en lo que se conoce como la transición floral, en la cual la planta deja de producir órganos vegetativos y empieza a producir las flores (Bäurle and Dean, 2006).

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), en la fase de desarrollo vegetativo, el meristemo apical del tallo (En adelante SAM de sus siglas en inglés *Shoot Apical Meristem*), que en este momento es un meristemo vegetativo, genera en sus flancos primordios foliares que darán lugar a hojas, las cuales se disponen con un ángulo de 137° , sin apenas elongación del tallo, formando una roseta. En las axilas de las hojas se forman meristemos axilares que dan lugar a las coflorescencias. La duración de esta fase es variable y depende de múltiples factores, como el fondo genético, o las condiciones ambientales, principalmente temperatura y fotoperiodo (Bowman et al., 1993; Huijser and Schmid, 2011). Al igual que en muchas otras especies, el desarrollo vegetativo en Arabidopsis se divide en dos fases: una primera fase juvenil caracterizada por la producción de hojas redondeadas, suaves y sin tricomas en la parte abaxial, y una segunda fase adulta en el que las hojas producidas son

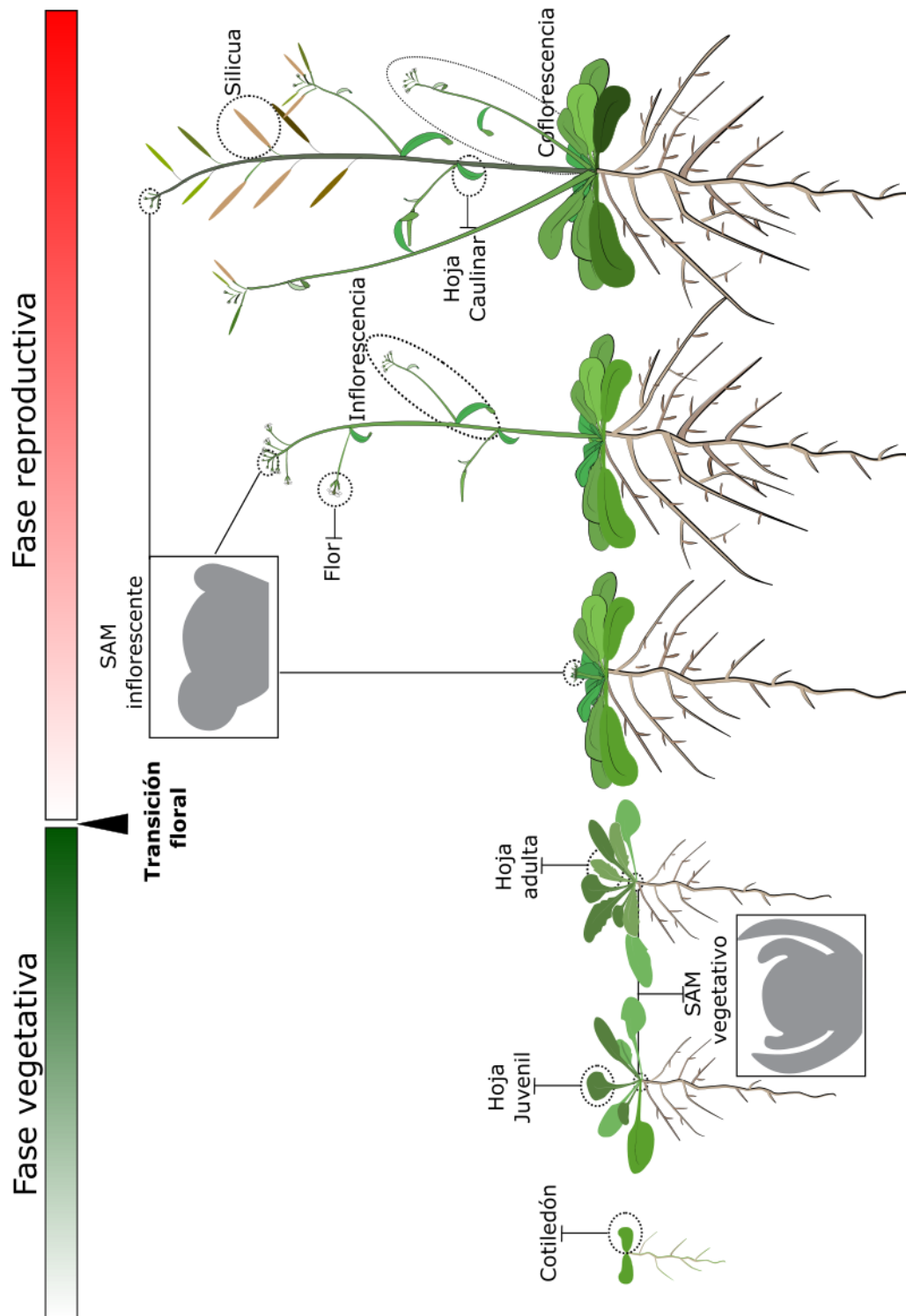


Figura I-1. Fases del desarrollo en Arabidopsis. Tras la germinación, Arabidopsis inicia la fase juvenil de crecimiento vegetativo en el que se generan hojas redondeadas con tricomas en la cara adaxial. A continuación, la planta pasa a una fase adulta de crecimiento vegetativo en el que se producen hojas alargadas y levemente serradas que presentan tricomas en ambas caras. En ambas fases de crecimiento vegetativo, las hojas se disponen sin elongación del tallo formando una roseta. Esta fase termina con la transición floral, tras la que la planta inicia su crecimiento reproductivo, la planta deja de producir hojas para generar órganos reproductivos, flores e inflorescencias. En una primera etapa del desarrollo reproductivo se producen coflorescencias, también conocida como inflorescencias primarias soportadas por hojas caulinares, más alargadas que las hojas de roseta. Finalmente, en una segunda etapa del desarrollo reproductivo se generan inflorescencias formadas únicamente por flores sin hoja caulinar.

alargadas y serradas, y presentan tricomas en ambas caras (Fouracre and Scott Poethig, 2019). Tras la transición floral, el meristemo apical se convierte en un meristemo inflorescente que genera en sus flancos meristemas florales que darán lugar a las flores (Fig. I-1).

1.2. El control genético de la floración

Elegir el momento idóneo para florecer es una de las decisiones más importantes en el ciclo vital de las plantas, ya que de ello depende su correcta adaptación al medio y su éxito reproductivo. A lo largo de su ciclo vital las plantas son capaces de recibir información de factores tanto ambientales como endógenos, e integrarla en rutas genéticas para así asegurar que la transición floral tenga lugar en el momento adecuado. Entre los factores exógenos más importantes que afectan la floración destacan, las diferencias en la longitud de la fase luminosa del día o fotoperiodo, y la exposición a períodos de frío o vernalización. No obstante, la combinación de estímulos capaces de inducir la floración varía entre las distintas especies. Así, encontramos plantas cuya floración es altamente dependiente del fotoperiodo como los girasoles, plantas con requerimientos de vernalización estrictos como el repollo, o plantas cuyo principal factor inductor de la floración es la edad como la piña (Lei et al., 2018, Martínez-Gómez P., 2019). Las rutas genéticas encargadas de recibir y coordinar los diferentes estímulos que inducen la floración son también conocidas como rutas genéticas de la floración. Se han definido seis rutas genéticas principales de la floración, tres que responden a factores ambientales o exógenos: la ruta del fotoperiodo, la ruta de la vernalización y la ruta de la temperatura; y tres que responden a factores endógenos de la planta: la ruta de las giberelinas, la ruta de la edad y la ruta autónoma. La información procedente de las distintas rutas de la floración es recogida por una serie de genes integradores, que serán los encargados de controlar la expresión de los genes de identidad del meristemo floral. Finalmente la formación de las flores a partir de los meristemas florales es controlada por una compleja red de regulación en la que los factores de transcripción de tipo MADS box juegan un papel esencial (Hartmann et al., 2000).

1.2.1 La ruta del fotoperiodo

Para muchas especies, la longitud de la fase luminosa del día, o fotoperiodo, es uno de los principales factores que afectan a la floración. Arabidopsis, por ejemplo, es una planta facultativa de día largo, es decir, el aumento en la longitud del día induce su floración aunque también es capaz de florecer en condiciones de día corto (Rédei, 1962).

En 1934, Knott demostró que las variaciones en la longitud del día son percibidas por las hojas y que la información obtenida es transmitida luego al SAM mediante una señal móvil conocida como florígeno. Desde ese momento se han dedicado múltiples esfuerzos a

comprender cómo la luz es percibida en la hoja, así como a descifrar la naturaleza y mecanismo de acción del florigeno. En este sentido, el estudio sistemático de mutantes en el tiempo de floración permitió establecer dos categorías entre los mutantes de floración tardía: por un lado aquellos cuyo fenotipo tardío se observa sólo en condiciones de día largo, que se clasificaron en lo que se conoce hoy como la ruta del fotoperiodo, y por otro lado, aquellos cuyo fenotipo tardío se mantenía independientemente del fotoperiodo, que se relacionaron con la ruta de floración autónoma (Rédei, 1962; Koornneef et al., 1991). El estudio en profundidad de los mutantes relacionados con el fotoperiodo permitió identificar tres reguladores clave de esta ruta: *CONSTANS* (CO), *GIGANTEA* (GI) y *FLOWERING LOCUS T* (FT). Hoy en día sabemos que FT es un componente esencial del florigeno (Kardailsky et al., 1999; Kobayashi, et al 1999), y que CO y GI son reguladores claves de la expresión de FT (Kobayashi and Weigel, 2007; Song et al., 2014).

En *Arabidopsis*, la luz es percibida en las hojas por los fotorreceptores, fitocromos y criptocromos, y la información percibida por estos receptores es integrada por el reloj circadiano, que regula la expresión de CO (Suárez-López et al., 2001). El factor de transcripción CO activa la expresión de FT en las hojas, concretamente en las células acompañantes del floema, y la proteína FT es capaz de viajar a través del floema hasta el meristemo apical (Wigge, 2011). Una vez en el meristemo, la proteína FT interacciona con el factor de transcripción de tipo bZIP FD en una interacción mediada por proteínas del tipo 14-3-3, formando lo que se conoce como el complejo activador de la floración o FAC (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Taoka et al., 2011; Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018). Finalmente, en el SAM, el FAC es el encargado de inducir la expresión de genes florales clave, tales como *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*), *LEAFY* (*LFY*) y *APETALA 1* (*AP1*).

Dado el papel central de FT en la inducción de la floración, su expresión se encuentra regulada, además de por CO, por una compleja red de señales activadoras y represoras que actúan a diferentes niveles, generando cambios en la transcripción, la remodelación de la cromatina o en la accesibilidad del locus FT para la interacción con factores de transcripción. Así, el complejo POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2) actúa fundamentalmente reprimiendo la expresión de FT durante el crecimiento vegetativo (Yoshida et al., 2001). Por otro lado, la proteína GIGANTEA (GI) se une y estabiliza a FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX PROTEIN1 (FKF1) que actúa promoviendo la estabilidad de la proteína CO en día largo, y degradando CDF, un represor de FT en día largo (Song et al., 2012; Song et al., 2014). Por último, los factores de transcripción tipo RAV, TEMPRANILLO 1 (TEM1) y TEMPRANILLO 2 (TEM2), se unen al promotor de FT reprimiendo su expresión (Castillejo y Pelaz, 2008) (Fig. I-2).

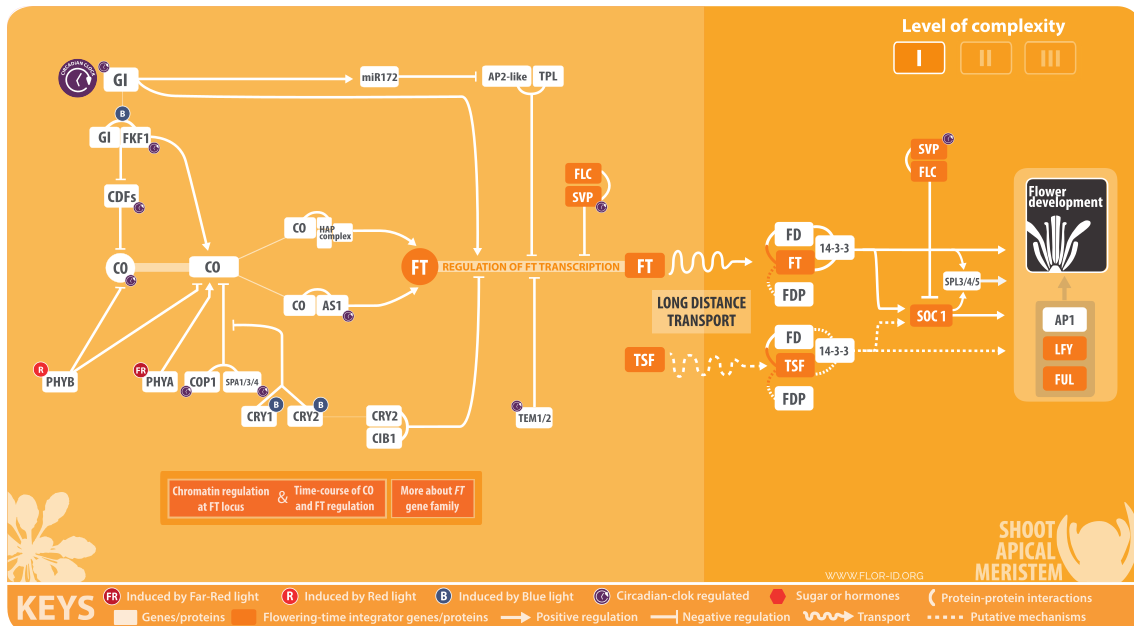


Figura I-2. Control genético de la floración por la ruta del fotoperiodo. El reloj circadiano regula la expresión de *GI*, que actúa modificando directamente la expresión de *FT*, y formando un complejo con *FKF1* que actúa promoviendo la degradación de los *CDFs* y por tanto activando indirectamente a *CO*. Los factores de transcripción *TEM1* y *2*, se unen al promotor de *FT* activando su expresión. *FT* se transporta desde las hojas, donde se perciben los cambios en la intensidad y la duración de la fase lumínica del día, hasta el SAM, donde interacciona con el factor de transcripción *FD* para regular la expresión de los genes de identidad del meristemo floral *AP1*, *LFY*, entre otros. Imagen tomada de FLOR-ID <http://www.phytosystems.ulg.ac.be/florid/> (Bouché et al., 2016)

1.2.2 La ruta de la vernalización

La vernalización es el proceso por el que una exposición prolongada a bajas temperaturas es capaz de promover la floración (Amasino, 2004). La forma en que las plantas responden a la presencia o no de un periodo frío en su ciclo vital para florecer, lejos de ser homogéneo varía en función de la especie y del ecotipo (Duncan et al., 2015; Leijten et al., 2018). En *Arabidopsis*, el estudio de diferentes ecotipos ha permitido identificar accesiones cuya floración se produce de forma rápida sin necesidad de vernalización, y otras en que la vernalización es requisito indispensable para iniciar la floración, conocidos como ecotipos anuales (Michaels and Amasino, 1999). El estudio de los ecotipos anuales mostró que la presencia del alelo dominante en un único gen, *FRIGIDA* (*FRI*), es el responsable, en gran parte, del requerimiento de vernalización. Para bloquear la floración *FRI* actúa sobre *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), un potente represor de la floración, promoviendo su expresión mediante mecanismos de modificación de histonas (Choi et al., 2011).

El estudio en profundidad del control de *FLC* en la respuesta a la vernalización permitió identificar también tres importantes reguladores, *VRN1*, *VRN2* y *VIN3* (Gendall et al., 2001; Levy et al., 2002; Sung and Amasino, 2004). *VIN3* es esencial para iniciar el reclutamiento de la maquinaria de remodelación de cromatina responsable del silenciamiento de *FLC*, mientras que

los genes *VRN1* y *2* actúan manteniendo el silenciamiento epigenético de *FLC* tras el fin de la exposición al frío. Además de la regulación a nivel epigenético, el tratamiento con frío induce la producción de dos RNA antisentido, *COOLAIR*, a partir de la secuencia codificante de *FLC*, capaz de reprimir su expresión de forma muy rápida constituyendo la primera respuesta al frío (Chen and Penfield, 2018) y *COLD AIR*, codificado por el primer intrón de *FLC*, y cuya expresión se activa tras los primeros 10 días de vernalización, cuando la expresión de *FLC* se encuentra reprimida para activarla de nuevo, y cuya expresión es necesaria para el reclutamiento de CURLY LEAF (CLF) al promotor de *FLC* (Heo and Sung, 2011; Kim et al., 2017) (Fig. I-3). En resumen, en ausencia de frío *FLC* se encuentra desacetilado, y su transcripción está activada. Tras el inicio de un periodo frío, se activa la producción de *COOLAIR*, que reduce la expresión de *FLC*. Tras una exposición mantenida al frío, *VIN3* induce la metilación de la histona H3, silenciando la expresión de *FLC*. Este silenciamiento se mantiene gracias a la acción de *VRN1* y *VRN2*. Finalmente, los reguladores de la ruta autónoma FLD y FVE también actúan modificando la metilación de las histonas de *FLC*.

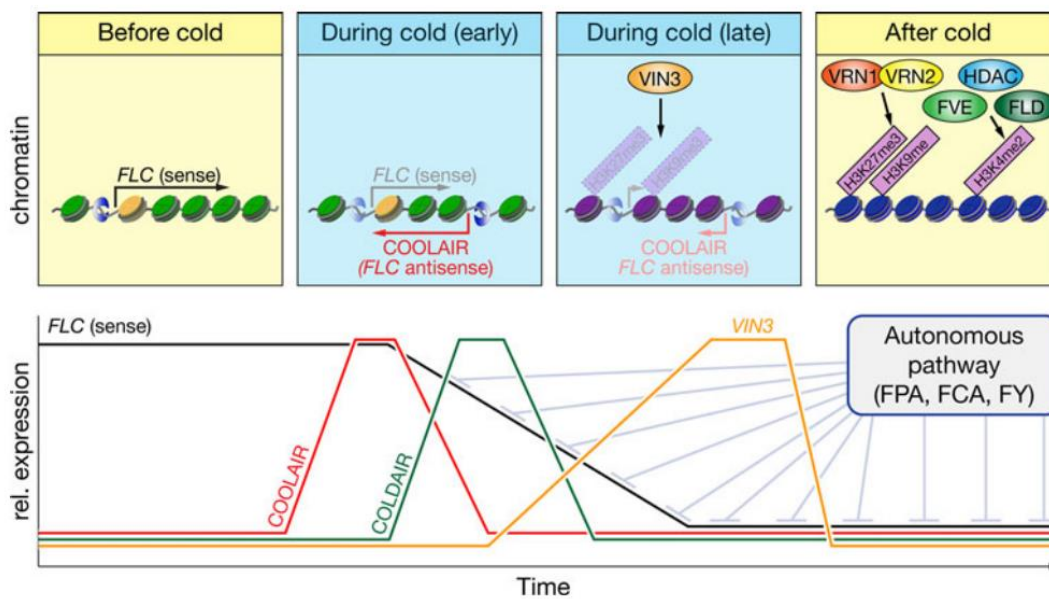


Figura I-3. Regulación de *FLC* en respuesta al frío. En ausencia de frío la expresión de *FLC* se activa. Tras el inicio de un periodo frío se activa la expresión de *COOLAIR* reprimiendo *FLC*. Tras una exposición mantenida al frío *VIN3* silencia la expresión de *FLC* modificando la metilación de su histona H3. Figura tomada de (Srikanth and Schmid, 2011)

1.2.3. La ruta de las giberelinas

Desde su descubrimiento en 1930, las giberelinas (GAs) se han relacionado con múltiples procesos como la germinación de las semillas, el desarrollo de las raíces, la elongación celular, el desarrollo floral o el control del tiempo de floración (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009).

La cascada de señalización por giberelinas se inicia con la unión de la forma bioactiva de las GAs a su receptor, GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 (GID1). La unión GID1-GAs induce cambios conformacionales en GID1 que permiten que interactúe con las proteínas DELLA, que son reguladores negativos clave en la señalización por GAs, iniciando así su proceso de degradación (Murase et al., 2008; Shimada et al., 2008). A su vez, la homeostasis de las GAs se mantiene principalmente gracias a la regulación de las enzimas GA20-oxidasa y GA3-oxidasa, ambas responsables de catalizar los últimos pasos de la síntesis de la forma bioactiva de las GAs, y a la GA2-oxidasa, que contribuye a su inactivación y reemplazo (Fig. I-4) (Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009).

Se ha visto que los mutantes de pérdida de función en los genes de biosíntesis de GAs, como el mutante *ga1*, presentan un cierto retraso en la floración en condiciones de fotoperiodo de día largo, y son incapaces de florecer en condiciones de día corto, sugiriendo un papel central de las GAs en ausencia del estímulo del fotoperiodo (Koorneef et al., 1985; Galvão et al., 2012). Investigaciones posteriores han permitido demostrar que en condiciones de día corto, en las que los niveles *FT* son muy bajos, las GAs son las encargadas de activar la expresión de genes clave para la iniciación de las flores, como *LFY* y *AP1*, por una vía independiente de *FT* (Blázquez et al., 1998; Mutasa-Göttgens and Hedden, 2009; Conti, 2017). Se ha visto además, que las GAs son capaces de inducir la expresión de *SOC1*, siendo éste el principal factor en la inducción de la floración por la aplicación exógena de GAs en día corto (Moon et al., 2003).

Por otro lado, se ha observado que en condiciones de fotoperiodo inductivas de día largo, las GAs son capaces de inducir la expresión de *FT* y de *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE 3 (SPL3)* en la hoja (Hisamatsu and King, 2008; Galvão et al., 2012), promoviendo la floración (Fig. I-4). Estas observaciones concuerdan con el fenotipo tardío descrito en los mutantes de biosíntesis de GAs en condiciones de día largo.

Recientemente se ha observado que TEMPRANILLO 1 y 2 (TEM1, TEM2), represores de *FT*, son capaces de inhibir directamente la expresión de los enzimas *GA3ox1* y *GA3ox2* de forma redundante entre ellos (Castillejo and Pelaz, 2008; Osnato et al., 2012).

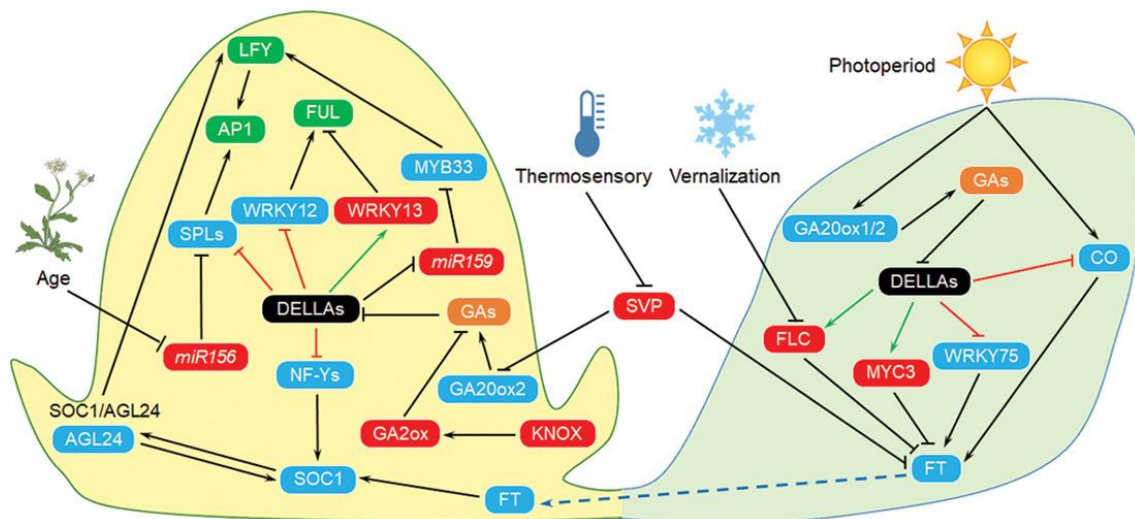


Figura I-4. Control de la transición floral por las Giberelinas en Arabidopsis. En la hoja la GA20ox induce la expresión de FT vía CO, al mismo tiempo GA20ox induce la síntesis de GAs activas que a su vez activan la expresión de FT en la hoja. La proteína FT viaja al SAM a través de la vasculatura. En el centro del SAM la inactivación de las GAs por la GA2ox regula la entrada de GA al SAM, donde las GAs promueven la degradación de las DELLA, permitiendo la activación de SOC1 y LFY. Las flechas y barras en T negras indican activación y represión a nivel transcripcional respectivamente. Las flechas verdes y las barras en T rojas indican activación y represión a nivel de proteína, respectivamente. Tomado de Bao et al., 2020.

1.2.4. La ruta autónoma

Uno de los primeros mutantes descritos en Arabidopsis en relación con el tiempo de floración fue *luminidependens (ld)* (Rédei, 1962), un mutante que mostraba floración tardía independientemente del fotoperiodo. A partir de este momento se inició un estudio sistemático que permitió identificar toda una serie de mutantes que mostraban alteraciones en el tiempo de floración, y clasificarlos en función de su comportamiento (Koornneef et al., 1991; Koornneef et al., 1998). Esta aproximación permitió identificar, entre otros, toda una serie de mutantes cuyo fenotipo de floración tardía se mantenía independientemente del fotoperiodo y cuya floración se aceleraba tras un tratamiento largo de vernalización. Estos genes se agruparon en lo que se denominó ruta autónoma de la floración, por su autonomía con respecto al fotoperiodo. Entre los genes clasificados originalmente en esta ruta se encuentran *FCA*, *FY*, *FA*, *FVE*, *FLD* y *FLK*.

Todos los genes pertenecientes a la ruta autónoma actúan conjuntamente previniendo la acumulación del mRNA del gen *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, que codifica un factor de transcripción de la familia de los MADS, que es un potente represor de la floración en Arabidopsis (Michaels and Amasino, 1999; Michaels and Amasino, 2001). *FLC* se expresa mayoritariamente en el SAM y en la raíz, y es capaz de reprimir de forma directa o indirecta a los principales genes integradores de las rutas de floración, *FT* y *SOC1*, y a genes de identidad del meristemo floral, como *LFY* (Nilsson et al., 1998; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al.,

1999; Blazquez and Weigel, 2000; Lee et al., 2000; Samach et al., 2000). La regulación del gen *FLC* por los genes pertenecientes a la ruta autónoma se produce principalmente a nivel de la modificación de histonas y del procesamiento del mRNA (Boss et al., 2004; Simpson, 2004; Quesada et al., 2005; Bäurle and Dean, 2006; Cheng et al., 2017).

1.2.5. La ruta de la edad

La identidad y la actividad de los componentes de las distintas rutas de la floración muestra que, mientras que la ruta del fotoperiodo actúa como un regulador positivo de la floración, el resto de las rutas funcionan anulando la acción de los mecanismos represores para promover la floración (Wang, 2014). Sin embargo, se ha visto que incluso los mutantes de la ruta del fotoperiodo son capaces de florecer transcurrido un tiempo, sugiriendo la existencia de una ruta endógena que asegura la floración incluso en ausencia de señales inductoras la ruta de la edad (Wang, 2014). La ruta de la edad se encuentra gobernada por microRNAs (miRNAs), pequeñas moléculas de entre 21-24 nucleótidos de RNA no codificante, entre los que los miRNA156 y miRNA172 tienen un papel central. En fase juvenil los niveles del miRNA156 son elevados en las hojas, reprimiendo la expresión de sus genes diana, los *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE (SPL)*. A su vez, la ausencia de miRNA172 permite a las proteínas AP2-like, AP2, TARGET OF EAT1 (TOE1), TOE2, SCHLAFMUTZE (SMZ) y SCHNARCHZAPFEN (SNZ) reprimir, junto con TOPLESS (TPL), la expresión de *FT*. Antes de la transición floral la expresión del miRNA156 en hojas baja, en una represión mediada por azúcares, promoviendo un incremento en la expresión de miRNA172, y de los *SPL*, *SPL3* y *SPL9*, entre otros, que actúan junto con TPL promoviendo la floración mediante la activación de los genes *MADS AP1*, *FUL* y *SOC1* y de *LFY* (Fig. I-5) (Yamaguchi, 2008; Wang et al., 2009).

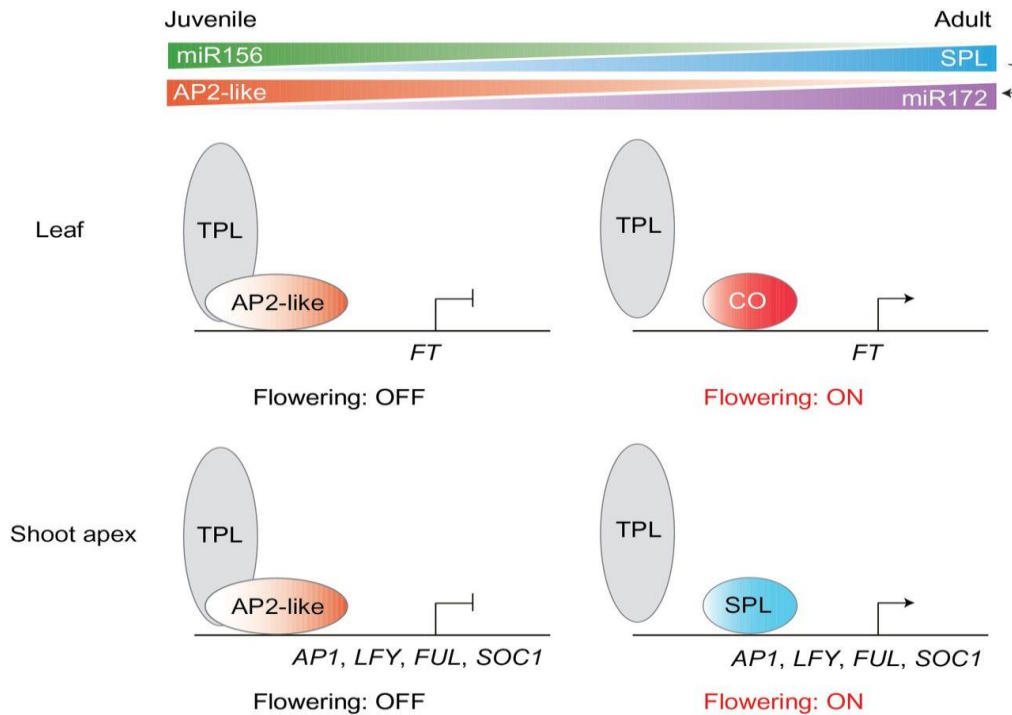


Figura I-5. Control de la transición floral por la ruta de la edad en Arabidopsis. En la fase juvenil los niveles de miRNA156 son elevados, mientras que los de miRNA172 se mantienen bajos. La ausencia de miRNA172 permite a las proteínas AP2-like reprimir, junto con TPL, la expresión de *FT* en hojas. En fase adulta los niveles de miRNA156 se reducen drásticamente. Como consecuencia, los niveles de sus SPL diana aumentan, promoviendo la expresión de *LFY* y de los MADS-Box *AP1*, *FUL*, y *SOC1*, así como la acumulación de miRNA172. Figura tomada de Wang, 2014.

1.3. Los genes integradores: Nexos entre las diferentes rutas genéticas de la floración

Como se ha descrito anteriormente, elegir el momento óptimo para florecer es una de las decisiones más importantes en el ciclo vital de las plantas. Es por ello que se han identificado un gran número de genes implicados en cada una de las distintas rutas genéticas que controlan la floración. Estos estudios han mostrado que, lejos de actuar de forma independiente, las distintas rutas se encuentran interconectadas, regulando conjuntamente a una serie de genes comunes, que actúan como "integradores" de las rutas genéticas (Srikanth and Schmid, 2011) y que controlan a su vez la expresión de los genes responsables de la iniciación floral.

Tres genes han sido definidos como genes integradores: *LEAFY (LFY)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, y *FT* (Simpson and Dean, 2002; Boss et al., 2004).

Los genes *FT* y *SOC1* son inducidos de manera directa por el factor de transcripción *CO*, un regulador central en la respuesta al fotoperiodo, a la vez que se encuentran regulados negativamente por *FLC*, un integrador de las rutas autónoma y de la vernalización. De este modo, *FT* y *SOC1* actúan interconectando las rutas autónoma y de la vernalización con la ruta del fotoperiodo (Fig. I-6) (Lee et al., 2000; Onouchi et al., 2000; Samach et al., 2000). Además, ambos genes se encuentran a su vez regulados por la ruta de las giberelinas. En el caso de *FT*,

las giberelinas inducen su expresión, causando la degradación de las proteínas DELLA, que son reguladores negativos de *FT*, ya que forman un complejo proteico con CO que previene la unión de éste al promotor de *FT* (Bao et al., 2019). Por otro lado, las giberelinas promueven la degradación de las DELLAs eliminando la represión de las DELLAs sobre NUCLEAR FACTOR Y (NF-Y) que puede entonces activar *SOC1* de forma directa (Fig. I-6) (Hou et al., 2014).

LFY fue descrito inicialmente por su función clave en la especificación del meristemo floral, ya que los mutantes *lfy* muestran una transformación parcial de las inflorescencias en ramas inflorescentes (Weigel et al., 1992). Sin embargo, estudios posteriores mostraron que la sobreexpresión de *LFY* causa un adelanto notable de la floración y que, además de expresarse en los meristemos florales en formación, *LFY* se expresa también en los primordios de hoja en la fase vegetativa y que su nivel de expresión en el ápice sube coincidiendo con la transición floral (Weigel and Nilsson, 1995; Blázquez et al., 1997). Todo ello sugiere un doble papel de *LFY* controlando la identidad del meristemo floral y el tiempo de floración. El gen *LFY* se encuentra regulado por *SOC1* en respuesta a condiciones de fotoperiodo de día largo y por las giberelinas, actuando ambas rutas directamente sobre su promotor (Blázquez et al., 1998; Lee et al., 2008; Bao et al., 2019).

La regulación de los genes responsables de la iniciación floral por parte de los genes integradores se produce generalmente de forma directa, por ejemplo se ha descrito que el dímero FT-FD es capaz de unirse de forma directa al promotor de *AP1* y *LFY* y activar su expresión (Wigge et al., 2005; Collani et al., 2019; Zhu et al., 2020).

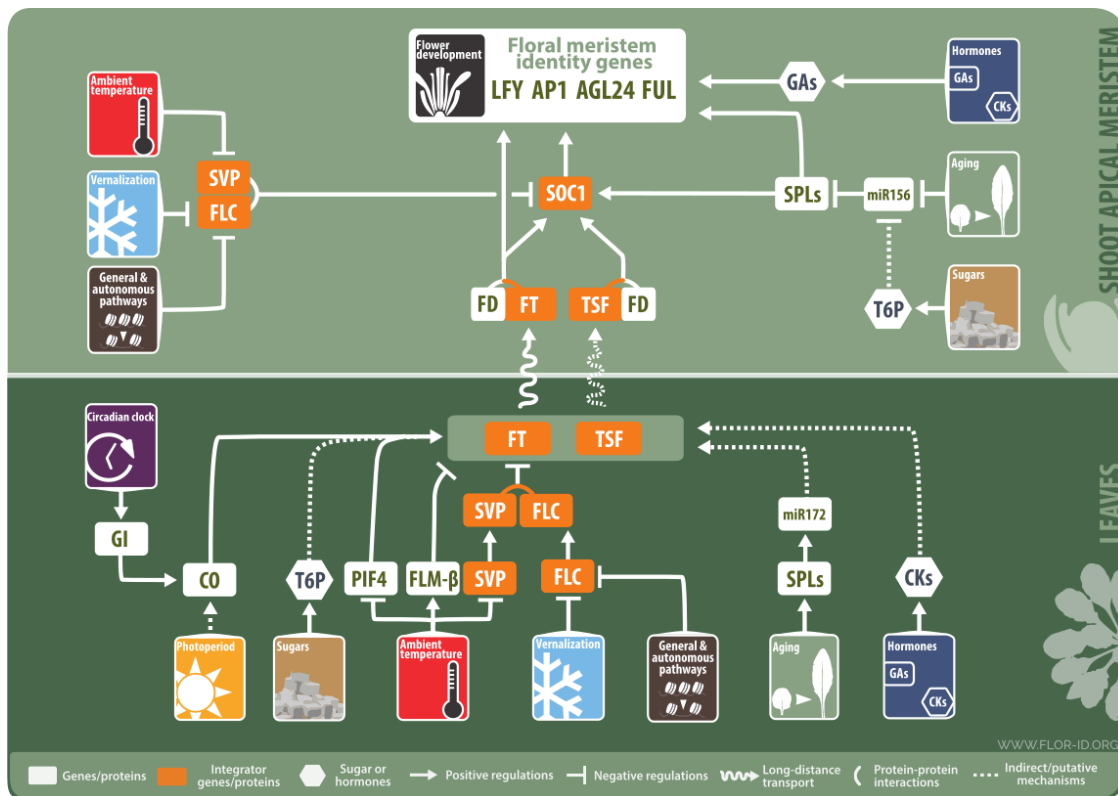


Figura I-6. Integración de las rutas genéticas que controlan la floración en Arabidopsis. Las rutas genéticas que controlan la floración en Arabidopsis perciben señales exógenas, como la temperatura, la calidad de la luz, y la duración de la fase lumínica del día, o endógenas, como el estado hormonal o la edad, y transmiten esta información a unos pocos genes integradores. Los genes integradores son los encargados de recoger toda la información procedente de las diferentes rutas e integrarla para, si se cumplen las condiciones correctas, activar la expresión de los genes responsables de la iniciación y el desarrollo floral. Imagen tomada de FLOR-ID <http://www.phytosystems.ulq.ac.be/florid/> (Bouché et al., 2016)

1.4. Los genes de identidad del meristemo floral

Como se ha descrito en el apartado anterior, la floración se encuentra regulada por una compleja red de rutas genéticas interconectadas, que convergen en unos pocos genes integradores. Finalmente, los genes integradores son los encargados de regular la actividad de los denominados genes de identidad del meristemo floral, cuya función es hacer que los meristemas (o primordios) que se forman en los flancos del SAM adquieran la identidad de meristemas florales y que éstos se conviertan en flores. Para esto último, los genes de identidad del meristemo floral activan y controlan la actividad de los genes homeóticos florales, que son los encargados de dirigir la formación de los diferentes órganos de la flor. La mutación de los genes de identidad del meristemo floral causa que los primordios formados por el SAM no lleguen a convertirse en meristemas florales y, que por tanto, las flores sean sustituidas por ramas y/o por inflorescencias (Blázquez et al., 2006). Los genes de identidad del meristemo floral se encuentran conservados en la mayor parte de las angiospermas e incluyen, en Arabidopsis, los factores de transcripción *LFY* y *APETALA1 (AP1)* (Gocal et al., 2001; Zhao et al., 2016).

Tras la germinación, *LFY* se expresa débilmente en los primordios de las hojas, sin embargo justo antes de la transición floral las distintas rutas inductoras de la floración promueven un aumento progresivo de su expresión en el ápice del tallo, aumento que resulta clave para la iniciación de la transición floral (Blázquez et al., 1997). Tras la transición floral, durante el desarrollo de la inflorescencia, *LFY* se expresa fuertemente en los flancos del meristemo apical del tallo, en los grupos de células que darán lugar a los primordios (*floral anlagen*), así como en los primordios, que han de convertirse en meristemos florales, especificando y manteniendo su identidad floral (Weigel et al., 1992). Para ello, *LFY* activa la expresión de *AP1* y *CAL*, que a su vez mantienen inducida la expresión de *LFY* en un bucle de retroalimentación positivo. *AP1*, *CAL* y *LFY* actúan conjuntamente en el meristemo floral evitando su reversión a meristemo inflorescente mediante la represión, entre otros, del gen *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)* (Bowman et al., 1993; Parcy et al., 1998; Liljegren et al., 1999; Wagner et al., 1999; Kaufmann et al., 2010). En estadios posteriores, *LFY* actúa también activando la expresión de los genes homeóticos florales *APETALA3 (AP3)* y *PISTILATA (PI)* (Weigel and Nilsson, 1995; Parcy et al., 1998).

Algunos trabajos también consideran gen de identidad del meristemo floral, además de los anteriores, al factor de transcripción *FRUITFULL (FUL)* basándose en el fenotipo asociado al triple mutante *ap1 cal ful*, en el que el meristemo apical inflorescente, prolifera descontroladamente generando nuevos meristemos inflorescentes, con expresión de *TFL1*, y frecuentemente sustentados por órganos vegetativos que se asemejan a brácteas u hojas caulinares; esas plantas son incapaces de florecer. Este fenotipo sugiere por tanto un papel redundante de *FUL* con *AP1* y *CAL* en el control de la expresión de *LFY* y de *TFL1* (Irish and Sussex, 1990; Ferrándiz et al., 2000).

1.5. Los genes de identidad del meristemo inflorescente

Arabidopsis muestra un crecimiento indeterminado, por lo que a lo largo de su desarrollo el meristemo apical del tallo mantiene un crecimiento continuado, al tiempo que genera en sus flancos meristemos inflorescentes que darán lugar a los diferentes órganos vegetativos, hojas y ramas, o meristemos florales que darán lugar a los órganos florales. El control genético que evita la determinación del meristemo inflorescente del tallo, tras la transición floral, en *Arabidopsis* lo lleva a cabo fundamentalmente el gen *TFL1*, cuya expresión se concentra, sobre todo, en el centro de los meristemos del tallo, donde desarrolla una función antagónica a la de los genes de identidad del meristemo floral *LFY* y *AP1*.

1.6. El gen *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*)

El gen *TFL1* es un regulador clave del desarrollo de la inflorescencia y la arquitectura de la planta en *Arabidopsis*. *TFL1* debe su nombre al fenotipo que causa en *Arabidopsis*, dónde su pérdida de función provoca la determinación de las inflorescencias, indeterminadas en la planta silvestre, con la formación de una flor terminal (Shannon and Meeks-Wagner, 1991). En el mutante *tfl1* la ausencia de la represión ejercida por *TFL1* sobre *LFY* y *AP1*, promueve una expansión de la expresión de éstos hacia el centro del meristemo apical del tallo, lo que provoca la conversión de éste de meristemo inflorescente a meristemo floral, desembocando finalmente en la formación de una flor terminal en el caso del SAM y de flores axilares en el caso de los meristemas laterales (Fig. I-7) (Shannon and Meeks-Wagner, 1991; Bradley et al., 1997b; Ratcliffe et al., 1999b). En el genotipo silvestre, sin embargo, la expresión de *TFL1* queda confinada al centro del meristemo inflorescente, manteniendo su carácter indeterminado, mientras que *LFY* y *AP1* se expresan en los flancos de dicho meristemo promoviendo la formación de meristemas florales que darán lugar a las flores. Los dos tipos de genes mantienen su patrón de expresión, complementario, mediante represión mutua (Huala and Sussex, 1992; Weigel et al., 1992; Bowman et al., 1993; Gustafson-Brown et al., 1994; Bradley et al., 1997a; Ratcliffe et al., 1999a).

Además de las alteraciones en la arquitectura de la planta, con la formación de la flor terminal y la sustitución de las ramas por flores axilares, el mutante *tfl1* muestra un adelanto significativo del tiempo de floración, tanto en condiciones de día largo como en día corto, mientras que su sobreexpresión produce retraso de la floración con un alargamiento notable de la fase de crecimiento vegetativo (Bradley 1997, Shannon y Meeks-Wagner).

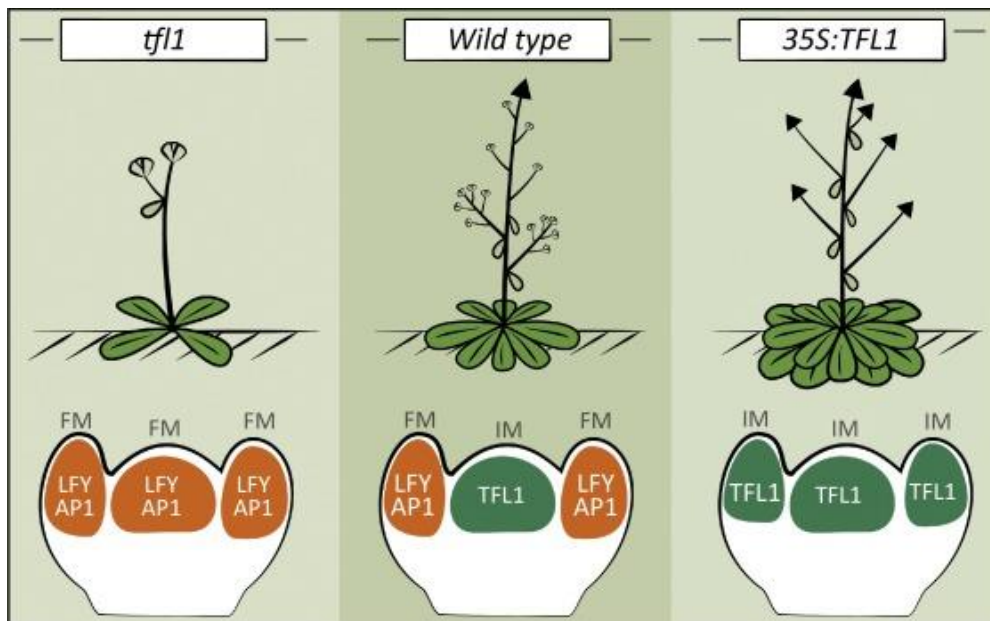


Figura I-7. Papel de la expresión de *TFL1* en la arquitectura de *Arabidopsis*. En la planta silvestre (panel central) la expresión de *TFL1* queda confinada al centro del SAM, mientras que *AP1*, y *LFY* se expresan en los flancos de éste. La pérdida de función de *tfl1* (panel izquierdo) causa una expansión de la expresión de *LFY* y *AP1* hacia el centro del SAM, induciendo su conversión en un meristemo floral. La sobreexpresión de *TFL1* (panel derecho) causa una expansión de *TFL1* hacia los flancos del meristemo, evitando su conversión en meristemos florales.

1.6.1. Patrón de expresión de *TFL1*

El gen *TFL1* muestra un patrón de expresión complejo y dinámico. Al contrario que la mayoría de los genes que controlan los meristemos, como *STM* o *WUS*, que se expresan en todos los meristemos de la parte aérea de la planta, *TFL1* se expresa únicamente en los meristemos del tallo (Périlleux et al., 2019). Tras la germinación, durante el desarrollo vegetativo, *TFL1* se expresa débilmente en el centro del SAM vegetativo. Durante la transición floral, la expresión de *TFL1* se induce fuertemente en el centro del meristemo inflorescente (Bradley et al., 1997a). Al mismo tiempo, en los meristemos situados en las axilas de las hojas, que darán lugar a las ramas laterales o coflorescencias, la expresión de *TFL1* se mantiene elevada y expandida en todo el meristemo desde el inicio de la formación de la hoja, y su expresión va bajando en nivel y va restringiéndose al centro del meristemo a medida que se produce la elongación del tallo (Conti and Bradley, 2007; Serrano-Mislata et al., 2016).

El análisis funcional de *TFL1* ha mostrado que su patrón de expresión juega un papel esencial en el control de la arquitectura y el tiempo de floración en *Arabidopsis*. Por un lado, la expresión de *TFL1* durante el desarrollo vegetativo es importante en su papel como regulador del tiempo de floración. Por otro lado, su expresión en el centro del meristemo inflorescente resulta esencial para reprimir la expresión de los genes de identidad del meristemo floral, *LFY* y

AP1, manteniendo así el crecimiento indeterminado del tallo y evitando la formación de una flor terminal (Bradley et al., 1997a; Conti and Bradley, 2007; Serrano-Mislata et al., 2016).

1.6.2. Función de *TFL1* como regulador de la arquitectura de la inflorescencia

Una de las funciones más claras de *TFL1* es el control de la arquitectura de la inflorescencia. Existen distintos tipos de inflorescencias que se organizan en dos grupos atendiendo a si forman, o no, flor terminal: las inflorescencias abiertas o racemosas, en las que el meristemo del tallo se mantiene en crecimiento continuado durante toda la vida de la planta y todas las flores son producidas en posiciones laterales; y las inflorescencias cerradas o cimosas, en las que el meristemo apical forma una flor terminal. Se han propuesto diferentes factores que influyen en el desarrollo de los distintos tipos de inflorescencia. Uno de los factores que ha mostrado ser clave en el desarrollo de los distintos tipos de inflorescencia es la cantidad de tiempo empleado por los diferentes meristemas para cambiar su estado desde el desarrollo vegetativo al floral (Prusinkiewicz et al., 2007; Perilleux et al., 2014). El modelo propuesto por Prusinkiewicz y colaboradores en 2007 relaciona este factor con la actividad del gen *TFL1*, ya que se ha visto que la actividad de *TFL1* se encuentra elevada en el SAM en las plantas con inflorescencias abiertas, pero no en las plantas con inflorescencias cerradas (Prusinkiewicz et al., 2007; Thouet et al., 2008). Consistentemente con esta observación, la expresión ectópica de *TFL1* promueve un incremento en la ramificación en algunas especies como *Arabidopsis thaliana*, vid (*Vitis vinifera*), o maíz (*Zea mays*) (Ratcliffe et al., 1999a; Danilevskaya et al., 2010; Crane et al., 2012).

En las inflorescencias racemosas la expresión de *TFL1* es elevada en el centro del SAM inflorescente para evitar la expresión de los genes de identidad del meristemo floral, activados por las distintas rutas inductoras de la floración (Bradley et al., 1997b; Ratcliffe et al., 1998; Foucher et al., 2003). Diversos modelos computacionales indican que para el mantenimiento de una pequeña población de células indiferenciadas en el centro del SAM es necesario que el incremento en la expresión de *TFL1* sea proporcional a la fuerza de la señal inductora de la floración, o señal florigénica, que constituye FT (Jaeger et al., 2013). Sin embargo, el mecanismo que regula el ajuste entre ambas expresiones es todavía desconocido. Se sabe que existen múltiples señales que controlan la transición floral, como las giberelinas, las citoquininas o los niveles de azúcares (Corbesier et al., 2003; Eriksson et al., 2006; Wahl et al., 2013; Bao et al., 2019). Recientemente se ha descrito que *TFL1* es activado de forma directa por LFY, si bien ambas proteínas se localizan en dominios distintos en el SAM (Sessions et al., 2000; Goslin et al., 2017; Serrano-Mislata et al., 2017). Por otro lado, se ha descrito que el factor de transcripción

de tipo MADS *XAANTAL2* (*XAL2*) es capaz de unirse directamente al promotor de *TFL1* activando su expresión (Pérez-Ruiz et al., 2015). Una de las opciones que se baraja es que *TFL1* y *FT* puedan competir en el SAM para unirse a sus interactores y así activar o reprimir una serie de dianas comunes, como los genes florales, y que sea, por tanto, el balance de expresión entre ambos genes el que determine el cambio o no de fase (Zhu et al., 2020).

1.6.3. Función de *TFL1* como regulador de los genes de identidad del meristemo floral

Entender cómo *TFL1* regula a los genes de identidad del meristemo floral es esencial para explicar los fenotipos en el tiempo de floración y arquitectura que se observan en el mutante y en la sobreexpresión de *TFL1*. Como se ha descrito anteriormente, los genes de identidad del meristemo floral, *LFY* y *AP1* muestran un patrón de expresión complementario al de *TFL1* en el meristemo inflorescente, complementariedad que se mantiene mediante represión mutua. De este modo, la ausencia de la represión ejercida por *TFL1* en el centro del meristemo inflorescente que tiene lugar en el mutante *tfl1*, permite la expresión de *LFY* y *AP1* en dicho meristemo y su conversión en un meristemo floral, que se determinará formando una flor terminal (Weigel et al., 1992; Bowman et al., 1993; Baumann et al., 2015). Por otra parte, la expresión de *TFL1* con el promotor constitutivo 35S causa la “invasión” por parte de *TFL1* del dominio de expresión de *LFY* y *AP1*, en los flancos del meristemo inflorescente, de modo que los meristemas que deberían ser florales se convierten en meristemas indeterminados que producen estructuras vegetativas (Ratcliffe et al., 1998). Del mismo modo, la expresión de *LFY* o *AP1* con el promotor constitutivo 35S suprime en gran medida la expresión de *TFL1* en el ápice, dando lugar a plantas con flor terminal cuyo fenotipo es similar al del mutante *tfl1* (Liljegren et al., 1999; Ratcliffe et al., 1999a). Finalmente, se ha observado, que *AP1* y *LFY* son capaces de unirse de forma directa al promotor de *TFL1* reprimiendo su expresión de forma directa (Kaufmann et al., 2010; Moyroud et al., 2012; Pérez-Ruiz et al., 2015; Winter et al., 2015; Goslin et al., 2017; Serrano-Mislata et al., 2017). Sin embargo, y aunque se ha propuesto que *TFL1* actúa a su vez regulando la expresión de *AP1* y *LFY*, esta hipótesis no ha sido confirmada experimentalmente hasta el momento.

Todo esto pone de relieve la gran importancia que tiene el mantenimiento del correcto patrón de expresión de *TFL1*, *AP1* y *LFY* para la especificación y desarrollo de los distintos meristemas del ápice inflorescente. Al mismo tiempo, todo ello muestra el papel central de la regulación antagónica entre *TFL1* y *AP1* y *LFY* en el establecimiento y mantenimiento de sus respectivos patrones de expresión.

1.7. El gen *FLOWERING LOCUS T (FT)*

El concepto de florígeno surgió a raíz de los estudios llevados a cabo por Chailakhyan en 1936, en los que analizó mediante injertos en variedades sensibles al fotoperiodo cómo las diferencias en la longitud del día pueden inducir la floración en algunas especies, y ligaba este hecho a la producción de una señal móvil en las hojas capaz de viajar hasta el ápice e inducir la transición floral, el florígeno (Chailakhyan, *et al.*, 1936). Desde aquel momento, los esfuerzos se centraron en la identificación del florígeno. En este sentido, el estudio en profundidad de los mutantes relacionados con la ruta del fotoperiodo permitió identificar tres reguladores clave de esta ruta: *CONSTANS (CO)*, *GIGANTEA (GI)* y *FLOWERING LOCUS T (FT)*. Hoy en día sabemos que *FT* es un componente del florígeno (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi, *et al.* 1999), y que *CO* y *GI* son reguladores claves de la expresión de *FT*. Se ha visto que mutaciones en el gen *FT* causan un importante retraso en el tiempo de floración mientras que su expresión constitutiva genera un notable adelanto de la floración (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999).

Al contrario que la mayor parte de los genes implicados en la identidad del meristemo floral o en la floración, cuya expresión se localiza mayoritariamente en el ápice del tallo, *FT* se expresa principalmente en la vasculatura de la hoja, en respuesta a fotoperiodos largos. La proteína *FT* sintetizada en las hojas viaja a través del floema hasta el SAM, donde induce la transición floral (Corbesier *et al.*, 2007; Pin and Nilsson, 2012).

1.8. Las proteínas TFL1 y FT

Las proteínas *FT* y *TFL1* son pequeñas proteínas globulares de unos 23kDa pertenecientes a la familia de las *Phosphatidil Ethanolamine Binding Proteins (PEBP)*. Las *PEBP* son una familia de proteínas conservadas presentes en todos los taxones desde bacterias a animales. A pesar de que su secuencia se encuentra conservada, las *PEBP* se han relacionado con múltiples procesos biológicos. En general las *PEBP* actúan como reguladores en diferentes rutas de señalización para el control del crecimiento y la diferenciación celular (Karlgrén *et al.*, 2011).

Pese a que desempeñan funciones opuestas en el control del tiempo de floración, *FT* promueve la floración mientras que *TFL1* la reprime, *FT* y *TFL1* son proteínas homólogas que comparten cerca de un 56,4% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Estudios exhaustivos de ambas proteínas han mostrado que unos pocos aminoácidos son clave para la divergencia funcional entre ambos genes de forma que el cambio de un único aminoácido, *TFL1-H88*; *FT-Y85*; o del segmento B codificado por el cuarto exón es suficiente para intercambiar sus funciones (Hanzawa *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2006; Ho and Weigel, 2014).

Se sabe que tanto FT como TFL1 actúan regulando la expresión de genes, como por ejemplo los genes de identidad del meristemo floral, sin embargo, las PEBPs no son factores de transcripción y carecen de capacidad de unión al DNA, por lo que FT y TFL1 requieren de la interacción con factores de transcripción, tales como la proteína de tipo bZIP FD, para inducir o reprimir la transcripción de sus genes dianas (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). Se ha visto además que, en algunas especies como *Arabidopsis*, tomate o arroz, la interacción entre FT y TFL1 con FD se encuentra mediada por proteínas del tipo 14-3-3, formando los llamados Complejo Activador de la Floración (FAC) FT-(14-3-3)-FD y Complejo Represor de la Floración (FRC) TFL1-(14-3-3)-FD (Pnueli et al., 2001; Taoka et al., 2011). La existencia de interactores comunes de FT y TFL1 necesarios para que éstos desarrollen su función como reguladores de la floración, tales como FT, la necesidad de que exista un balance entre la señal activadora de FT y la señal represora de TFL1 para el correcto desarrollo de la inflorescencia, y el hecho de que FT y TFL1 regulen de forma opuesta una serie de dianas comunes, apoyan la existencia de una competencia de ambas proteínas por reclutar a sus interactores y por unirse a sus genes dianas (Hanano and Goto, 2011; Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018; Collani et al., 2019).

Un estudio que analizó la robustez de FT frente a las mutaciones y la capacidad de éstas para alterar su actividad mostró que ciertas mutaciones en al menos cuatro residuos distintos son suficientes para convertir a FT en “TFL1” (Hanzawa et al., 2005). El análisis en profundidad de estas mutaciones ha revelado que no alteran la interacción de FT y TFL1 con FD o las 14-3-3, aunque sí modifican la carga de la superficie de la proteína, lo cual podría afectar a la interacción con un putativo ligando hasta el momento desconocido. Este estudio cuestiona el hecho de que sea la unión de FD y las 14-3-3 con FT y TFL1 la base de su divergencia funcional, y propone como potencial candidato a esta función uno o varios factores de transcripción de la familia de los TCP (Ho and Weigel, 2014).

De acuerdo con esta observación, en el estudio realizado en esta tesis sobre las dianas de FD y TFL1 mediante CHIP-Seq (Ver capítulo 1 de resultados, secciones 2 y 3) se muestra que, aunque ambos genes comparten 358 genes dianas en común, éstas suponen solo un tercio de los genes diana para TFL1, lo que indica que TFL1, además de con el bZIP FD, interacciona también con otros factores de transcripción, formando complejos transcripcionales cuya identidad y relevancia funcional aún se desconocen. El análisis de los motivos a los que se encuentra unido TFL1 muestra como motivo más sobrerrepresentado un motivo G-Box CACGTG, el cuál apunta a factores de transcripción de la familia bZIP o bHLH como posibles interactores de TFL1 (Collani et al., 2019; Goretti et al 2020).

Rastros llevados a cabo en el sistema de doble híbrido de levadura, para identificar nuevos interactores de TFL1 han mostrado que éste es capaz de interactuar proteína-proteína con algunos factores de transcripción de tipo bZIP como FD y FDP. Si bien la formación del complejo TFL1-FD y su papel en el control de la floración se ha estudiado con profundidad, así como la implicación de FD y FDP en la floración y la respuesta a ABA, todavía se desconoce la relevancia de su papel formando complejos con TFL1, así como si TFL1 es capaz de interactuar con otros bZIPs (Wigge et al., 2005; Pullen et al., 2013; Jang et al., 2017; Romera-Branchat et al., 2020).

1.9. Los factores de transcripción de tipo bZIP

Los factores de transcripción de tipo bZIP (*basic region leucine zipper*) constituyen una familia de proteínas ampliamente conservada en los organismos eucariotas, que se caracteriza por poseer una región básica de unión al DNA, adyacente a un dominio tipo "dedo de zinc" que permite su dimerización. Análisis genéticos, moleculares y bioquímicos han mostrado que los bZIPs participan en numerosos procesos, como la diferenciación de órganos y tejidos, la elongación celular, la respuesta a estrés, el control del balance de carbono y nitrógeno, el metabolismo energético o la señalización por azúcares. Generalmente, los bZIPs actúan en forma de dímeros, por tanto, la posibilidad de formar heterodímeros les confiere una gran versatilidad para actuar como reguladores transcripcionales, permitiéndole a un mismo bZIP variar la identidad y/o afinidad de sus dianas en función del dímero formado (Rodríguez-Martínez et al., 2017).

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado 78 bZIPs que se clasifican en 13 grupos, A-S, en función, principalmente, de la similitud de secuencia de su región básica (Jakoby et al., 2002). Actualmente, se han analizado funcionalmente muchos de los bZIPs de *Arabidopsis*, lo cual ha permitido reunir una gran cantidad de datos funcionales que muestran su participación en una amplia variedad de procesos, desde la respuesta a estrés biótico y abiótico, la detoxificación, la formación y el desarrollo de órganos y tejidos, o el control de la transición floral.

1.9.1. Los bZIPs del grupo A

El grupo A está compuesto de 13 miembros, que a su vez se clasifican en cuatro subgrupos, tres de los cuales se han caracterizado bien a nivel funcional. El primero de estos subgrupos lo componen los genes *ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR (ABFs)* 1-4. Las proteínas codificadas por estos genes desarrollan un papel central en la señalización por ácido abscísico (ABA) de forma parcialmente redundante entre ellas. La expresión de estos genes se activa mediante las cascadas de señalización del ABA en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad y el frío, promoviendo una respuesta adaptativa

de la planta que contrarreste la deficiencia de agua en los tejidos, por ejemplo, el cierre de los estomas en respuesta a la sequía (Banerjee and Roychoudhury, 2017). El segundo de los subgrupos, dentro de los bZIPs de tipo A, comprende los genes *DC3 PROMOTER BINDING FACTOR (DPBF)* 1-4. Los factores DPBFs se encuentran estrechamente relacionados con los ABFs y al igual que ellos desempeñan un papel central en la señalización por ABA especialmente en la última fase del desarrollo de las semillas (Banerjee and Roychoudhury, 2017). Además se ha visto que ABA INSENSITIVE 5 (ABI5) DPBF1, participa además en el control de la transición floral, afectando la transcripción de *FLC*, un represor directo de *FT* (Shu et al., 2016; Shu et al., 2018). Finalmente, el tercer grupo de bZIPs de clase A bien caracterizado lo componen los genes *FLOWERING LOCUS D (FD)* y *FD PARALOG (FDP)*. Ambos genes se expresan en el ápice dónde participan en el control de la transición y el desarrollo floral mediante su unión con FT y TFL1, así como en la respuesta a ABA en plántulas (Abe et al., 2005; Romera-Branchat et al., 2020). Tanto FT como TFL1 requieren de su unión con FD y otras proteínas del tipo 14-3-3 para regular la expresión de genes florales y de identidad del meristemo floral, tales como *LFY* o *AP1* (Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018; Goretti et al., 2020; Zhu et al., 2020).

1.9.2. Los bZIPs del grupo I

El grupo I de factores de transcripción de tipo bZIP comprende 12 miembros algunos de los cuales han sido ampliamente estudiados a nivel funcional, como el gen *bZIP51 (VIP1)* que se ha propuesto que participa en la infección por *Agrobacterium*. El análisis de los diferentes bZIPs del grupo I indica que participan en numerosos procesos del desarrollo, como la formación del polen, el desarrollo del carpelo, el control de la división celular y el desarrollo de la hoja, la formación de callos mediada por ABA, y la regeneración o el control de la organización de la pared celular, actuando en muchos de estos procesos de forma redundante entre ellos (Djamei et al., 2007; Tsugama et al., 2012; Gibalová et al., 2016; Lozano-Sotomayor et al., 2016; Tsugama et al., 2016; Lapham et al., 2018; Kaneko-Suzuki et al., 2018). Por último, estudios llevados a cabo en los ortólogos de los bZIPs del grupo I en otras especies han mostrado que éstos podrían tener un papel en el desarrollo de los haces vasculares (Pyo et al., 2006). No obstante, sólo unos pocos de los bZIPs del grupo I han sido caracterizados con profundidad a nivel funcional, por lo que su papel en algunos procesos como la regulación del ciclo celular o la respuesta a estrés todavía no está suficientemente clara.

OBJETIVOS

El gen *TFL1* es un regulador clave en el control genético de la floración y la arquitectura en *Arabidopsis*. A pesar de que el papel de *TFL1* en estos procesos se conoce con profundidad, su mecanismo de acción todavía no se ha estudiado con detalle. Es por ello que creemos que comprender el mecanismo de acción de la proteína TFL1 puede ayudar a entender mejor su contribución a estos procesos y proporcionar pistas sobre nuevos genes implicados la regulación del desarrollo de *Arabidopsis*.

Objetivo general

Comprender el mecanismo de acción de TFL1, un regulador clave de la floración en *Arabidopsis*.

Objetivos específicos

- 1) Identificar los genes que responden a la activación postraduccional de TFL1
- 2) Identificar las proteínas a las que se une TFL1 in vivo
- 3) Caracterizar funcionalmente los genes bZIP30, bZIP52 y bZIP59, interactores de FT y TFL1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico1.1. Material vegetal

Este estudio se ha realizado con el modelo experimental *Arabidopsis thaliana*. Además, para la expresión transitoria “in planta”, en los ensayos de BiFC y para el análisis de localización subcelular, se utilizó *Nicotiana benthamiana*. Como parental silvestre de *Arabidopsis* se utilizó el ecotipo Col-0. Los mutantes de pérdida de función en los genes de los bZIPs provienen de la colección de líneas mutantes de T-DNA del instituto SALK (<http://signal.salk.edu>), de la colección de mutantes de la universidad de Bielefeld GABI-KAT (<https://www.gabi-kat.de/>) y de la colección de mutantes de T-DNA de Syngenta, SAIL. El mutante *ft-20* fue cedido por el Dr. George Coupland.

1.1.1. Líneas mutantes

Las líneas mutantes utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla MM_1.

Tabla MM_1 - Líneas mutantes de *Arabidopsis* utilizadas en este trabajo

LÍNEA	MUTÁGENO	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	COLECCIÓN_ CÓDIGO REFERENCIA
<i>bzip18</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_110712
<i>bzip18</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GABI-KAT_641D12
<i>bzip29</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_059214
<i>bzip29</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_087636
<i>bzip30</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_045675
<i>bzip30</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_003870
<i>bzip52</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_033320
<i>bzip52</i>	T-DNA	Col-0	Sulfadiazina	GABI-KAT_457B12
<i>bzip59</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_087636
<i>bzip69</i>	T-DNA	Col-0	Kanamicina	SALK_087636
<i>bzip69</i>	T-DNA	Col-0	BASTA	SAIL_1211_H04
<i>bzip52-2</i>	CRISPR/Cas9	Col-0		
<i>bzip69-2</i>	CRISPR/Cas9	Col-0		
<i>tfl1-1</i>	EMS	Col-0		(Shannon and Meeks-Wagner, 1991)
<i>ft-20</i>	T-DNA	Col-0	BASTA	SAIL 165_G11 (Segarra <i>et al.</i> , 2009)

1.1.2. Líneas transgénicas

En este trabajo se han utilizado las líneas transgénicas que se detallan en la tabla MM_2.

Tabla MM_2 - Líneas transgénicas utilizadas en este trabajo

LÍNEA	CONSTRUCCIÓN	FONDO GENÉTICO	SELECCIÓN	PROCEDENCIA
35S:bZIP30	PMS19	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:bZIP52.1	PMS20	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:bZIP52.2	PMS21	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:bZIP59	PMS25	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:bZIP69	PMS26	Col-0	Higromicina	Este trabajo
2x35S:bZIP30-SRDX	PMS12	Col-0	Higromicina	Este trabajo
2x35S:bZIP52.1-SRDX	PMS13	Col-0	Higromicina	Este trabajo
2x35S:bZIP52.2-SRDX	PMS14	Col-0	Higromicina	Este trabajo
pbZIP30:GUS	PMS09	Col-0	Higromicina	Este trabajo
gbZIP52.1-GUS	PMS10	Col-0	Higromicina	Este trabajo
gbZIP52.2-GUS	PMS11	Col-0	Higromicina	Este trabajo
gbZIP59-GUS		Col-0	Higromicina	Torrellas, 2014
35S:GFP-bZIP30	PMS64	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:GFP-bZIP52.1	PMS65	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:-GFPbZIP52.2	PMS66	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:GFP-bZIP59	PMS67	Col-0	Higromicina	Este trabajo
35S:bZIP30		Col-0	BASTA	Stefan de Folter
35S:bZIP30-GFP		Col-0		Stefan de Folter
pMDC163:DVL8-GUS		Col-0	Higromicina	Primo, 2013
35S:bZIP69 (<i>bzip69</i> , SAIL1211H04)	PMS26	<i>bzip69</i> SAIL1211H04	Basta Higromicina	Este trabajo
PMS74		<i>tf1-1</i>	Higromicina	Este trabajo
<i>ap1cal</i> 35S:AP1-GR		Col-0		Richard Immink
35S:FT		Col-0		George Coupland
35S:TFL1		Col-0		George Coupland
pHEE401e_sgRNA9+19	PMS60	Col-0	Higromicina	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA9+19	PMS60	<i>bzip59</i>	Higromicina	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA6+47	PMS62	Col-0	Higromicina	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA6+47	PMS62	<i>bzip18</i> (GK_641D12)	Higromicina	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA6+47	PMS62	<i>bzip59</i> (SALK_87636)	Higromicina	Este trabajo

1.1.3 Cultivo de Arabidopsis en invernadero

Las plantas de Arabidopsis se cultivaron en una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita, en alveolos de 6,5 x 6,5 x 5 cm o de 4,1 x 4,5 x 5 cm. Una vez sembradas, las semillas se estratificaron durante 3-4 días en 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) para completar un fotoperiodo de 16h, y la temperatura se mantuvo constante entre 21°C y 23°C. Alternativamente, las plantas también se cultivaron en cámaras de cultivo, con iluminación procedente de tubos fluorescentes de luz blanca fría (4600lm), bajo un fotoperiodo de día largo de 16h luz y 8h oscuridad a 21°C, o de día corto de 8h de luz y 16 de oscuridad. El riego se llevó a cabo por inmersión dos veces por semana, una vez con agua y otra vez con solución Hoagland nº1 suplementada con oligoelementos (Hewitt, 1966). Las plantas de *N.benthamiana* se cultivaron en macetas con una mezcla 2:1:1 de turba negra:perlita:vermiculita, en cabinas de invernadero a una temperatura estable entre 21 y 23°C.

1.1.4 Cultivo de Arabidopsis in vitro

Para el cultivo in vitro, utilizado para seleccionar plantas transgénicas, las semillas de *A.thaliana* se esterilizaron con 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 minutos con agitación y se dejaron secar. 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 2.2 g/L de sales MS (Duchefa), 20 g/L de sacarosa, 0.1 g/L MES, y 6.0 g/L de agar. Como agentes selectivos se utilizaron Higromicina (40µg/mL), glufosinato de amonio (Basta, 15µg/mL) o Kanamicina (50µg/mL) según fuera el caso. Las semillas, tras sembrarlas en las cajas de Petri, se estratificaron durante 3-4 días a 4°C en oscuridad y, a continuación, se trasladaron a cabinas de cultivo in vitro con fotoperiodo de día largo de 16h y temperatura constante de 24°C. La luz fue proporcionada por tubos fluorescentes Sylvania Gro Lux 36W que emitían luz blanca fría (850 lm).

1.1.5 Fertilización cruzada en Arabidopsis

Para cruzar los diferentes genotipos para la obtención de los múltiples mutantes *bzip* se emascularon las flores receptoras con la ayuda de unas pinzas de disección hasta dejar únicamente el pistilo, a continuación, se recogieron los estambres de la planta donante y se depositó el polen sobre el estigma de la planta receptora. Los pistilos polinizados se recogieron una vez elongados en el momento en el que empezaban a abrirse las valvas.

1.2. Material bacteriano

En este trabajo se han utilizado las cepas bacterianas descritas en la tabla MM_3.

Tabla MM_3 - Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

CEPA	USO	ORIGEN/REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Transformación de bacterias	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> Supercharge EZ10	Transformación de bacterias	Clontech
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 pMP90	Transformación de Arabidopsis	(Koncz and Schell, 1986)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pJ69-4 α	Transformación de levadura	(James <i>et al.</i> , 1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> pJ69-4 A	Transformación de levadura	(James <i>et al.</i> , 1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH104	Transformación de levadura	Clontech, (James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)(James <i>et al.</i> , 1996)

1.2.1 Cultivo de bacterias *in vitro*

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

Para la selección de bacterias transformadas, los medios de cultivo se suplementaron, según fue necesario, con la siguiente relación de antibióticos: Espectinomicina (100 μ g/mL), Cloramfenicol (33 μ g/mL), Gentamicina (100 μ g/mL), Ampicilina (100 μ g/mL), Amikacina (50 μ g/mL), Kanamicina (50 μ g/mL) y Rifampicina (100 μ g/mL)

1.2.2. Cultivo de levaduras *in vitro*

Las levaduras se cultivaron, de forma general, en medio YDP (*Yeast extract-Peptone-Dextrose*), compuesto por: Extracto de levadura 10g/L, Peptona 20g/L, Dextrosa 20g/L pH 7.0. El medio sólido se obtuvo añadiendo agar al medio 20g/L. Los cultivos de levadura se incubaron 48h a 28°C, con agitación de 200rpm en el caso de los cultivos líquidos.

Para la selección de levaduras transformantes se empleó el medio mínimo SD (*Syntetic Drop-Out*): Base de nitrógeno para levadura sin aminoácidos 6.7g/L, suplementado con todos

los aminoácidos requeridos en cada caso: Histidina 200mg/L, leucina 120mg/L, lisina 60mg/L, triptófano 20mg/L, tirosina 20mg/L, treonina 40mg/L, metionina 20mg/L y fenilalanina 50mg/L, uracilo 20g/L, adenina 20mg/L. Para obtener el medio sólido se añadió agar 20g/L.

1.2.3. Conservación de los microorganismos en glicerol

Para la conservación de los cultivos de bacteria y levadura a largo plazo se prepararon glicerizados en crioviales a partir de cultivos en fase exponencial de *E.coli*, *A.tumefaciens*, o *S.cerevisiae* a los que se añadió glicerol puro hasta alcanzar una concentración final del 25%. Una vez generados los glicerizados, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido en el caso de *E.coli* y *A.tumefaciens*, en el caso de *S.cerevisiae* se enfriaron en hielo, finalmente todos los viales se almacenaron en cajas de congelación a -80°C.

2 Métodos de biología molecular

2.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

2.1.1 Extracción de DNA plasmídico de *E.coli*

Para las extracciones de DNA plasmídico procedente de *E.coli* se emplearon kits comerciales. Para las extracciones a pequeña escala se partió de 4mL de un cultivo en fase estacionaria de *E.coli* crecido en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, y se utilizó el sistema *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas). Para las extracciones a mediana y gran escala se empleó el sistema *Plasmid Midi kit* (Qiagen) partiendo de 100mL de un cultivo saturado de *E.coli* en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

2.1.2 Extracción de DNA plasmídico de *A.tumefaciens*

Para el aislamiento de DNA plasmídico desde cultivos de *A.tumefaciens* se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.*, 1989, partiendo de 5mL de un cultivo en fase estacionaria de la bacteria, crecida previamente durante 48h a 20°C en medio LB suplementado con Rifampicina 100µg/mL más los antibióticos necesarios. Dada la baja cantidad, calidad y pureza del DNA obtenido mediante este protocolo en *A.tumefaciens*, el DNA resultante se empleó, únicamente, para la transformación de nuevo de células de *E.coli*, de donde se volvió a purificar el plásmido para su posterior análisis mediante secuenciación Sanger o digestión enzimática.

2.1.3 Extracción de DNA plasmídico de levadura

El aislamiento de DNA plasmídico a partir de cultivos de *S.cerevisiae*, se utilizó para la identificación, mediante PCR y secuenciación Sanger, de los cDNAs de Arabidopsis contenidos en los plásmidos presa obtenidos en los rastreos de doble y triple híbrido frente a genotecas de cDNA. Para ello, se siguió el protocolo descrito por Hoffman and Winston, 1987, partiendo de 2mL de un cultivo en fase estacionaria de levadura crecida en medio SD suplementado con los aminoácidos necesarios.

2.1.4. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis

Para la extracción de DNA genómico de Arabidopsis se recogieron en hielo hojas jóvenes de aproximadamente 1cm de logitud. El DNA genómico se extrajo siguiendo el protocolo “*Quick DNA prep for PCR*” descrito por Weigel y Glazebrook, 2009. Finalmente, el DNA obtenido se resuspendió en 70µL de agua Milli-Q.

2.1.5. Extracción de RNA total de Arabidopsis

Para la extracción de RNA de Arabidopsis se recolectaron las muestras en nitrógeno líquido evitando en la medida de lo posible su descongelación. Las muestras congeladas se molieron con la ayuda de mortero y pistilo hasta obtener un polvo fino, que se alicuotó en tubos de microcentrífuga con aproximadamente 100mg de polvo cada uno.

La extracción de RNA de Arabidopsis para el análisis del nivel de expresión de un gen mediante RT-qPCR se realizó utilizando el sistema “*E.Z.N.A. Plant RNA kit*” (Omega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se cuantificó en un sistema Nanodrop ND1000 (Applied), y su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Finalmente, para eliminar los posibles rastros de DNA genómico el RNA obtenido se trató con DNasa utilizando el sistema “*DNA free kit*” (Fermentas).

El análisis de expresión mediante RNA-Seq requiere la utilización de RNAs de alta calidad, integridad y pureza, por lo que para este tipo de análisis las extracciones de RNA mensajero se realizaron utilizando el sistema “*RNeasy Plant Mini Kit*” (Qiagen), realizando el tratamiento con DNasa directamente sobre la columna utilizando el sistema “*RNase-Free DNase Set*” (Qiagen). El RNA obtenido se cuantificó con NanoDrop ND1000 y su calidad se determinó en un Bioanalyzer 2100 (Agilent), utilizándose posteriormente únicamente las muestras que presentaron un valor RIN igual o superior a 9.

2.2. Manipulación de ácidos nucleicos

2.2.1. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se partió de 3µg de RNA de Arabidopsis previamente aislado y tratado con DNasa según lo descrito en el apartado 2.1.5, que se transcribió utilizando el sistema “*SuperScript IV*” y “*Oligo dT₁₂₋₁₈*” (Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se utilizó para amplificar fragmentos de DNA con diferentes finalidades, como la clonación, el genotipado de líneas mutantes o la cuantificación de la expresión génica. En cada caso se emplearon diferentes combinaciones de cebadores específicos (Tabla S1), moldes de DNA de diversa naturaleza como cDNA, DNA genómico, DNA plasmídico o fragmentos de PCR, así como diferentes tipos de DNA polimerasas. En el caso de la amplificación fragmentos de DNA para su posterior clonaje se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *HF Phusion* (Thermo), mientras que para el genotipado de líneas mutantes se empleó la polimerasa comercial *GoTaq* (Fermenta), siguiendo para ambas polimerasas el protocolo descrito por el fabricante. Las condiciones generales para ambas polimerasas se muestran en las tablas MM_4 y MM_5.

Tabla MM_4 - Condiciones generales utilizadas para la amplificación de DNA mediante PCR. Mezclas de reacción estándar

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

Tabla MM_5 - Condiciones generales utilizadas para 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	∞	∞

La temperatura óptima de hibridación de los cebadores 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

Algunos de los procedimientos llevados a cabo tras la PCR como la clonación o la secuenciación requieren la utilización de amplicones de DNA de alta calidad y pureza, por lo que a menudo se llevó a cabo un paso extra de purificación tras la amplificación.

En los casos en que la amplificación mediante PCR generó un único fragmento mayoritario se procedió a limpiar los restos de cebadores, tampones y polimerasa utilizando el sistema “*NúcleoSpin PCR cleanup*” (MachereyNagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En los casos en los que la PCR generó varios fragmentos mayoritarios de diferentes tamaños se procedió a separarlos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El fragmento de interés se recortó del gel con la ayuda de una cuchilla y el DNA contenido en el fragmento se recuperó utilizando el sistema “*NucleoSpin Gel Cleanup*” (MachereyNagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ambos casos el DNA limpio se eluyó en 15µL de agua Milli-Q estéril.

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). Para llevar a cabo la RT-qPCR en primer lugar se diseñaron cebadores específicos para el gen a analizar (Tabla S1) utilizando el software Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), procurando, en la medida de lo posible, ajustarlos a los siguientes parámetros: T^a hibridación entre 58-62°C, contenido en

GC entre 40-60%, amplicones generados entre 180-300pb. Cada una de las parejas de cebadores diseñadas se probó en una qPCR con diluciones seriadas del cDNA (1, 1/10, 1/100 y 1/1000) para, por un lado, probar su eficiencia de amplificación y, por otro, analizar otros posibles problemas de la amplificación como la generación de amplicones inespecíficos o de dímeros de cebadores, descartando todas las parejas que mostraron valores de eficiencia inferiores a 90 o superiores a 110.

Las reacciones de RT-qPCR, tanto para la cuantificación como para el cálculo de la eficiencia de los cebadores, se realizaron en un volumen final de 10µL, que incluía 2µL de cDNA (0.02ng/µL), 2µL de “*Premix PyroTaq Eva Green qPCR Mix Plus*” (GMC) (5X), y 0.4 µL de cada uno de los cebadores (5µM). Todas las reacciones realizaron por triplicado y se llevaron a cabo en un termociclador “*7500 Fast PCR System*” (Applied). El cDNA del gen de interés se cuantificó, durante la fase exponencial de la reacción de PCR, en función del número de ciclos necesarios para superar el umbral determinado de fluorescencia (Ct). A partir de este valor, se calculó la expresión relativa del gen de interés respecto al gen constitutivo *TIP41* según el método “ $\Delta\Delta$ threshold cycle (Ct)” utilizando la siguiente fórmula.

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

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 para cada enzima el tampón y las condiciones recomendadas por el fabricante. El análisis de los fragmentos de DNA generados en la digestión 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]. La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, en caso de ser necesaria, se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.

2.3. Construcciones

2.3.1. Vectores plasmídicos utilizados

En este trabajo se emplearon los vectores descritos la tabla MM_6.

Tabla MM_6. Vectores plasmídicos utilizados en este trabajo

NOMBRE	RESISTENCIA (bacteria/Planta) CARACTERÍSTICAS	USO	PROCEDENCIA
pGEM-T/Easy	Ampicilina /- Sitios T7 y SP6 de inicio de la transcripción	Clonación de productos de PCR.	Invitrogen
pCR8/GW/TOPO	Espectinomicina, Sitios de unión para cebadores M13 directo y reverso, GW1 y GW2.	Clonación de productos de PCR. Vector entrada sistema <i>Gateway</i>	Invitrogen
pYFN43	Kanamicina/ Higromicina Mitad N' de la YFP	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad N-terminal de la proteína fluorescente YFP	A. Ferrando, IBMCP
pYFC43	Kanamicina/ Higromicina Mitad C' de la YFP	Vector de expresión. Generación de fusiones traduccionales a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente YFP	A. Ferrando IBMCP
pMDC43	Kanamicina/ Higromicina	Clonaje y transformación de <i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Arabidopsis</i> . Contiene el promotor 35S y la proteína GFP	Invitrogen
pMDC99	Kanamicina/ Higromicina	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> .	Invitrogen
pMDC123	Kanamicina/ Higromicina	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> .	Invitrogen
pMDC32	Kanamicina/ Higromicina Promotor 2x35S	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> . Contiene un promotor 2x35S	Invitrogen
pMDC163	Kanamicina/ Higromicina	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> . Contiene la proteína GUS	Invitrogen
pDONR201	Kanamicina	Vector entrada sistema <i>Gateway</i>	Invitrogen
pDONR221	Kanamicina	Vector entrada sistema <i>Gateway</i>	Invitrogen
pMOG800		Vector que contiene el gen GFP bajo el control del promotor 35S	Carmen Hernández, IBMCP

pGADT7	Ampicilina Dominio de activación de GAL4	Clonaje y transformación de <i>levadura</i> . Contiene el dominio de activación para ensayo de Y2H	Monica Colombo, Fondazione Edmund Mach
pGBKT7	Kanamicina Dominio de unión de GAL4	Clonaje y transformación de <i>levadura</i> . Contiene el dominio de unión para ensayo de Y2H	Monica Colombo, Fondazione Edmund Mach
pHEE401_E	Kanamicina/ Higromicina Cas9, promotor U6	Clonaje y transformación de <i>Arabidopsis</i> . Obtención de líneas CRISPR.	Addgene (Wang <i>et al.</i> , 2015)
pCBC_DT1DT2	Cloramfenicol	Clonaje del <i>backbone</i> para la generación de construcciones CRISPR.	Addgene (Wang <i>et al.</i> , 2015)
pCBC_DT2DT3	Cloramfenicol	Clonaje del <i>backbone</i> para la generación de construcciones CRISPR.	Addgene (Wang <i>et al.</i> , 2015)
pCBC_DT3DT4	Cloramfenicol	Clonaje del <i>backbone</i> para la generación de construcciones CRISPR.	Addgene. (Wang <i>et al.</i> , 2015)
pTFT1	Ampicilina	Vector destino <i>Gateway</i> , para la realización de ensayos de triple híbrido en levadura	R.Immink, WUR
pDEST32	Gentamicina Dominio de Unión de GAL4	Vector destino <i>Gateway</i> que contiene el dominio de unión a DNA para llevar a cabo ensayos de doble híbrido en levadura	Invitrogen
pDEST22	Ampicilina Dominio de activación de GAL4	Vector destino <i>Gateway</i> que contiene el dominio de activación para llevar a cabo ensayos de doble híbrido en levadura	Invitrogen
vector Ω2-pTFL1	Espectinomicona/Higromicina, marcador DsRed en semilla. Promotor completo TFL1	Vector binario sistema Golden Braid, para clonación mediante <i>Gateway</i> . Contiene el promotor completo 5' y 3' de TFL1.	

2.3.2. Construcciones plasmídicas utilizadas

En este trabajo se utilizaron las construcciones detalladas en la tabla MM_7.

Tabla MM_7. Construcciones empleadas en este trabajo

NOMBRE	CÓDIGO	PROPÓSITO	INSERTO	ORIGEN
Vectores tipo Entry				
pDONR221-bZIP30		Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP30</i>	Genoteca <i>Regulators</i>
pENTR/SD/D-TOPO-bZIP52.1		Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP52.1</i>	Kayoko <i>et al.</i> 2003
pDONR201-bZIP52.2		Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP52.2</i>	Genoteca Regia
pCR8/GW/TOPO-bZIP30	PMS01	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento genómico del gen <i>bZIP30</i> desde ATG a STOP (sin STOP) amplificado mediante PCR con los oligos MSOL09 (directo) y MSOL10 (Reverso). El oligo reverso añade la cola SDRX.	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO-bZIP52.1	PMS02	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento genómico del gen <i>bZIP52.1</i> desde ATG a STOP (sin STOP) amplificado mediante PCR con los oligos MSOL11 (directo) y MSOL12 (Reverso). El oligo reverso añade la cola SRDX.	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO-bZIP52.2	PMS03	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología Gateway.	Fragmento genómico del gen <i>bZIP52.2</i> desde ATG a STOP (sin STOP) amplificado mediante PCR con los oligos MSOL11 (Directo) y MSOL13 (Reverso) El oligo reverso añade la cola SRDX	Este trabajo

pCR8/GW/TOPO- pbZIP30	PMS04	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	Fragmento genómico del gen <i>bZIP30</i> desde 0,5Kb de 5'NCS a STOP (Sin STOP). Amplificado mediante PCR con los oligos MSOL14 (Directo) y MSOL15 (Reverso)	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- pbZIP52.1	PMS05	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	Fragmento genómico del gen <i>bZIP52.1</i> desde 1,7Kb de 5'NCS a STOP (Sin STOP). Amplificado mediante PCR con los oligos MSOL16 (Directo) y MSOL17 (Reverso)	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- pbZIP52.2	PMS06	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	Fragmento genómico del gen <i>bZIP52.2</i> desde 1,7Kb de 5'NCS a STOP (Sin STOP). Amplificado mediante PCR con los oligos MSOL16 (Directo) y MSOL18 (Reverso)	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- FT	PMS07	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP del gen <i>FT</i>	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- bZIP18	PMS38	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP18</i>	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- bZIP29	PMS39	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP29</i>	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- bZIP69	PMS40	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP del gen <i>bZIP69</i>	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO- pbZIP69- bZIP69(+3'UTR) F1 8Kb	PMS49	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	Fragmento genómico del gen <i>bZIP69</i> desde -6Kb antes ATG a fin 3'UTR, amplificado mediante PCR con los oligos MSOI (directo) y MSOI (Reverso).	Este trabajo

pCR8/GW/TOPO-GFP	PMS73	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP de la proteína GFP obtenida mediante amplificación con los oligos ABT15 directo y ABT16 reverso	Este trabajo
pCR8/GW/TOPO-GFP-TFL1	PMS72	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i> .	cDNA de ATG a STOP de la proteína de fusión GFP-TFL1 obtenida mediante amplificación con los oligos ABT15 directo y ASMOL103 reverso	Este trabajo
pDONR201-FDactive	PMS71	Plásmido intermediario para recombinación mediante tecnología <i>Gateway</i>	FD nativo, de ATG a STOP	R.Immink
BiFC				
pYFN43-bZIP30	pYFN43-bZIP30	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP30 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido pDONR221-bZIP30 con el vector pYFN43.	Méndez, C. 2013
pYFN43-bZIP52.1	pYFN43-bZIP52.1	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP52.1 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido pENTR/SD/D-TOPO-bZIP52.1 con el vector pYFN43.	Méndez, C., 2013
pYFN43-bZIP52.2	pYFN43-bZIP52.2	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP52.1 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido pDONR201-bZIP52.2 con el vector pYFN43.	Méndez, C., 2013
pYFC43-TFL1	pYFC43-TFL1	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(C')YFP-TFL1 Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO2-TFL1 con el vector pYFN43.	Méndez, C., 2013.
pYFC43-FT	PMS08	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-	(C')YFP-FT Obtenido mediante recombinación	Este trabajo

		terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	<i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-FT con el vector pYFN43.		
pYFC43-bZIP30	PMS18	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(C')YFP-bZIP30 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP30 con el vector pYFN43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFN43-bZIP29	PMS41	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP29 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP29 con el vector pYFN43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFC43-bZIP29	PMS42	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(C')YFP-bZIP29 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP29 con el vector pYFC43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFN43-bZIP18	PMS43	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP18 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP18 con el vector pYFN43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFC43-bZIP18	PMS44	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(C')YFP-bZIP18 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP18 con el vector pYFC43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFN43-bZIP69	PMS45	Generación de construcciones de fusión al fragmento N-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(N')YFP-bZIP69 <i>Gateway</i> del plásmido pCR8/GW/TOPO-bZIP69 con el vector pYFN43.	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo
pYFC43-bZIP69	PMS46	Generación de construcciones de fusión al fragmento C-terminal de la proteína YFP para ensayo de BiFC	(C')YFP-bZIP69 <i>Gateway</i> del plásmido	Obtenido mediante recombinação	Este trabajo

pCR8/GW/TOPO-bZIP69 con el vector pYFC43.

GUS

pMDC163-bZIP30	PMS09	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GUS</i>	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS04 y el vector pMDC163	Este trabajo
pMDC163-bZIP52.1	PMS10	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GUS</i>	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS05 y el vector pMDC163	Este trabajo
pMDC163-bZIP52.2	PMS11	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GUS</i>	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS06 y el vector pMDC163	Este trabajo

SRDX

pMDC32-bZIP30	PMS12	Generación de construcciones del tipo 35S::bZIP-SRDX para la obtención de líneas transgénicas dominantes negativas	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS01 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP52.1	PMS13	Generación de construcciones del tipo 35S::bZIP-SRDX para la obtención de líneas transgénicas dominantes negativas	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS02 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP52.2	PMS14	Generación de construcciones del tipo 35S::bZIP-SRDX para la obtención de líneas transgénicas dominantes negativas	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMS03 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP59	PMT4	Generación de construcciones del tipo 35S::bZIP-SRDX para la obtención de líneas transgénicas dominantes negativas	Obtenido mediante recombinação entre el plásmido PMT02 y el vector pMDC32	Max Torrellas

pMDC32-bZIP30	PMS19	Generación de construcciones del tipo 35S-bZIP, para la obtención de líneas de transgénicas sobreexpresoras.	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pDONR221-bZIP30 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP52.1	PMS20	Generación de construcciones del tipo 35S-bZIP, para la obtención de líneas de transgénicas sobreexpresoras.	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pENTR/SD/D-TOPO-bZIP52.1 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP52.2	PMS21	Generación de construcciones del tipo 35S-bZIP, para la obtención de líneas de transgénicas sobreexpresoras.	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pDONR201-bZIP52.2 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP69	PMS47	Generación de construcciones del tipo 35S-bZIP, para la obtención de líneas de transgénicas sobreexpresoras.	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8-TOPO-bZIP69 y el vector pMDC32	Este trabajo
pMDC32-bZIP59	PMT05	Generación de construcciones del tipo 35S-bZIP, para la obtención de líneas de transgénicas sobreexpresoras.	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8-TOPO-bZIP59 y el vector pMDC32	Max Torrellas, 2015
GR-TFL1				
pGreene0229-TFL1		Generación de versiones activables por Dexametasona del gen <i>TFL1</i>	Obtenido mediante recombinação clásica del gen <i>TFL1-GR</i> en el vector pGreen0229	Méndez, C. 2013
SONDAS "In situ"				
pGEM-T Easy-ISH_bZIP30 Sonda 1	PMS32	Sonda diseñada en la región 5'UTR de <i>bZIP30</i> para ensayo de hibridación " <i>in situ</i> "	Fragmento obtenido mediante PCR con los oligos MSOL 95 y MSOL 56	Este trabajo
pGEM-T Easy-ISH_bZIP30 Sonda 2	PMS33	Sonda diseñada en la región 3'UTR de <i>bZIP30</i> para ensayo de hibridación " <i>in situ</i> "	Fragmento obtenido mediante PCR con los oligos MSOL 57 y MSOL 58	Este trabajo

pGEM-T Easy-ISH_bZIP52 Sonda 1	PMS34	Sonda diseñada en la región 5'UTR de <i>bZIP52</i> para ensayo de hibridación " <i>in situ</i> "	Fragmento obtenido mediante PCR con los oligos MSOL 96 y MSOL 97	Este trabajo
pGEM-T Easy-ISH_bZIP52 Sonda 2	PMS35	Sonda diseñada en la región 3'UTR de <i>bZIP52</i> para ensayo de hibridación " <i>in situ</i> "	Fragmento obtenido mediante PCR con los oligos MSOL 53 y MSOL 54	Este trabajo
Complementación mutante <i>bzip69</i> (SAIL_1211H04)				
pMDC99::pbZIP6 9-bZIP69(+3'UTR) F1 8Kb	PMS52	Fragmento genómico para la complementación de la línea mutante del gen <i>bzip69</i> SAIL1211H04	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8-GW/TOPO-pbZIP69-bZIP69 (3'UTR) F1 8Kb y el vector pMDC99	Este trabajo
CRISPR				
pYB196_sgRNA1_bZIP52	PMS58	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP52</i>	Obtenido mediante clonaje "clásico" utilizando los sitios <i>SpeI</i> a partir del plásmido PMS56	Este trabajo
pYB196_sgRNA1_bZIP69	PMS59	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP69</i>	Obtenido mediante clonaje "clásico" utilizando los sitios <i>SpeI</i> a partir del plásmido PMS57	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA 9+19(<i>bzip69</i>)	PMS60	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP69</i>	Obtenido mediante clonaje <i>Golden Gate</i> siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015 <i>Genome Biology</i>	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA 17+19(<i>bzip69</i>)	PMS61	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP69</i>	Obtenido mediante clonaje <i>Golden Gate</i> siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015 <i>Genome Biology</i>	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA 6+47(<i>bzip52</i>)	PMS62	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP52</i>	Obtenido mediante clonaje <i>Golden Gate</i> siguiendo el protocolo descrito por Wang <i>et al.</i> 2015 <i>Genome Biology</i>	Este trabajo
pHEE401e_sgRNA 11+37(<i>bzip52</i>)	PMS63	Obtención de líneas <i>Knock-Out</i> mediante tecnología CRISPR para el gen <i>bZIP52</i>	Obtenido mediante clonaje <i>Golden Gate</i> siguiendo el	Este trabajo

protocolo descrito por Wang <i>et al. 2015 Genome Biology</i>					
Y2H y Y3H					
pDEST32_FD	pDEST32_FD	Realización de ensayos de doble híbrido en levadura (presa)	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>	R.Immink	
pDEST22_FD	pDEST22_FD	Realización de ensayos de doble híbrido en levadura (cebo)	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>	R.Immink	
pDEST32_TFL1	pDEST32_TFL1	Realización de ensayos de doble híbrido en levadura (presa)	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>	R.Immink	
pDEST22_TFL1	pDEST22_TFL1	Realización de ensayos de doble híbrido en levadura (cebo)	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>	R.Immink	
pTFT1_FD	PMS71	Realización de ensayos de triple híbrido en levadura (puente)	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>		Este trabajo
pDONR201_Factive	PMS69	Plásmido entrada para recombinación mediante sistema <i>Gateway</i> LR	Obtenido mediante recombinación BP, de la FD de ATG a STOP.		Este trabajo
pTFT1_FDactive	PMS70	Realización de ensayos de triple híbrido en levadura (puente)	Obtenido mediante recombinación LR entre el vector vacío pTFT1 y pDONR201_FDactive		Este trabajo
GFP					
pMDC43-bZIP30	PMS64	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pDONR221-bZIP30 y el vector pMDC43		Este trabajo
pMDC43-bZIP52.1	PMS65	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i> entre el plásmido pENTR/SD/D-TOPO-bZIP52.1 y el vector pMDC43		Este trabajo
pMDC43-bZIP52.2	PMS66	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinación <i>Gateway</i>		Este trabajo

			entre el plásmido pDONR201-bZIP52.2 y el vector pMDC43		
pMDC43-bZIP69	PMS67	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8-TOPO-bZIP69 y el vector pMDC43	Este trabajo	
pMDC43-bZIP59	PMS68	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido pCR8-TOPO-bZIP59 y el vector pMDC43	Este trabajo	
Ω2-pTFL1:GFP-TFL1	PMS74	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido PMS72 y el vector Ω 2-pTFL1	Este trabajo	
Ω2-pTFL1:GFP	PMS75	Generación de construcciones de fusión al gen <i>GFP</i>	Obtenido mediante recombinação <i>Gateway</i> entre el plásmido PMS73 y el vector Ω 2-pTFL1	Este trabajo	

2.3.3. Obtención de construcciones

Para la obtención las diferentes construcciones utilizadas es este trabajo se han utilizado los sistemas de clonación comerciales , *Gateway* (Thermo) y pGEM-T (Promega), siguiendo en ambos casos las recomendaciones del fabricante, además de los sistemas de clonación *Golden Gate*, siguiendo el protocolo descrito por Engler and Marillonnet, 2014, y *Golden Braid* siguiendo el protocolo descrito en Sarrion-Perdigones *et al.*, 2013.

2.4. Secuenciación

2.4.1. Secuenciación Sanger

La secuenciación de fragmentos de DNA amplificados mediante PCR, para su posterior clonaje, se realizó en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Valencia) con la ayuda del Secuenciador capilar “ABI 3130 XL” (Applied).

2.4.2. Secuenciación masiva

Para los análisis de expresión mediante técnicas de secuenciación masiva, se extrajo el RNA de un mínimo de 3 réplicas biológicas por condición, siguiendo el protocolo descrito en el

apartado 2.1.5. La calidad e integridad del RNA resultante se determinó en un sistema *BioAnalyzer* (Agilent). Para la construcción de las librerías para la secuenciación se empleó el sistema “*TruSeq Library Prep Kit*” (Illumina), partiendo en todos los casos de un microgramo de RNA por muestra. Finalmente, la calidad de las librerías se determinó mediante análisis con el sistema *Qubit*, y *BioAnalyzer*. La secuenciación de las librerías producidas se realizó en una plataforma “*HiSeq3000*” (Illumina) en el Servicio de Genómica del SCIE de la Universitat de València.

2.5. Generación de organismos transgénicos

2.5.1 Transformación de bacterias

La transformación de bacterias se realizó mediante electroporación, con un aparato “*GenePulserTM*” (Bio-Rad), siguiendo las recomendaciones del fabricante, utilizando para ello células de *E.coli* o *Agobacterium* electrocompetentes, obtenidas mediante el protocolo descrito en “*Pulse controller, operation instructions and applications guide, accessory for bacterial and fungal electro-transformation*” (Bio-Rad Laboratories, 1992), en el caso de *E. coli*, y según Wen-Jun y Forde (1989), en el caso de *A. tumefaciens*. Para *E.coli* se aplicó un pulso eléctrico de 200 Ω , 25 μ F, 1.8kV y para *A.tumefaciens* de 400 Ω , 25 μ F, 1.8kV.

2.5.2. Transformación de levaduras

La transformación de células de levadura *S.cerevisiae* se llevó a cabo mediante dos protocolos distintos, según el diseño específico de cada experimento. Así, por un lado se empleó la transformación basada en la incubación con acetato de litio a pequeña o gran escala, siguiendo el protocolo descrito por de Folter and Immink, en Luan and Perry (2011, pág. 145-165), para la transformación de las levaduras con los plásmidos cebo y presa y para la realización de los rastreos frente a las genotecas de cDNA. Por otro lado, se empleó la conjugación (*mating*), descrito por de Folter and Immink, en luan y Perry (2011, pag.145-165) para llevar a cabo los rastreos frente a las genotecas de factores de transcripción.

2.5.3. Transformación de Arabidopsis

La transformación de *A.thaliana* con las diferentes construcciones generadas en este trabajo (Tabla MM_7) se realizó según el protocolo de agroinfiltración descrito por Clough y Bent (1998). La selección de las semillas transformadas se realizó mediante cultivo in vitro en cajas con medio de cultivo sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente según la construcción, excepto en el caso de las construcciones generadas en el vector Ω :pTFL1, en cuyo caso las semillas transformantes se seleccionaron por su capacidad para emitir fluorescencia.

2.5.4. Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*

La agroinfiltración en hojas de *N. benthamiana* fue empleada para la expresión transitoria de proteínas para los ensayos de Complementación Bimolecular de la fluorescencia (BiFC), así como para el análisis de la localización subcelular de proteínas. Para ello, se infiltraron hojas jóvenes de *N.benthamiana* con suspensiones de distintas cepas de *A.tumefaciens* transformados con las construcciones que se detallan en la Tabla MM_7, siguiendo el protocolo descrito por Belda-Palazón *et al.* (2012).

2.6. Hibridación *in situ* de tejidos vegetales

Para la hibridación *in situ* se utilizó material vegetal previamente fijado e incluido en parafina, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.6

2.6.1. Generación de sondas marcadas con digoxigenina para la hibridación *in situ*

La obtención de sondas marcadas para la hibridación *in situ* de tejidos vegetales se realizó siguiendo el protocolo descrito por Coen *et al.* (1990) y Bradley *et al.* (1993). Para ello se partió de los plásmidos descritos en la tabla MM_7: PMS32, PMS33, PMS34, PMS35 PMS36 y PMS37, que contenían fragmentos de cDNA del gen cuya expresión se quería detectar. Dichos plásmidos se linealizaron utilizando el enzima de restricción apropiado en cada caso, para dejar un extremo 5' protuberante, y se utilizaron como molde para la transcripción *in vitro* de las sondas monocatenarias, utilizando las RNA polimerasas T7, y SP6 (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se transcribió la sonda "antisentido", así como una sonda "sentido" que se usará como control.

2.6.2 Cuantificación de las sondas de RNA

Para determinar la cantidad de sonda con la que hibridar el tejido en primer lugar se procedió a cuantificar la cantidad de sonda obtenida tras la transcripción. Para ello se precipitaron las sondas con una mezcla de tRNA de levadura 1µg/ml (Roche), acetato amónico 0.6M y etanol absoluto, que se centrifugó a 4°C, 13000rpm durante 15 minutos. A continuación, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar al aire para finalmente resuspender la sonda precipitada en 10µl de agua libre de RNasas. Para la cuantificación se tomó 1µl de cada sonda a partir del cual se prepararon diluciones 1/20, 1/250, 1/1000 y 1/2500. A continuación, se aplicó 1µl de cada una de las diluciones sobre una membrana de nylon *Hybond-XL* (Amersham), y se fijó la sonda a la membrana utilizando un horno de luz UV. Para el revelado, en primer lugar, se incubó la membrana con las sondas en TBS 1X [50 mM Tris-Cl, pH 7.5] durante 2 minutos, a continuación, el TBS 1X se sustituyó por una solución de TBS 1X, *Blocking Reagent* 0.5% (p/v) (Roche) y se incubó durante 10 minutos. Seguidamente, se introdujo la

membrana en una solución de anticuerpo anti-DIG-ab 1/3000 (Roche) en TBS 1X y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, se realizó un lavado con tampón de detección: Tris 1M, NaCl 1M, MgCl₂ 0.5M sin sustrato, y finalmente se incubó en tampón de detección con sustrato: BCIP, *Nitro Blue Tetrazolium*NBT (Roche) hasta que la señal fue visible.

Los 9 µl de sonda restantes se diluyeron con 91 µl de solución de hibridación: SSC 6X, SDS 3%, formamida 50%, tRNA 100µg/mL y se almacenaron a -20°C hasta su utilización

2.6.3. Prehibridación, hibridación e inmunodetección de la sonda

Para los procesos de desparafinado, prehibridación, hibridación y posterior revelado de las sondas se siguió el protocolo descrito por C. Ferrandiz y A. Sessions en Weigel y Glazebrook, (2002, pág. 195-203). La temperatura de hibridación empleada para las sondas de bZIP30 y bZIP52 fue de 53°C. En ambos casos se hibridó el tejido con la sonda antisentido para la detección del mRNA de cada uno de los genes, y con sondas sentido a modo de control negativo.

2.7. Inmunoprecipitación de cromatina

La identificación de las regiones génicas a las que se encontraba unida la proteína TFL1 se llevó a cabo mediante Inmunoprecipitación de cromatina sobre la línea activable 35S:TFL1-GR. Las plantas que expresaban la construcción 35S:TFL1-GR (*tfl1-1*) se cultivaron durante 3 semanas en condiciones de fotoperiodo de día corto, momento en que se transfirieron a día largo. Tras 5 días en día largo, las plantas se trataron con 1 gota de Dexametasona 30µM, o Mock directamente sobre el ápice del tallo, y los ápices se recolectaron 24h tras el tratamiento, ZT +2h. Para la fijación del tejido, para cada réplica biológica se recolectaron 50mg de tejido que se sumergieron en una solución de formaldehído 1%, EGS (etilen glicol bis-succinimidil succinato) 0.2µM, a temperatura ambiente y se aplicaron 3 pulsos de vacío de 9 minutos con un descanso entre ellos de 1 minuto. Transcurridos 30 minutos se paró la reacción de fijación mediante la adición de glicina hasta alcanzar una concentración final de 0.1M, y se incubó durante 2 minutos. A continuación, se lavaron los ápices tres veces en tampón MC [Fosfato de sodio pH7 10mM, NaCl 50mM, Sacarosa 100mM], seguidamente se molieron en nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino con la ayuda de un mortero. El polvo obtenido se resuspendió en 50mL de tampón M1 [Fosfato de sodio pH7, 8.85mM, NaCl 88.5mM, β-Mercaptoetanol 8.85mM, 1 tableta de *Complete protease inhibitor* (Sigma), Hexilen Glycol 11.6%], la suspensión obtenida se filtró en un embudo de muselina, y se centrifugó a 1000g, 4°C, durante 20 minutos, para eliminar los restos celulares. A continuación el pellet obtenido se lavó cinco veces en tampón M2 [Fosfato de sodio pH7, 9.5mM, NaCl 99.5mM, β-Mercaptoethanol 9.5mM, 1 tableta de *Complete protease inhibitor* (Sigma) y Triton-X-100 0.5%

(v/v)] y una vez en tampón M3 [Fosfato de sodio pH7, 10mM, NaCl 100mM, β -Mercaptoetanol 9.5mM, 1 tableta de *Complete protease inhibitor* (Sigma)]. El pellet que contenía los núcleos celulares íntegros se resuspendió en tampón de sonicación [Fosfato de sodio pH7, 10mM, NaCl 100mM, Sarkosyl 0.5%(v/v) EDTA 10mM, *Complete protease inhibitor* (Sigma), PEFA 1mM]. Seguidamente, la cromatina se fragmentó en tubos *MilliTubes* (Covaris), utilizando un sistema *Covaris E220 focused ultrasonicator* (Covaris), utilizando los siguientes parámetros: Potencia pico 200W, duty factor 20% and 200 Cycles/burst, 2 minutos a 4°C. Una vez sonicada la solución obtenida se centrifugó a temperatura ambiente a 18400g, durante 5 minutos, para eliminar los posibles contaminantes. El sobrenadante obtenido tras la sonicación se dividió en dos porciones, la primera se utilizó como control "Input", para la reacción de PCR, con la segunda se preparó una dilución 1:2 en tampón IP [Hepes 50mM, KCl 150mM, MgCl₂ 5mM, ZnSO₄ 10 μ M, Triton-X-100 1% (v/v), SDS 0.05% (v/v)]. Los complejos de histonas se precipitaron utilizando un anticuerpo anti-GR comercial (AB3580, AbCam) durante toda la noche a 4°C. Seguidamente, los complejos DNA-Histona se purificaron mediante la incubación de la solución Cromatina-Anticuerpo con 40 μ l de *protein-Agarose beads* (Santa Cruz Biotechnology sc2001). Tras 3 lavados, los inmunocomplejos se separaron de las bolas utilizando tampón glicina ácida [Glicina 100mM, NaCl 500mM, Tween-20 0.05% (v/v)]. Finalmente, las muestras se trataron con 1.5 μ l de Proteinasa K, 45U/mL (Roche) durante toda la noche, y se purificaron utilizando el MiniElute kit (Qiagen), utilizando el protocolo descrito por el fabricante, modificando el volumen de tampón de elución empleado a 35 μ l. El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos tras la inmunoprecipitación se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando para ello los cebadores descritos en la tabla S1.

2.8. Co-Inmunoprecipitación de complejos proteicos

La inmunoprecipitación de complejos proteicos se empleó para tratar de identificar proteínas que forman complejos con TFL1 *in vivo*, utilizando para ello la línea transgénica pTFL1:GFP-TFL1 (*ap1cal*, 35S:AP1-GR), y como control negativo la línea pTFL1:GFP (*ap1cal*, 35S:AP1-GR). Para llevar a cabo el aislamiento de los complejos proteicos, así como para la inmunoprecipitación y digestión con tripsina se siguió el protocolo descrito por Jamje *et al.* (2018). Para ello las plantas *ap1cal* que expresaban la construcción pTFL1:GFP-TFL1 se cultivaron durante 6 semanas en condiciones de fotoperiodo de día largo. Las inflorescencias producidas se recolectaron en nitrógeno líquido hasta obtener 1g de tejido por cada réplica biológica. Las muestras recolectadas se molieron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino con la ayuda de un mortero.

Para la precipitación de los complejos proteicos se empleó 50µl del kit comercial *antiGFP microbeads* (µMACS) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los complejos proteicos aislados y digeridos con tripsina se analizaron mediante espectrometría de masas (LC, MS/MS) en el servicio de metabolómica del Wageningen University and Research, (Wageningen, Holanda).

3. Análisis fenotípico de las plantas mutantes y líneas transgénicas

3.1. Fotografía a bajo aumento

Para documentar los fenotipos hallados en las diferentes líneas transgénicas y/o mutantes se empleó, entre otros métodos, la fotografía a bajo aumento, utilizando una cámara Leica V-LUX1. Para la obtención de imágenes a mayor aumento se empleó un microscopio (Leica DMS1000) con base de iluminación diascópica (BF, RC y DF) y una Lupa binocular (Olympus SZ60) con la ayuda del Software de análisis de imagen *Leica Application Suite* (Leica).

3.2. Técnicas microscópicas

3.2.1. Microscopia óptica

Para análisis de muestras vegetales mediante técnicas de microscopía óptica, las muestras se procesaron y montaron en portaobjetos de vidrio y se visualizaron con la ayuda de un microscopio Leica DM5000 utilizando iluminación de contraste diferencial (DIC), de campo oscuro, o epi-fluorescencia con filtro GFP y Rodamina según el tipo de muestra a visualizar.

3.2.2. Microscopia confocal

El análisis de muestras por microscopía confocal se realizó en el Servicio de Microscopía del IBMCP (Valencia). Se utilizó para ello un Microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) con 7 líneas de láser (405, 458, 488, 514,561, 594 y 633) acoplado a un microscopio óptico invertido con contraste de fases (Nikon Diaphot-TMD). Para su observación al microscopio confocal, las muestras vegetales frescas, como hojas de *N.benthamiana*, o fragmentos de raíz de *Arabidopsis*, se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se cubrieron con un cubreobjetos, usando como medio de montaje y de inclusión agua destilada. Para la observación de meristemas de *Arabidopsis* éstos se sumergieron en una capa de agarosa de bajo punto de fusión sobre cajas Petri de 35 x 10mm dejando el meristemo cerca del borde del medio. Las imágenes tomadas se montaron y analizaron con la ayuda de los softwares ZEN (Zeiss) e Fiji <https://fiji.sc/>

3.2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de muestras vegetales por SEM se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía electrónica de la UPV, siguiendo el protocolo descrito por Fourquin *et al.* (2013). Para su fijación, las muestras se sumergieron en FAE [etanol 50%, formaldehído 3.7% (v/v), ácido acético glacial 5%], y se sometieron a 3 pulsos de vacío de 5 minutos, y se incubaron toda la noche en FAE fresco a temperatura ambiente. Una vez fijado se procedió a deshidratar el tejido mediante lavados con etanol a concentraciones crecientes hasta llegar a etanol absoluto. Una vez deshidratadas, las muestras se sometieron a punto crítico en un sistema Polaron E300. Seguidamente, las muestras se montaron sobre tiras de carbono activado y se sombrearon con partículas de oro-paladio. Las imágenes se obtuvieron mediante el programa Autobeam de la plataforma ISIS (Oxford Instruments), con una velocidad de barrido de 200s por imagen, en un microscopio electrónico JEOL, modelo JSM-5410, operando bajo condiciones de microanálisis de entre 10-15kV y una distancia de trabajo de 25mm.

3.3. Análisis de la respuesta a estrés biótico

Para determinar la existencia de posibles fenotipos relacionados con la respuesta a estrés biótico se cultivaron las plantas durante 10 días en condiciones de día corto, según se describe en el apartado 1.1.3. La infección con *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000(Pto) y la posterior recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) llevó a cabo según se describe en Tornero y Dangl (2001).

3.4. Análisis de la respuesta a ácido jasmónico

Para la determinación de los fenotipos asociados a la respuesta a ácido jasmónico y ácido salicílico las plantas se cultivaron *in vitro* en medio de Johnson (Johnson *et al.*, 1957) suplementado con KH_2PO_4 , y 50 μM de MeJA (Duchefa). La longitud de las raíces se determinó mediante fotografía a bajo aumento y posterior análisis con el software de análisis de imagen ImageJ.

3.5. Análisis del tamaño de semillas

Para analizar el tamaño de las semillas, las plantas se cultivaron en condiciones de día largo hasta la aparición de frutos amarillos. Se recolectaron 5 frutos del ápice principal de cada planta descartando las posiciones 1 a 3, y recogiendo siempre frutos sucesivos completamente elongados. Una vez recolectados los frutos, se separaron las semillas del resto de tejidos del fruto y se secaron durante 5 días a 37°C en tubos de microcentrífuga recubiertos con cinta *Micropore™ Surgical Tape* (3M). Las semillas secas se fotografiaron utilizando una Lupa binocular (Olympus SZ60) y el tamaño de las semillas se determinó con la ayuda del software de análisis de imagen ImageJ.

4. Tratamiento con Dexametasona

Para inducir la translocación de la proteína TFL1 al núcleo, las plantas 35S:TFL1-GR fueron tratadas con Dexametasona tras su paso a día largo con una solución de Dexametasona 30 μ M, etanol 0.03% (v/v), y Silwett L-77 0.01%, aplicando una única gota directamente sobre el ápice del tallo, con la ayuda de un cuentagotas.

5. Técnicas de histología vegetal

5.1. Fijación e inclusión de muestras vegetales en parafina

Para su inclusión en parafina, las muestras vegetales se sumergieron en solución fijadora FAE [etanol 50%, formaldehído 3.7% (v/v), ácido acético glacial 5%]; para ayudar a la penetración del fijador se aplicaron 3 pulsos de vacío de 5 minutos cada uno. A continuación, se sustituyó el FAE por solución fresca y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las muestras se lavaron varias veces con etanol 70%. La tinción con eosina y posterior inclusión en parafina de las muestras se llevó a cabo en el servicio de microscopía del IBMCP utilizando un Procesador automático de tejidos (Leica TP 1020). Finalmente, se montaron bloques de parafina para la obtención de cortes histológicos, utilizando para ello una estación de inclusión Leica EG1150H.

5.2. Obtención de cortes histológicos

Para la obtención de cortes histológicos se empleó un microtomo Leica RM-2025, con el que se obtuvieron secciones de 8 μ M de grosor, estas secciones se recogieron sobre portaobjetos de adhesión de polisina *Polysina adhesion slides* (Thermo) cubiertos con una capa de agua MilliQ para extender los cortes. Finalmente, el agua se retiró con cuidado con la ayuda de un papel y los portaobjetos con las secciones se dejaron secar sobre una placa calefactora a 40°C toda la noche.

5.3. Análisis de la actividad β -glucuronidasa (GUS)

Para el análisis de la actividad β -glucuronidasa en líneas reporteras de fusión al gen *GUS*, se sumergieron las muestras en una solución fijadora de acetona 90% (v/v) y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Para su revelado, las muestras se sumergieron durante toda la noche en solución de revelado (tampón fosfato sódico 50mM, Ferrocianuro de potasio 10mM, Ferricianuro de potasio 10mM, Triton-X-100 0.2% (v/v), X-Gluc 1mM), para facilitar su penetración se aplicó un pulso de vacío de 5 minutos. Al día siguiente, las muestras se sometieron a lavados (cada uno, de 30 minutos, temperatura ambiente) con concentraciones crecientes de etanol (v/v): al 20%, 30%, 50%, FAE (etanol absoluto 50% (v/v), ácido acético glacial 10%(v/v), formaldehído 5% (v/v)) y etanol 70%. Finalmente, se procedió a la observación de las

muestras, directamente o tras el aclarado del tejido con hidrato de cloral, para lo que se siguió el protocolo de S. Christensen en Weigel y Glazebrook (2002)

6. Análisis de las interacciones proteína-proteína

La identificación de las proteínas que forman complejos con TFL1 se llevó a cabo utilizando dos aproximaciones experimentales diferentes, los rastreos de doble y triple híbrido en levadura, y el ensayo de complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC)

6.1. Rastreo de doble y triple híbrido en levadura

Los rastreos de doble y triple híbrido en levadura se llevaron a cabo siguiendo diferentes protocolos distintos en función de la naturaleza de la librería a utilizar, librería de cDNAs o genoteca de factores de transcripción.

6.1.2. Rastreo frente a una genoteca de cDNA de Arabidopsis

Para los rastreos frente a una genoteca de cDNA se transformó la levadura que contenía el plásmido cebo (BD), o la combinación de plásmido cebo (BD) y plásmido puente (pTFT), en el caso de los ensayos de triple híbrido, con 10 μ L de la genoteca de expresión de cDNA de inflorescencia (1 μ g/ μ L), utilizando para ello el protocolo de transformación basado en la incubación con acetato de litio a gran escala descrito en el apartado 2.4.2. La selección de las colonias positivas se realizó mediante crecimiento en medio selectivo SD -Leu/-Trp/-His + 3AT 1mM, durante 5-7 días a 20°C. Para descartar la aparición de falsos positivos las colonias positivas se crecieron de nuevo en medio selectivo SD -Leu/-Trp/-His suplementado con concentraciones crecientes de 3AT (1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 30mM, 40mM y 50mM) así como en medio selectivo SD -Leu/-Trp/-His/-Ade, descartando todas aquellas colonias que no mostraron crecimiento en al menos 3 de las placas. Finalmente, cDNAs de Arabidopsis presentes en los plásmidos presa se purificaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1.3 y se analizaron mediante PCR con cebadores específicos (Tabla S1).

6.1.3. Rastreos frente a una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis

Para los rastreos de doble y triple híbrido frente a una genoteca de factores de transcripción se partió de una colección de placas con colonias frescas de levadura PJ69-4A transformada con la colección de plásmidos presa (AD). Para llevar a cabo este ensayo en primer lugar se creció toda la noche un cultivo de 100mL de la levadura PJ69-4 α transformada con el plásmido cebo (BD) en medio selectivo SD -Leu, a 28°C, con agitación de 300rpm. Este cultivo se repartió en placas con SD suplementado con todos los aminoácidos formando gotas de 5 μ L. Las colonias de la cepa PJ69-4A (AD) que contenían la librería de factores de transcripción se

resuspendieron en 50µL de agua Milli-Q estéril, 5µL de las colonias resuspendidas se depositaron sobre las gotas de levadura PJ69-4α (BD), y las placas se incubaron toda la noche a 30°C. Para obtener levaduras diploides, una vez crecidas las placas, se transfirió con la ayuda de un replicador un poco de la mezcla de levaduras PJ69-4α y PJ69-4A a una nueva placa con medio selectivo para ambos vectores, cebo y presa, SD -Leu/-Trp, y se incubó 3 días a 28°C. Para probar los eventos de interacción proteína-proteína las levaduras diploides se resuspendieron en 50µL de agua estéril y se transfirieron formando gotas de 5µL a placas con medio selectivo SD-Leu/-Trp/-His + 3AT 1mM dónde se incubaron durante 5-7 días a 20°C.

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

Para analizar la interacción entre dos proteínas *in planta* se utilizó el ensayo de BiFC. Para ello, se generaron las construcciones descritas en la tabla MM7 en las que fusionó la región codificante de cada uno de los genes de interés a una de las dos mitades de la proteína fluorescente amarilla (YFP), utilizando para ello los vectores *Gateway* pYFC43, y pYFN43. (Belda-Palazón *et al.*, 2012) (<http://www.ibmcp.upv.es/FerrandoLabVectors.php>). Estas construcciones se emplearon para transformar células de *A. tumefaciens*. Las diferentes combinaciones de *Agrobacterium* obtenidas se utilizaron para transformar transitoriamente hojas de *N.benthamiana*, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4.4. Para determinar si existía o no interacción entre las proteínas transcurridos 3 días tras la infiltración las hojas transformadas se observaron al microscopio confocal.

7. Análisis bioinformáticos

7.1. Análisis de datos de secuenciación masiva

Tras la inspección de los datos con FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), las secuencias brutas se recortaron en base a su calidad, y se procedió a eliminar los adaptadores utilizando *cutadapt* (<https://cutadapt.readthedocs.io>) (Martin, 2011). Una vez limpias, las lecturas se mapearon frente al transcriptoma de Arabidopsis TAIR10 (Lamesch *et al.*, 2012) utilizando bowtie2 ([bowtie2](http://bowtie2.bio.sourceforge.net/bowtie2)) (Langmead and Salzberg, 2012). Los análisis de expresión diferencial se llevaron a cabo utilizando EdgeR (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) (Robinson *et al.*, 2010).

7.2. Análisis de secuencias

Para el análisis de las secuencias provenientes de secuenciación Sanger, así como para el diseño de cebadores para PCR, o para el análisis de mapas de restricción se empleó *benchling* (<https://www.benchling.com/>).

8. Análisis estadísticos

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

RESULTADOS

CAPÍTULO 1: Estudio de la actividad de TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) como co-factor transcripcional e identificación de sus genes diana

TFL1 es un regulador clave de la transición floral y la arquitectura de la inflorescencia en *Arabidopsis*. Al igual que su homólogo FT, TFL1 pertenece a la familia de las PEBP (*Phosphatidil Ethanolamine Binding Proteins*) y por lo tanto, aunque controlan la expresión de genes de floración, las proteínas TFL1 y FT no son factores de transcripción (Wickland and Hanzawa, 2015). Hasta el momento, no se conoce con profundidad el mecanismo de acción de TFL1. Se ha propuesto que tanto TFL1 como FT actúan como reguladores transcripcionales formando un complejo con FD, un factor de transcripción de tipo bZIP, del grupo A (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005, Hanano and Goto, 2011). También, que el dímero TFL1-FD actúa como un complejo transcripcional que reprime la expresión de *AP1* y, en general, de los genes florales que son activados por el complejo FT-FD (Hanano y Goto, 2011). Sin embargo, aunque se trata de un modelo ampliamente aceptado, el hecho de que TFL1 o FT participen de manera directa en la regulación de la transcripción no ha sido todavía claramente demostrado, ya que hasta el momento no existen evidencias experimentales de que TFL1 actúe como regulador directo de la transcripción y se desconoce a qué genes regula.

1.1. Análisis de los genes que responden a la activación de TFL1, mediante RNA-Seq

Sabemos que, además de en el citoplasma, la proteína TFL1 se localiza y actúa en el núcleo (Conti and Bradley, 2007; Sohn et al., 2007; Hanano and Goto, 2011). Eso hace posible la generación de líneas transgénicas con una proteína TFL1 activable, mediante su fusión al dominio de unión de glucocorticoides GR (Picard, 1993; Lloyd et al., 1994; Aoyama et al., 1995). En condiciones normales, una proteína nuclear fusionada al dominio GR se mantiene inactiva, por ser retenida en el citoplasma, y se activa por tratamiento con la hormona dexametasona (En adelante Dexam), que permite su entrada en el núcleo (Kaufmann et al., 2010; Schiessl et al., 2012; Yamaguchi et al., 2015). De este modo, podemos generar plantas transgénicas que expresen una forma activable de TFL1 en un fondo mutante *tfl1*. En estas plantas, la proteína TFL1 queda retenida en el citoplasma por el dominio GR y es sólo tras la aplicación de dexametasona que es capaz de entrar al núcleo y activar o reprimir sus dianas transcripcionales. Finalmente, podemos identificar cuáles son las dianas de TFL1 estudiando el transcriptoma de plantas tratadas con dexametasona y comparándolo con el de plantas control tratadas con mock.

1.1.1. Identificación de una línea 35S:TFL1-GR inducible por dexametasona

Para llevar a cabo la identificación de los genes que responden a la activación de TFL1 partimos de plantas transgénicas generadas previamente en el laboratorio por la Dra. Carla Mendez, que expresaban una forma activable de TFL1, bajo el control del promotor 35S, en un fondo genético mutante *tfl1-1*. En estas líneas, las plantas a las que no se les ha aplicado tratamiento con dexametasona presentaban el fenotipo propio del mutante *tfl1-1*, floración temprana y desarrollo determinado (Shannon and Meeks-Wagner, 1991), mientras que las plantas a las que se les ha aplicado dexametasona en el ápice mostraban un fenotipo similar al de las plantas 35S:TFL1, floración tardía y crecimiento indeterminado. De entre todas las líneas obtenidas se seleccionaron 2 líneas homocigotas T4 independientes (35S:TFL1-GR *tfl1-1* #4.7 y 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9), que contenían una única copia del transgén y que habían mostrado, en los ensayos preliminares realizados con plantas T2, una buena respuesta a la dexametasona. Para analizar si la respuesta se producía de forma homogénea en todas las plantas T4, genéticamente idénticas, y descartar posibles problemas de silenciamiento, se sembraron 30 plantas de cada una de las dos líneas T4 seleccionadas y 30 plantas del parental silvestre Col-0, y se establecieron para cada genotipo 2 grupos, tratamiento y control. Las plantas se cultivaron durante 3 semanas en condiciones no inductivas de día corto y, transcurrido este tiempo, se transfirieron a día largo, momento en el que se inició el tratamiento con dexametasona. Cada uno de los grupos se trató con dexa o con mock, cada 72h, hasta la aparición del botón floral, consistiendo el tratamiento en la aplicación de 1 gota de una solución de dexametasona 30 μ M o de mock directamente sobre el ápice del tallo. El 100% de las plantas Col-0 hicieron el “bolting” (inicio de la elongación del tallo de la inflorescencia) independientemente de su tratamiento con dexametasona o mock, entre 14-15 días tras su paso a día largo (Fig. R1.1 B y C). Sin embargo, las plantas de las líneas 35S:TFL1-GR *tfl1-1*, #4.7 y #7.9, presentaron floración tardía, realizando el “bolting” más tarde que las plantas Col-0, cuando se les aplicó el tratamiento con dexametasona, y floración temprana, con un “bolting” más temprano que Col-0, cuando se les aplicó tratamiento con mock (Fig. R1.1 A-C). En cuanto a la uniformidad de la respuesta al tratamiento, la línea #7.9 mostró una respuesta homogénea, mientras que en la línea #4.7 una fracción de las plantas no respondió al tratamiento y florecieron de modo semejante al control (Fig. R1.1 B y C).

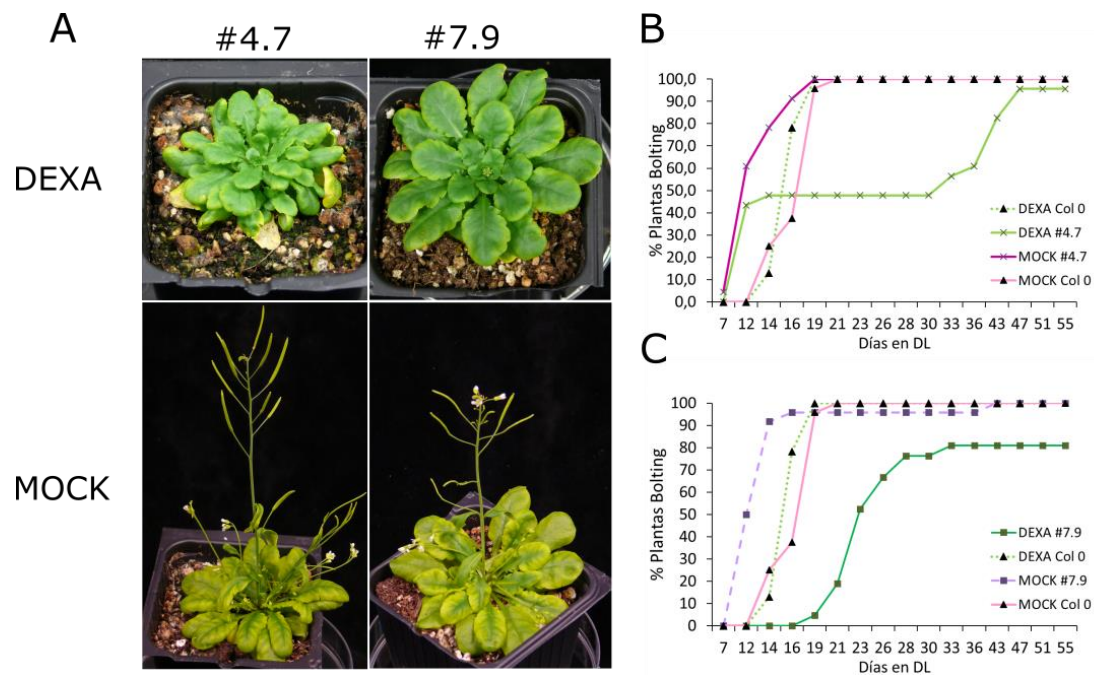


Figura R1.1. Respuesta a la dexametasona de las líneas 35S:TFL1-GR *tf1-1*. A) Plantas de dos líneas 35S:TFL1-GR *tf1-1* distintas, #4.7 y #7.9, tras 20 días en día largo. Las plantas tratadas con dexametasona siguen en fase vegetativa o iniciando la floración, mientras que las tratadas con mock han florecido y muestran el fenotipo de floración temprana e inflorescencia determinada característico del mutante *tf1-1*. B y C) Respuesta de esas 2 líneas 35S:TFL1-GR *tf1-1* al tratamiento repetido con dexametasona o mock cada 72h, tras su paso a día largo. Todas las plantas se cultivaron 3 semanas en día corto previamente a su paso a día largo.

A la vista de este resultado, y con el fin de evitar que la presencia de plantas que no responden al tratamiento con dexametasona enmascarase los resultados de los ensayos de transcriptómica, se decidió continuar trabajando sólo con la línea #7.9.

1.1.2. Puesta a punto de las condiciones para la identificación de genes regulados por TFL1 mediante RNA-Seq

En plantas de Col-0 cultivadas en condiciones de día largo el gen *TFL1* se expresa a un nivel bajo en el centro del meristemo apical del tallo durante toda la fase vegetativa, reprimiendo la floración, evitando la conversión precoz del meristemo apical en un meristemo inflorescente, y su expresión aumenta notablemente con la transición floral (Conti and Bradley, 2007; Serrano-Mislata et al., 2016). Por ello, consideramos que un buen momento para identificar genes diana de TFL1 es el inicio de la transición floral. Un primer paso para la optimización del tratamiento con dexametasona de la línea 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9 para el posterior análisis transcriptómico fue, por tanto, determinar cuándo se produce la transición floral. Para ello, analizamos la variación en la expresión de los genes de identidad de meristemo floral *LFY* y *AP1*, mediante RT-qPCR, en plantas de la línea 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9 que, tras ser cultivadas 3 semanas en día corto, se transfirieron a día largo, para inducir la floración. En esas condiciones de cultivo, la transición floral se inicia en pocos días, lo que va acompañado de una

subida en los niveles de expresión de *LFY* y *AP1*, que no se expresan en la fase vegetativa y que muestran su máximo de expresión cuando la transición floral ha tenido lugar (Simon et al., 1996; Blázquez et al., 1997). Observamos que, en estas condiciones, la inducción de la expresión de *AP1* se iniciaba 5 días tras el paso a día largo y seguía aumentando hasta aproximadamente día 9, mientras que la inducción de *LFY* comenzaba a día 4 alcanzando el máximo de expresión a día 7. (Fig. R1.2).

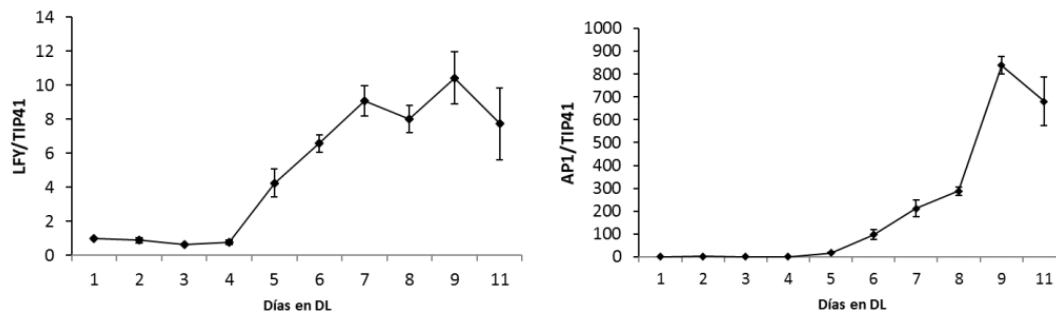


Figura R1.2. Inducción de la expresión de los genes *AP1* y *LFY* durante la transición floral en la línea 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9. Los niveles de expresión de *AP1* y *LFY* se midieron en ápices recogidos a ZT 2h. Se considera día 0 el paso de las plantas a día largo tras ser cultivadas 3 semanas en día corto. Las barras de error representan el intervalo de confianza superior e inferior para cada valor.

A la vista de estos resultados, y dado que nuestra intención era activar a TFL1-GR mientras ocurre la transición floral, pensamos que el tratamiento con dexametasona y posterior análisis transcriptómico de nuestras plantas debía tener lugar entre los días 4 a 7, cuando la inducción de *LFY* y *AP1* ha comenzado, pero aún no ha llegado a su nivel máximo. Para afinar más qué día era el óptimo para tratar las plantas se llevó a cabo un segundo experimento para el que se sembraron de nuevo 4 grupos de plantas 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9, del mismo modo que para los anteriores experimentos, y se trató cada grupo con dexametasona 30 μ M a ZT 2h cada 72h, empezando el tratamiento 4, 5 o 6 días tras el paso de las plantas a día largo, o con mock empezando el tratamiento 4 días tras el paso a día largo. El objetivo de este experimento era analizar cuál de esos días era el más adecuado para que el tratamiento con dexametasona, es decir la activación de TFL1-GR, parara la subida de la expresión de *LFY* y *AP1* a mitad de su inducción durante la transición floral. Se evaluó el efecto del tratamiento a distintos tiempos siguiendo la inducción de los genes *LFY* y *AP1* mediante RT-qPCR (Fig. R1.3).

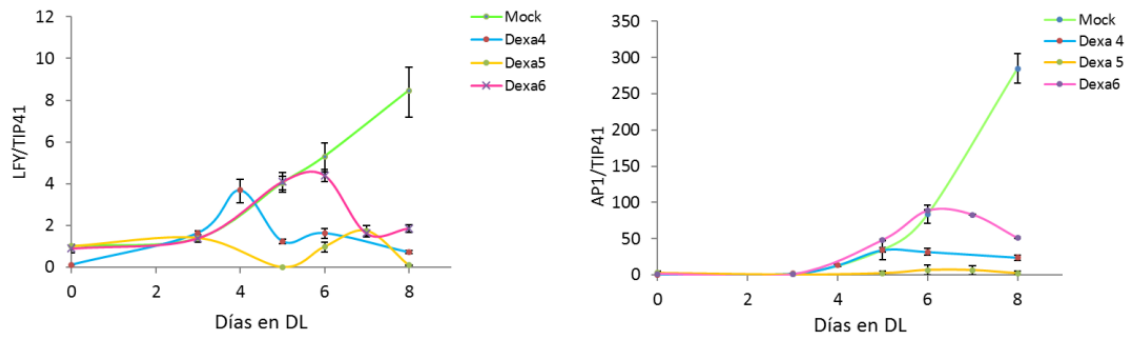


Figura R1.3. Inducción de los genes *LFY* y *AP1* en la línea 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9 en plantas tratadas con dexametasona o mock. Los niveles de expresión de *LFY* y *AP1* se midieron mediante RT-qPCR en ápices recogidos a ZT 2h considerando como tiempo 0 el paso de las plantas a día largo (DL) tras 3 semanas en día corto. El tratamiento con dexametasona se aplicó cada 72h con inicio a tiempo 4, 5 y 6 días, respectivamente. El tratamiento con mock se inició a tiempo 4 días y se repitió cada 72h. Se analizaron en cada caso 3 réplicas biológicas por punto. Las barras de error representan el intervalo de confianza superior e inferior para cada punto.

Los tratamientos a día 4 y 5 bloquearon casi por completo la inducción de los genes *LFY* y *AP1*, por el contrario, el tratamiento a día 6 permitió cierto aumento en el nivel de expresión de ambos genes que disminuyó tras el tratamiento con dexametasona, que permite la entrada de TFL1-GR en el núcleo. A la vista de estos resultados, elegimos día 6 para realizar el tratamiento. Por último, realizamos un nuevo experimento para determinar el momento óptimo tras el tratamiento con dexametasona para realizar la recogida de muestras para el experimento de RNA-seq. Para ello sembramos de nuevo plantas 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9 y las tratamos con dexametasona o mock a ZT 2h, 6 días después de su paso a día largo, y recogimos muestras 0, 2, 3, 5, 8, 12, y 24h tras el tratamiento y analizamos la expresión de *LFY* y *AP1* (Fig. R1.4). El punto en que se observó mayor diferencia entre la expresión de los genes *LFY* y *AP1* entre las muestras tratadas con dexametasona o mock fue 24h tras el tratamiento, de modo que se fijó este punto para la recogida de muestras para para el experimento de RNA-seq.

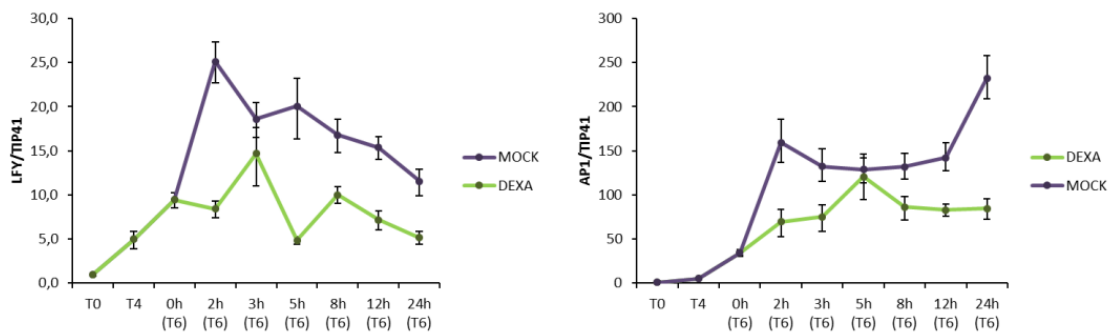


Figura R1.4. Inducción de los genes *LFY* y *AP1* en la línea 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9. Tras 3 semanas creciendo en día corto las plantas se transfirieron a día largo considerando este momento como tiempo 0 (T0). El tratamiento con dexametasona o mock se aplicó a tiempo 6 días (T6) ZT 2h y se analizaron los niveles de expresión de *LFY* y *AP1* a partir de este momento (0h) a diferentes tiempos durante un periodo de 24h. Se analizaron en cada caso 3 réplicas biológicas por punto. Las barras de error representan el intervalo de confianza superior e inferior para cada punto.

1.1.3. RNA-Seq de la línea 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9 tras el tratamiento con dexametasona

Nuestra intención era identificar, mediante análisis transcriptómico por RNA-Seq, los genes cuya expresión cambia en el ápice del tallo durante la transición floral en respuesta a la activación de TFL1-GR por el tratamiento con dexametasona. Basándonos en los resultados obtenidos en los experimentos de puesta a punto, nuestro experimento de RNA-Seq se realizó en las siguientes condiciones: las plantas se cultivaron 3 semanas en día corto y seguidamente se transfirieron a día largo, tomando este momento como T0. A continuación, tras 6 días en día largo (T6), se aplicó el tratamiento con dexametasona 30 μ M o mock directamente sobre el ápice del tallo a ZT 2h. Finalmente, 24h tras el tratamiento (T7, ZT 2h) se recogieron aproximadamente 40 ápices por réplica biológica, 3 réplicas biológicas por condición. El transcriptoma de todas las muestras recogidas se analizó mediante RNA-Seq.

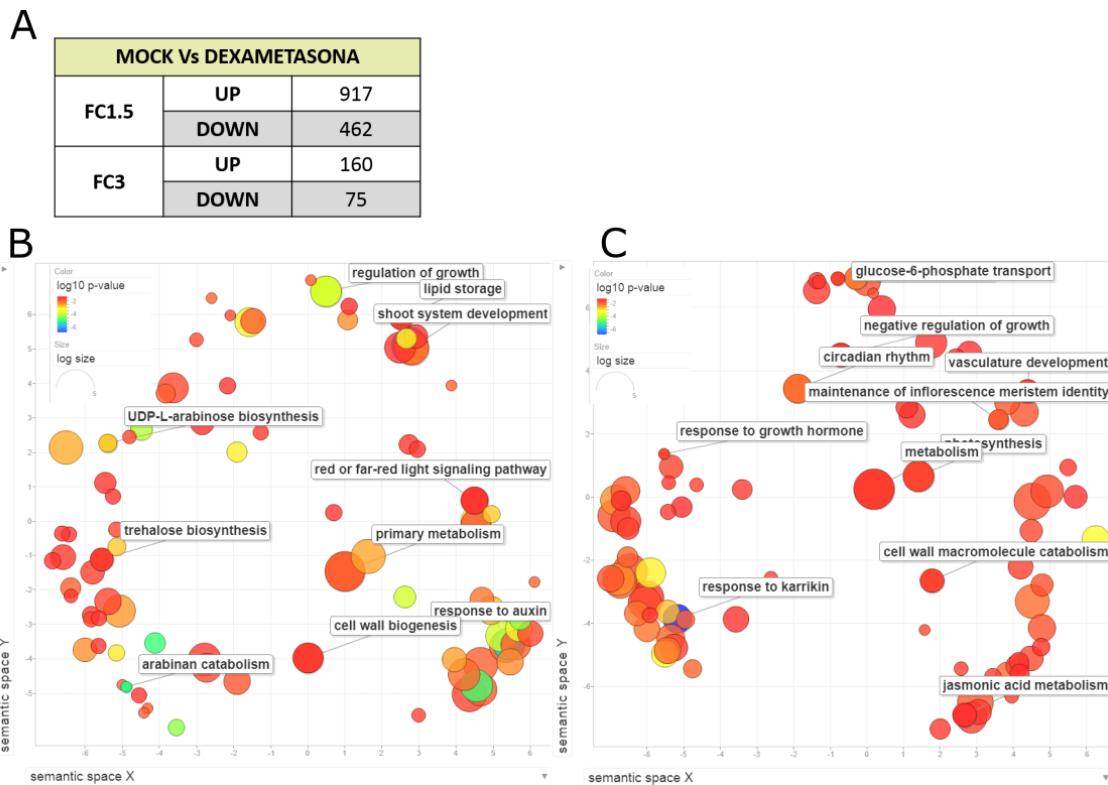


Figura R1.5. Genes diferencialmente expresados entre las condiciones MOCK y DEXA en la línea 35S:TFL1-GR *tfl1.1* #7.9 analizados mediante RNA-Seq en ápices. A) Tabla resumen del número de genes diferencialmente expresados a diferentes niveles de *Fold Change* $FC \geq 1.5$, $FC \geq 3$, $FDR 0.001$. B) Términos GO más representados entre los genes regulados al alza por la activación de TFL1-GR. C) Términos GO más representados entre los genes regulados a la baja por la activación de TFL1-GR. El color del círculo indica el p-valor para el FDR (*False Discovery rate*), el tamaño de los círculos indica la frecuencia del término GO en las bases de datos GOA (*Gene Ontology Analysis*)

En este RNA-Seq se identificaron un total de 1379 genes diferencialmente expresados entre los tratamientos con dexametasona o mock: 462 cuya expresión se reduce cuando se aplica dexametasona y 917 cuya expresión se incrementa con el tratamiento (*Fold Change* $\geq 1,5$ y un *False Discovery rate* ≤ 0.001) (Fig. R1.5 A). Entre los genes diferencialmente expresados

encontramos *LFY*, *CAL* y *FUL*, genes implicados en la especificación de la identidad de los meristemas en la inflorescencia (Blázquez et al., 2006). El análisis de los términos GO (*Gene Ontology enrichment*) mostró que entre las categorías más representadas entre los genes diferencialmente expresados en este RNA-Seq se encontraban las de respuesta al crecimiento, metabolismo, mantenimiento del meristemo inflorescente, o las de síntesis y transporte de trehalosa.

1.1.4. Validación mediante RT-qPCR de los resultados obtenidos en el RNA-Seq de la línea 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9

Para comprobar que los cambios en el transcriptoma detectados en las plantas tratadas con dexametasona con respecto al control mock eran debidos a la aplicación del tratamiento y no resultados artefactuales derivados del sistema de análisis masivo utilizado, se seleccionaron un pequeño grupo de genes (11) de entre los 1379 diferencialmente expresados en el experimento anterior, y se analizó de nuevo su expresión, mediante RT-qPCR, en un nuevo experimento independiente. Las muestras para el RNA-Seq se recogieron 24h tras la aplicación del tratamiento con dexametasona. No obstante, otros estudios han mostrado que el tratamiento con dexametasona en líneas inducibles basadas en la fusión del dominio GR es capaz de generar cambios en el transcriptoma a tiempos más cortos tras su aplicación, por lo que para descartar que los cambios observados tras 24 horas fueran menores o diferentes a los observados a tiempos cortos decidimos analizar las diferencias de expresión también en muestras tomadas 2h tras el tratamiento con dexametasona. Para ello se sembraron de nuevo plantas 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9 y se trataron siguiendo el mismo protocolo empleado para el experimento de RNA-Seq descrito en el apartado anterior. Seguidamente, se recogieron muestras 2h y 24h tras el tratamiento con dexametasona o mock, y se analizaron mediante qRT-PCR. De los 11 genes analizados 9 de ellos mostraron cambios significativos en el nivel de expresión entre los tratamientos con dexametasona y con mock, similares a los observados en el experimento de RNA-Seq, si bien, en algunos casos como los de los genes *CDF5*, *WRKY28*, o *TTPH*, los cambios sólo fueron significativos 2h tras el tratamiento, mientras que *LFY*, *CRY3*, *FUL*, *AtHB21*, *RVE1* y *PIF5* sólo mostraron cambios significativos 24h tras el tratamiento (Fig. R1.6).

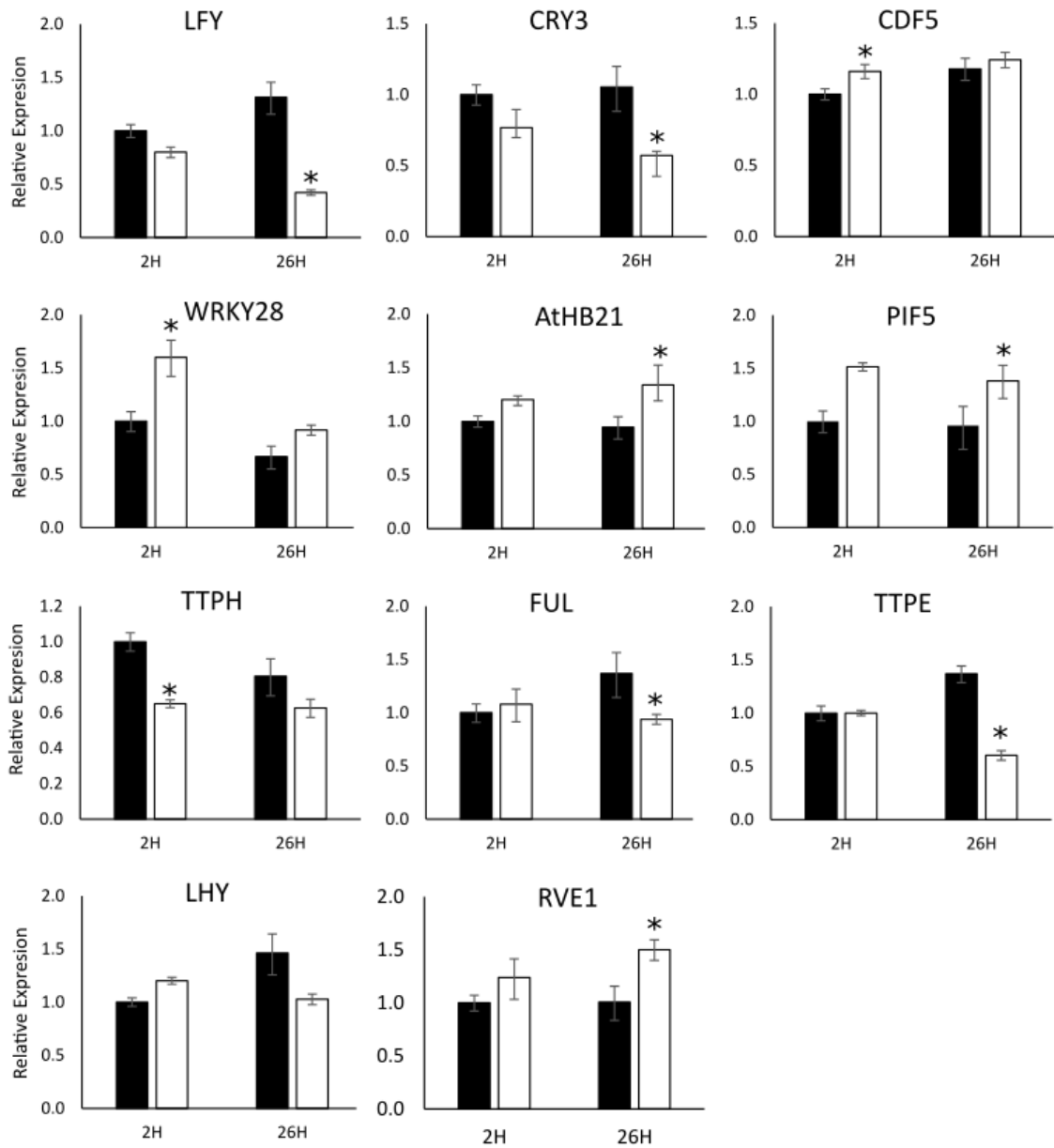


Figura R1.6. Nivel de expresión de distintos genes diferencialmente expresados, 2h y 24h tras el tratamiento con dexametasona. Nivel de expresión de los genes que se indican en ápices de la línea 35S:TFL1-GR *tf1-1* #7.9, 2h o 24h tras el tratamiento con dexametasona 30µM o mock. El tratamiento se aplicó a ZT 0. Las barras blancas corresponden a las muestras tratadas con dexametasona, las barras negras corresponden al control tratado con mock. Se muestra el resultado promedio de 3 réplicas biológicas, las barras de error representan el error estándar. Nivel de significatividad medido utilizando test t 2 colas $p < 0.05$.

1.2. Identificación de dianas directas de TFL1 mediante ChIP-Seq

Los resultados del RNA-Seq con la línea activable de TFL1 nos han permitido conocer qué genes se encuentran regulados por la presencia de TFL1 en el núcleo. Sin embargo, ¿es esta regulación directa? O bien, ¿se necesitan otros factores para que TFL1 actúe como regulador transcripcional? Para contestar a estas preguntas colaboramos con el laboratorio del Dr. Markus Schmid en el Umea Plant Science Center (UPSC, Suecia).

Para analizar si TFL1 puede actuar como regulador transcripcional y por lo tanto es capaz de unirse al ADN y modificar la expresión de sus dianas de forma directa, en el laboratorio del Dr. Schmid se realizó un experimento de ChIP-Seq sobre una línea de complementación del mutante *tf1-1*, generada para identificar los genes a los que se encuentra unida la proteína TFL1. La línea de complementación utilizada para el ChIP-Seq, en adelante gTFL1-*Venus*, contenía un transgén con la región genómica completa de *TFL1*, a la que se hallaba fusionada al inicio de la región codificante del *TFL1* la secuencia para la proteína fluorescente *Venus*, bajo el control de las regiones reguladoras de *TFL1* (592pb de la región 5' intergénica y 3396pb de la región 3' intergénica (Serrano-Mislata et al., 2016), en un fondo mutante *tf1-1*. Análisis previos de esta línea, gTFL1-*Venus*, mostraron que el transgén que contiene era capaz de rescatar completamente el fenotipo mutante de *tf1-1*: floración temprana y crecimiento determinado, y que en las plantas la proteína de fusión TFL1-*Venus* se localizaba en los dominios de expresión descritos para *TFL1*.

El experimento de ChIP-Seq, llevado a cabo con cromatina de ápices de plantas en transición floral (cultivadas en día largo), y utilizando un anticuerpo anti-GFP para la inmunoprecipitación, permitió identificar en el genoma un total de 970 picos, correspondientes a regiones a las que se encuentra unido TFL1, que corresponden a 952 genes. La anotación de estos picos mostró que un 71% de ellos se encontraban en regiones promotoras, mientras que un 12,7 % se localizaban en regiones intergénicas y solamente un 7,6% mapeaba en exones. Además el análisis MEME-ChIP (Machanick and Bailey, 2011) mostró que el motivo de unión más común entre los 970 picos identificados fue el G-Box (CACGTG) (Fig. R1.8 A y B). El análisis GO de los genes a los que se encontraba unido TFL1 mostró que TFL1 se une preferentemente a genes involucrados en procesos metabólicos, respuesta a estímulos y procesos celulares (Fig. R1.8 C). Entre los genes a los que se encontró unido TFL1 se encuentran importantes reguladores del reloj circadiano como *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)* y *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, reguladores del desarrollo floral como *LEAFY (LFY)*, o *FRUITFUL (FUL)*, elementos clave de la ruta del fotoperiodo como *CONSTANS (CO)*, o de las rutas de señalización por ABA como *ABA INSENSITIVE 2, 5 (ABI2, ABI5)*, o *HIGHLY ABA INDUCED PP2C (HAI1)*.

Consistentemente, un estudio reciente llevado a cabo por Zhu *et al.* (2020) en el que se analizan las dianas de TFL1 mediante ChIP-Seq utilizando un sistema experimental similar muestra resultados similares a los obtenidos en nuestro sistema experimental.

Estos resultados indican que TFL1 actúa como regulador transcripcional uniéndose a sus promotores y modulando su expresión.

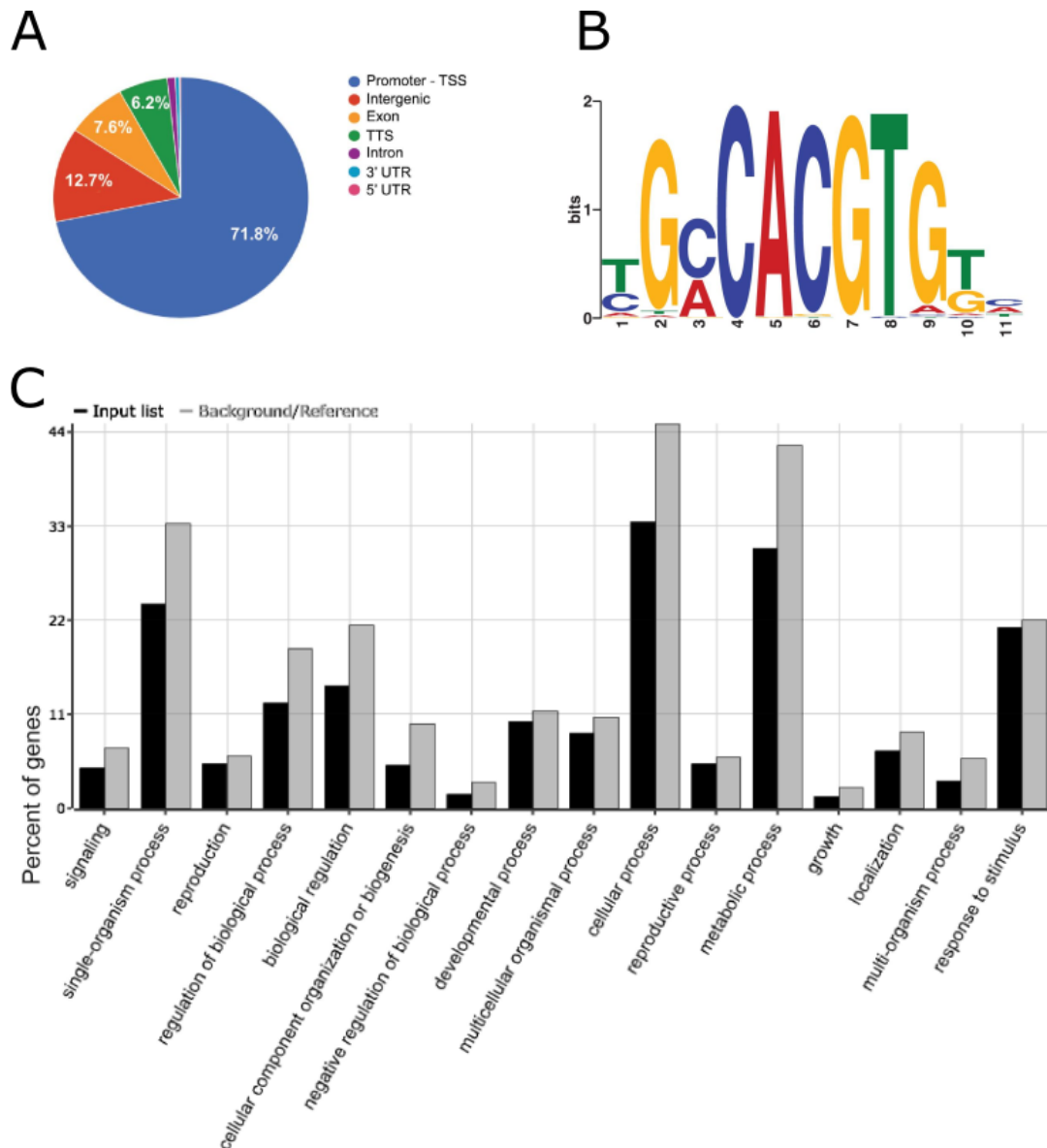


Figura R1.8. Identificación de dianas directas de TFL1 durante la transición floral, mediante ChIP-Seq de la línea pTFL1:GFP-TFL1 *tfl1-1*. A) Anotación de la distribución de los picos comunes en las tres réplicas en el ChIP-Seq B) Secuencia consenso del sitio de unión predicho para TFL1 basado en los resultados obtenidos en el ChIP-Seq C) Análisis de términos GO de los genes a los que se encontraba unido TFL1 en el experimento de ChIP-Seq. Adaptado de Goretti, Silvestre-Vañó *et al.*, 2020.

El experimento de RNA-Seq con la línea inducible 35S:TFL1-GR *tfl1-1* nos permitió conocer qué genes cambian su expresión con la entrada de TFL1 al núcleo, sin embargo, desconocemos si TFL1 regula estos cambios de forma directa o no. Por lo tanto, para identificar

cuáles de los 1379 genes cuya expresión cambia con la entrada de TFL1 en el núcleo son dianas directas cruzamos los datos obtenidos en los experimentos de RNA-Seq y ChIP-Seq. Como resultado, se obtuvo que de los 957 genes a los que se encontró unido TFL1, 115 (12%) se encontraban diferencialmente expresados en el RNA-Seq, 36 de ellos se encontraban regulados a la baja y 79 incrementaron su expresión con la aplicación de dexametasona (Fig. R1.9).

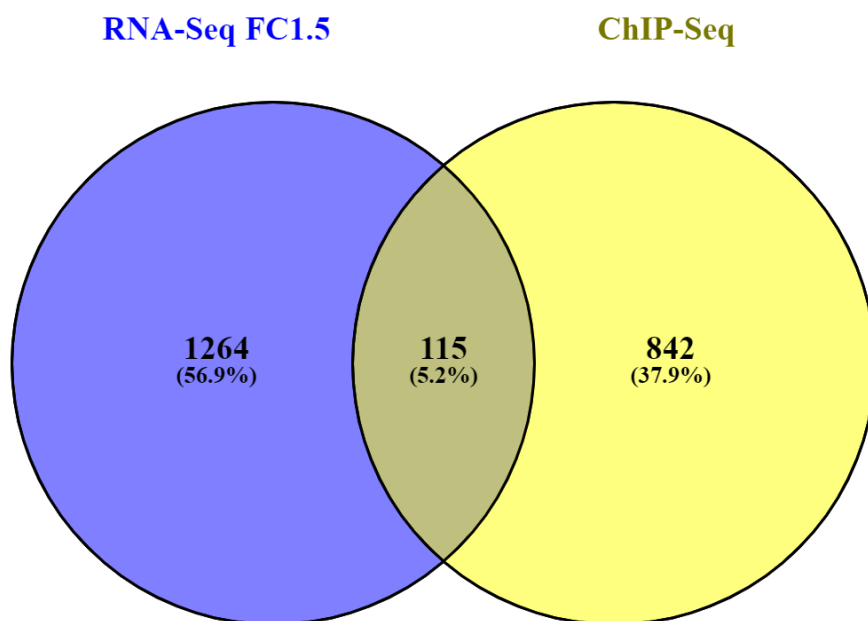


Figura R1.9 Intersección entre los resultados obtenidos en los experimentos de ChIP-Seq y RNA-Seq. Adaptado de Goretti, Silvestre-Vañó *et al.*, 2020.

No obstante, aunque ambos experimentos se realizaron con ápices de plantas en la transición floral, hay que tener en cuenta que los dos experimentos se llevaron a cabo utilizando líneas y condiciones de cultivo diferentes, por lo que no podemos descartar que los resultados obtenidos en cada experimento estén influenciados por el sistema utilizado y que por tanto los datos de dichos experimentos no sean del todo comparables. Para determinar si ambos grupos de datos son o no comparables se planteó un nuevo experimento en el que se analizó mediante ChIP-qPCR la unión de TFL1 al promotor de un grupo de 20 genes de entre los 115 comunes a ambos experimentos, utilizando la línea activable 35S:TFL1-GR *tf1-1* y anticuerpo anti-GR para la inmunoprecipitación de la cromatina. La selección de los 20 genes utilizados para este experimento se hizo teniendo en cuenta el papel de estos en el control del desarrollo o la floración (Tabla R1.1).

Código Gen	LogFC	Gen	Función
AT2G18700	-1.69	TPS11	Transición floral y crecimiento vegetativo. Respuesta a estrés biótico
AT1G70290	-1.56	TPS8	Regulación ruta de la edad a través de miRNA156
AT1G69570	-1.21	CDF5	Control floración aguas arriba de CO
AT2G42870	-1.18	PAR1	Regulación floración vía ruta fotoperiodo.
AT5G17300	-1.01	RVE1	Reloj circadiano. Tolerancia al frío
AT4G18170	-0.93	WRKY28	Respuesta a estrés biótico y abiótico
AT4G40060	-0.8	HB16	Desarrollo de la hoja y sensibilidad al fotoperiodo
AT2G43010	-0.66	PIF4	Control de la floración vía ruta fotoperiodo
AT5G65640	-0.66	bHLH093	Control de la floración vía ruta de las Giberelinas
AT3G59060	-0.62	PIL6	Respuesta a ABA, reloj circadiano
AT1G13245	-1.22	RTFL17	Desarrollo de los órganos laterales
AT5G24850	1.55	CRY3	Criptocromo
AT5G24470	1.3	PRR5	Reloj circadiano
AT5G60910	1.16	FUL	Floración, actividad del SAM, desarrollo del fruto
AT2G46830	0.97	CCA1	Reloj circadiano
AT1G01060	0.85	LHY	Proteína del reloj circadiano. Control del tiempo de floración a través de CO
AT2G22190	0.85	TTPE	Metabolismo de la Trehalosa-6-fosfato
AT4G39770	0.83	TTPH	Metabolismo de la Trehalosa-6-fosfato
AT2G46790	0.59	PRR9	Reloj circadiano
AT5G61850	1.59	LFY	Control de la floración y del desarrollo floral

Tabla R1.1. Genes seleccionados para el experimento de CHIP-PCR con la línea 35S:TFL1-GR *tfl1-1*. Se indica el valor de LogFC obtenido en el RNA-Seq con la misma línea, y su función en el desarrollo o el control de la floración en Arabidopsis.

Consistentemente con los resultados obtenidos en el experimento de ChIP-Seq, con la línea gTFL1-*Venus*, se detectó unión de TFL1-GR al promotor de una parte importante de los genes testados (Fig. R1.10). Estos resultados nos permiten concluir que ambos sistemas experimentales sí son comparables.

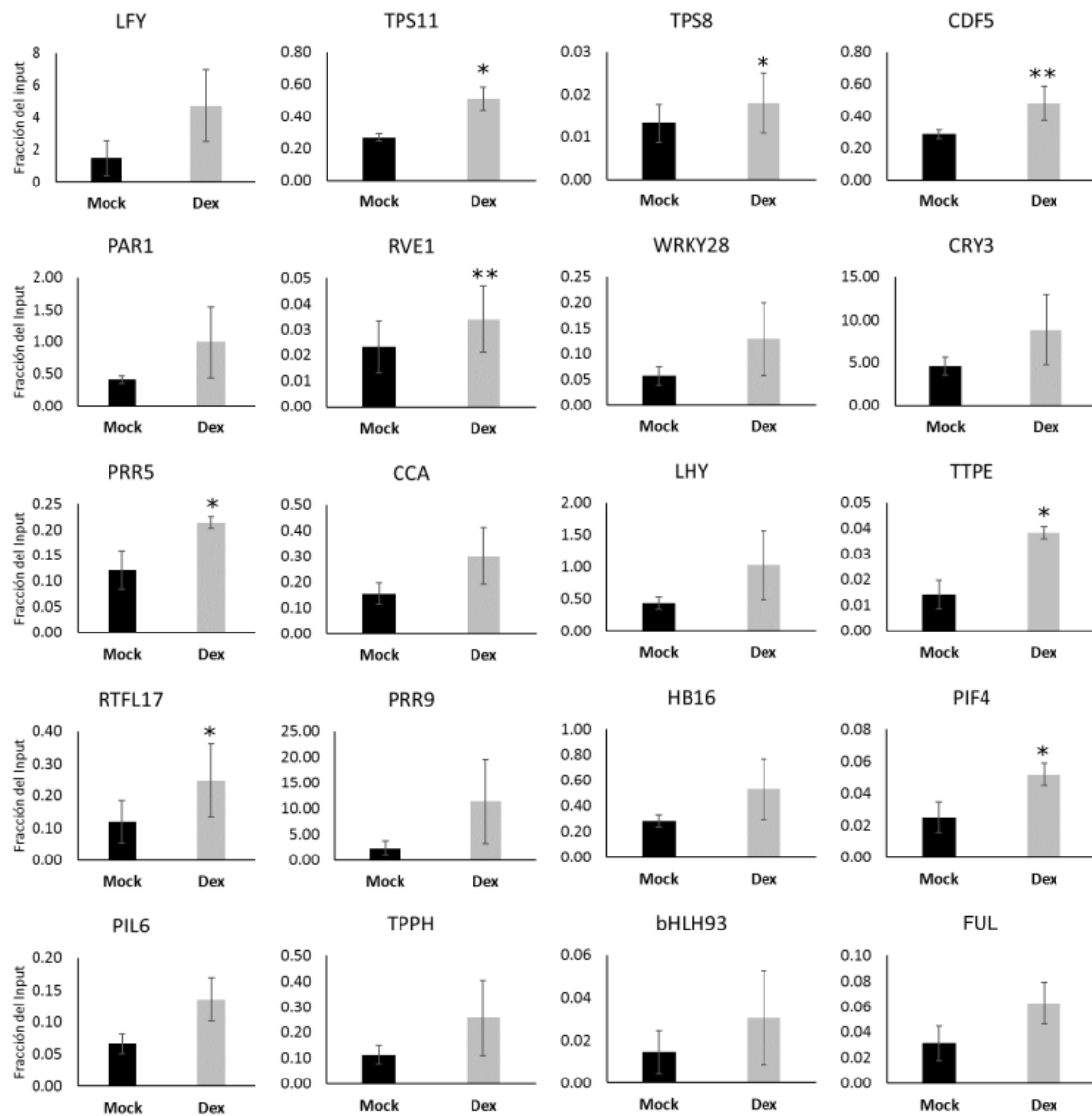


Figura R1.10. Validación de las dianas de TFL1 mediante ChIP-PCR en la línea 35S:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9. Se muestra el nivel de enriquecimiento de 20 genes seleccionados de entre los identificados como dianas de TFL1 en el experimento de ChIP-Seq con la línea *gTFL1-1Venus*. La inmunoprecipitación se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-GR. Se muestran los valores promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar. Nivel de significatividad medido con Test T de dos colas * $t \geq 0.05$, ** $t \geq 0.01$.

1.3. Comparación de los genes diana de TFL1 y FD

Se ha propuesto que TFL1 es capaz de formar un complejo transcripcional represor junto con el factor de transcripción de tipo bZIP FD, un importante regulador de la floración en *Arabidopsis* (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Hanano and Goto, 2011). Un estudio reciente realizado por Collani *et al.* (2019) ha demostrado que dicho complejo se une *in vitro* preferencialmente a motivos de tipo G-Box. Asimismo, un experimento de ChIP-Seq en este mismo estudio muestra además que el sitio de unión más representado para FD en el ápice del tallo es también el motivo G-Box.

Teniendo en cuenta que los experimentos de ChIP-Seq para TFL1 y FD muestran que ambos se unen preferentemente a motivos G-Box, y que ambas proteínas son capaces de interactuar formando un complejo en el núcleo (Hanano and Goto, 2011) sería esperable que una parte de las dianas identificadas para ambos genes sean comunes. Para comprobar esta hipótesis se cruzaron los datos publicados para FD (Collani et al., 2019), con los resultados del ChIP-Seq de TFL1 realizado en el laboratorio del Dr. Schmid. De los 957 genes a los que se encontró unido TFL1, se encontró que 358 (36%) también se unían FD (Fig. R1.11).

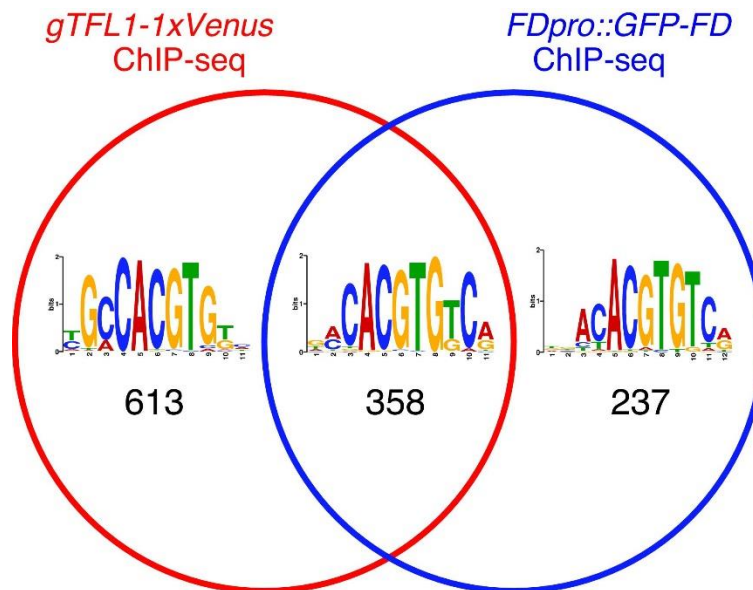


Figura R1.11. Genes a los que se unieron FD y TFL1 en los experimentos de ChIP-Seq. Diagrama de Venn que muestra el número de genes comunes a los que se unieron TFL1 y FD en los respectivos experimentos de ChIP-Seq. Se muestra en el interior de las circunferencias el resultado del análisis MEME-ChIP, que indica los motivos de unión más representativos dentro de cada grupo. Modificada de Goretti, Silvestre-Vañó *et al.* 2020

La gran cantidad de picos de unión compartidos entre ambas proteínas demuestra la hipótesis de que FD actúe en el SAM formando un complejo transcripcional con TFL1, confirmando un modelo previamente propuesto (Ahn et al., 2006; Hanano and Goto, 2011)

CAPÍTULO 2: Caracterización de los factores de transcripción bZIP grupo-I bZIP30, bZIP52 y bZIP59, interactores de TFL1 y FT

2.1 Estudio de la interacción de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 con FT y TFL1

La proteína TFL1 pertenece a la familia de las PEBP (*Phosphatidil etanolamine binding proteins*). Por lo tanto, aunque se ha descrito que TFL1 actúa como regulador transcripcional, debe hacerlo formando complejos con factores de transcripción, tales como FD (Wigge et al. 2005, Goretti et al., 2020). Es por esto que conocer los interactores de TFL1 es de gran importancia para entender su modo de acción. Como primera aproximación para identificar nuevos interactores de TFL1, en el laboratorio se realizó un rastreo de doble híbrido en levadura de una genoteca de factores de transcripción de *Arabidopsis*, utilizando a TFL1 como cebo (Méndez, 2012). Como resultado de este rastreo se identificaron dos nuevos interactores de TFL1: bZIP30 y bZIP52. Ambas proteínas pertenecen a la familia de los factores de transcripción tipo bZIP grupo-I (Jakoby et al. 2002). Paralelamente a estos estudios, en Niwa et al. (2013) describieron la interacción de estos mismos bZIPs con la proteína homóloga de TFL1, FT. Estos bZIPs también fueron identificados en un rastreo de doble híbrido en levadura, con FT como cebo, en el que se identificó además un tercer bZIP de grupo-I: bZIP59. Los genes que codifican bZIP30, bZIP52 y bZIP59 se encuentran muy cercanos filogenéticamente y conforman, junto con bZIP18, 29, 69 y 71 un mismo subclado dentro de los genes del grupo-I de los factores de transcripción de tipo bZIP (Fig. R2.1).

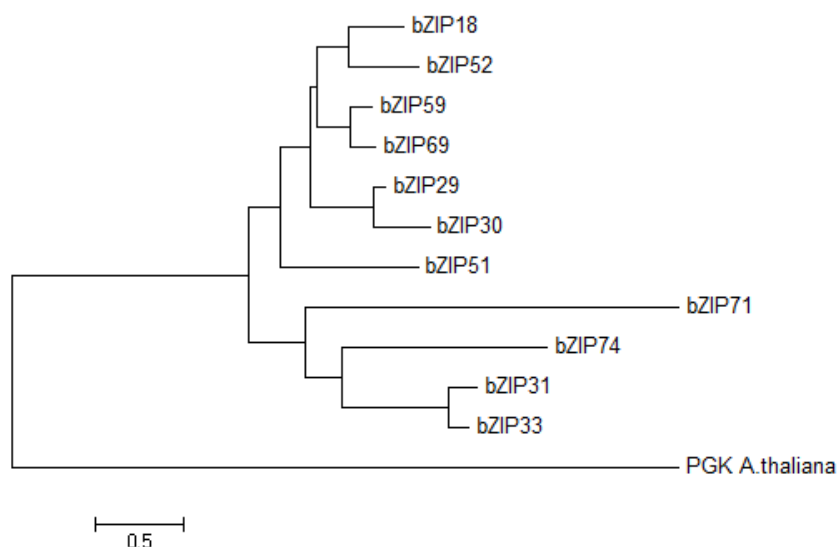


Figura R2.1 Filogenia de los factores de transcripción de tipo bZIP del grupo-I. Las secuencias de nucleótidos de los diferentes representantes del grupo I de factores de transcripción de tipo bZIP se tradujeron usando el código genético estándar y se generó el árbol filogenético por *máximo likelihood* utilizando un Bootstrap de 1000 repeticiones, utilizando el programa MEGA4. Se utilizó el gen *PHOSPHOGLYCERATE KINASE (PGK)* como grupo externo.

Dada la gran homología existente entre las parejas de factores de transcripción bZIP30-bZIP29, bZIP52-bZIP18 y bZIP59-bZIP69, que comparten un 55,72%, 69,7% y 74.73% de homología en su cDNA respectivamente, decidimos probar si estos homólogos eran también capaces de interactuar con TFL1 o con FT. Para ello, se realizaron nuevos ensayos de doble híbrido en levadura, utilizando como cebo las proteínas TFL1 y FT, y los diferentes bZIP como presa.

En el laboratorio disponíamos de construcciones cebo en las que las regiones codificantes de los genes FT y TFL1 se hallan fusionadas al dominio de unión de GAL4, en el plásmido pGBKT7 (Méndez, 2012). Para los ensayos, se generaron además nuevas construcciones presa en las que se fusionó la región codificante de cada uno de los bZIPs al dominio de activación de GAL4 en el plásmido pGADT7. Seguidamente, se co-transformaron las células de levadura con las construcciones cebo y presa o, en el caso del control negativo, con la presa y el plásmido pGBKT7 vacío, y se cultivaron en medio selectivo para ambos plásmidos y para el reportador -L-W-H. Todas las interacciones se probaron en concentraciones crecientes de 3-Amino Trizol (3AT) (0, 5, 10, 20 mM), considerando positivas sólo las interacciones capaces de crecer en medio selectivo a una concentración de 3AT a la que no se observase crecimiento en el control negativo con el plásmido vacío. Además, se analizó la interacción ya descrita entre FT y los genes TFL1 y FT (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005), que se utilizó como control positivo. Como resultado, se observó que TFL1 es capaz de interactuar únicamente con bZIP30, y con bZIP52.2, isoforma de bZIP52 derivada de la forma de *splicing* 2 de dicho gen. Por el contrario, se observó interacción de FT con todos los bZIPs testados a excepción de bZIP69, aunque la mayoría de las interacciones fueron más débiles que las observadas con TFL1 (Fig. R2.2)

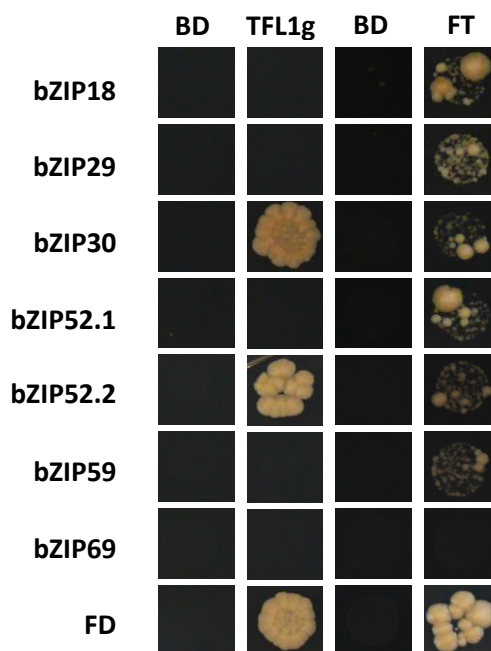


Figura R2.2. Ensayo de doble híbrido en levadura para el análisis de las interacciones de FT y TFL1 con los bZIPs 30, 52, 59, 18, 29 y 69. (Sólo se muestran los resultados obtenidos en medio -L-W-H +20mM 3AT) Todas las interacciones se analizaron por triplicado en diferentes concentraciones de 3AT. BD, Dominio de unión.

Los rastreos de doble híbrido se realizan empleando un sistema de células de levadura, en el que las proteínas posiblemente están sujetas a modificaciones postraduccionales diferentes de las que tienen lugar en las células vegetales, lo que pueden afectar al plegamiento de las mismas y a su capacidad para interactuar con otras proteínas, por lo tanto, alguna de las interacciones observadas puede no tener lugar en la planta o viceversa. Por esta razón se decidió analizar también las interacciones observadas en los diferentes ensayos en levadura utilizando un sistema “in planta”. En nuestro caso decidimos realizar ensayos de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC), utilizando expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*. El ensayo de BiFC se basa en la división de una proteína fluorescente en dos mitades, incapaces de interactuar entre ellas de forma espontánea. Cuando estas dos mitades se fusionan a dos proteínas capaces de interactuar entre ellas, ambas partes quedan lo suficientemente cerca para que se reconstituya una nueva proteína fluorescente con las mismas propiedades de fluorescencia que la proteína inicial.

Para llevar a cabo estos ensayos se generaron construcciones en las que se fusionaron las regiones codificantes de FT y TFL1 a la mitad C-terminal de la proteína fluorescente amarilla (YFP), y las regiones codificantes de bZIP30, bZIP52, bZIP59, bZIP18, bZIP29 y bZIP69 a la mitad N-terminal de la YFP, utilizando para ello los plásmidos pYFC43 y pYFN43, respectivamente (Belda-Palazón et al., 2012). A continuación, las diferentes combinaciones pYFP^C-FT/TFL1 + pYFP^N-bZIP se agroinfiltraron en hojas de *Nicotiana benthamiana* y, tres días tras la infiltración,

se analizó la fluorescencia de las hojas agroinfiltradas en el microscopio confocal. En este ensayo se incluyó como control positivo la interacción entre las proteínas AKIN10-AKIN β , ya descrita anteriormente, y como control negativo incluimos la interacción entre FRUITFULL (FUL) y SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), factores de transcripción tipo MADS cuya interacción se ha probado que no ocurre "*in vivo*" (Immink et al., 2002; De Folter et al., 2005; Balanzà et al., 2014). En el ensayo correspondiente a las combinaciones bZIP30, bZIP52 y bZIP59 con FT se observó complementación de la fluorescencia tanto en núcleo como en citoplasma. En el caso de las combinaciones bZIP18-FT y bZIP29-FT también se observó fluorescencia, aunque el nivel de señal era más bajo que en los casos anteriores, y quedaba restringido mayoritariamente al núcleo en el caso de bZIP29, y al citoplasma en el caso de bZIP18. Por lo que respecta a las combinaciones con TFL1, se observó complementación de la fluorescencia en núcleo y citoplasma con bZIP30, 52, 18 y 29. En el caso de la combinación pYFP^C-TFL1+ pYFP^N-bZIP59 se observó una señal débil únicamente en el citoplasma. No se observó complementación de la fluorescencia en ninguna de las combinaciones con bZIP69, ni en ninguno de los controles negativos (Fig. R2.3).

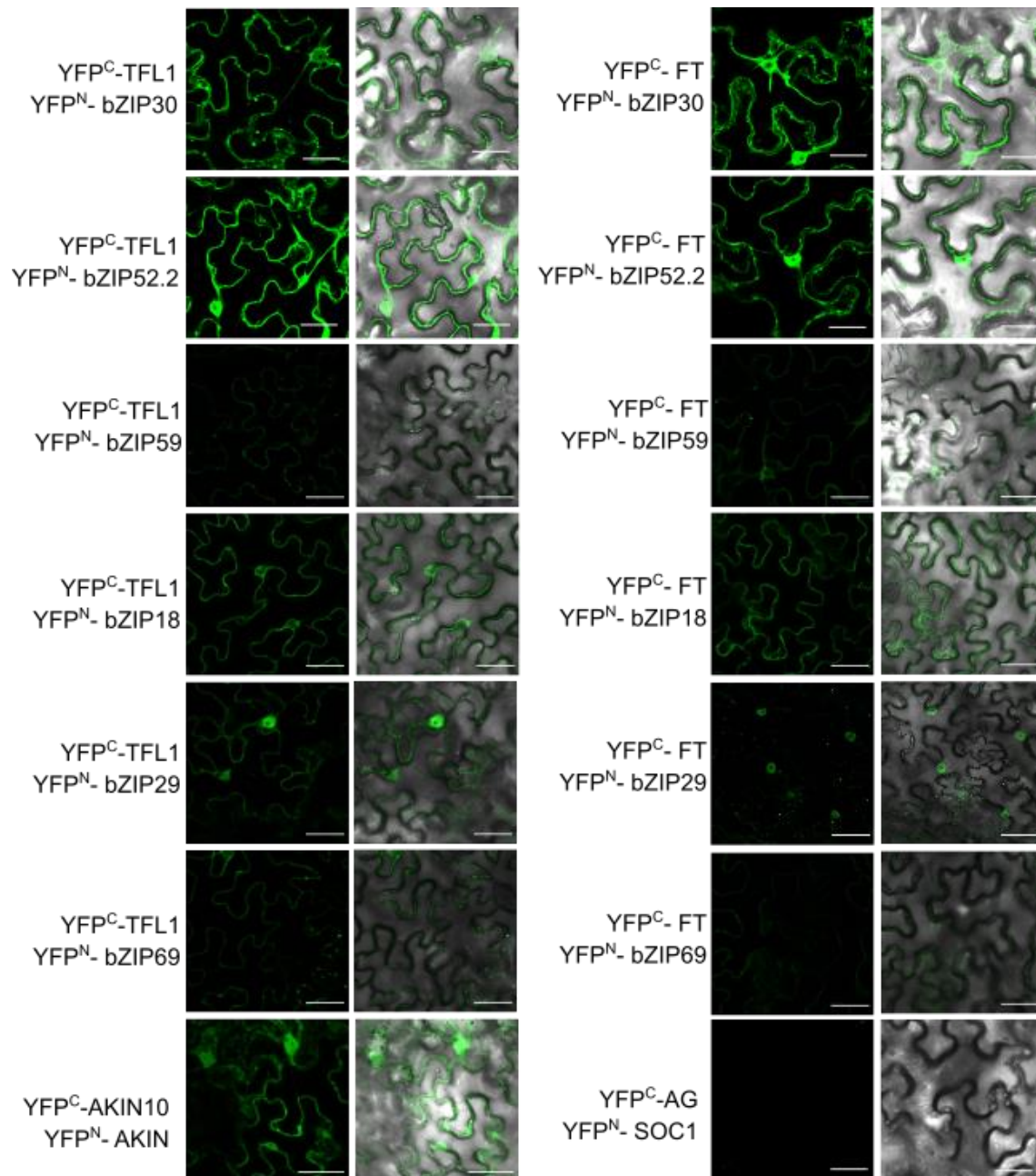


Figura R2.3 Análisis de la interacción proteína-proteína de los bZIPs 30, 52, 59, 18, 29 y 69 con FT y TFL1, mediante ensayos de BiFC. Imágenes de microscopía confocal de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones indicadas a la izquierda de la figura. Se incluyen también las imágenes correspondientes a los controles YFP^C-SOC1+ YFP^N-AG (control negativo) y YFP^C-AKIN10+ YFP^N-AKIN (control positivo). Barra de escala 100μM.

En conjunto, estos resultados indican que los bZIPs de clase-I podrían formar complejos con proteínas reguladoras importantes en el desarrollo de *Arabidopsis*, tales como FT y TFL1.

2.2 Caracterización del patrón de expresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59

2.2.1. Generación y análisis de líneas reporteras genómicas pbZIP:bZIP-GUS

Con el fin de caracterizar los genes *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59* y su posible papel en el desarrollo en *Arabidopsis*, así como para analizar si las interacciones encontradas entre estos factores de transcripción y dos reguladores clave de la floración en *Arabidopsis*, FT y TFL1, podrían tener lugar *in vivo*, decidimos estudiar el patrón de expresión de estos genes. Para ello, se generaron construcciones para cada gen, fusionando la región 5' intergénica más la región codificante completa, hasta el último codón antes del codón de parada (STOP), al gen reportero GUS (Fig.R2.4). Así, se obtuvieron fusiones traduccionales que podrían permitir analizar el patrón de expresión de los diferentes bZIPs en los distintos tejidos de la planta haciendo posible, así mismo, diferenciar la localización tisular de las dos isoformas de bZIP52. En el caso de bZIP59, dado que la región 5' intergénica es muy grande, aproximadamente 6 kb, se emplearon únicamente los 2,4 kb anteriores al codón de inicio, ATG.



Figura R2.4. Esquema de las construcciones generadas para el estudio del patrón de expresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59. Las construcciones se generaron fusionando el gen reportero GUS a una región genómica, de cada uno de los bZIPs que incluía desde el comienzo de la región 5' intergénica hasta el codón anterior al codón de STOP (gbZIP).

Todas las construcciones se transformaron en el genotipo silvestre de *Arabidopsis Col-0*. Seguidamente, se analizó la expresión del gen reportero en plantas transgénicas homocigotas estables (T3) en estadio de plántula, así como en ápices de inflorescencia, analizando un mínimo de tres líneas homocigotas independientes para cada gen.

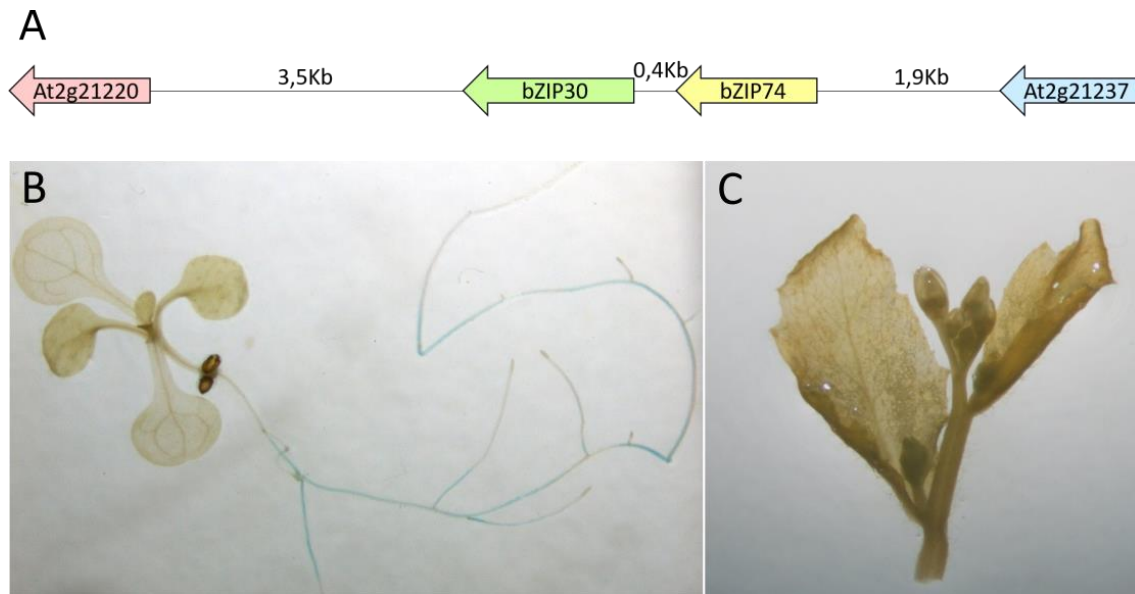


Figura R2.5. Patrón de expresión de la línea reportera pbZIP30:gbZIP30-GUS. A) Esquema de la región genómica del cromosoma 2 de arábidopsis (región 9089380-9101184) que contiene el gen *bZIP30* B) Expresión de pbZIP30:gbZIP30-GUS en plántulas de 10 días. C) Expresión en tallo y ápices de inflorescencia.

Prácticamente, ninguna de las plantas transformadas con la construcción pbZIP30:gbZIP30-GUS mostraron actividad GUS (Fig.R2.5, B y C). Esto posiblemente se deba a que la región 5' intergénica de *bZIP30* es muy corta, aprox 400 pb, de las cuales 200 pb corresponden a la región 5'UTR del gen (Fig.R2.5 A), y que esa región no sea suficiente para dirigir la expresión del gen. Es posible que una parte importante de los elementos reguladores en *cis* del gen *bZIP30* se hallen, bien en la región 3' intergénica, o incluso en la región 5' intergénica del gen anterior, *bZIP74*.

Por otra parte, el análisis de las plantas transformadas con las construcciones pbZIP52.1:gbZIP52.1-GUS y pbZIP52.2:gbZIP52.2-GUS indicó que ambas isoformas muestran un patrón de localización tisular muy similar. En ambos casos, se observó expresión en la mayoría de los tejidos de la planta, tanto en la fase vegetativa como reproductiva. En plántulas, cabe destacar la expresión alta en la raíz y en los haces vasculares de la hoja. En ápices de inflorescencia se observa expresión en el tallo de la inflorescencia, especialmente en los haces vasculares (Fig.R2.6 y R2.7). También se observó expresión en las flores: en la vasculatura de pétalos y sépalos, en la región apical del carpelo, en el estilo y en el estigma, y en el polen. El patrón de expresión en flores fue dinámico, variando en localización e intensidad dependiendo del estadio de desarrollo de la flor. Las flores jóvenes, estadios 11-12 (Smyth et al., 1990), mostraron expresión fuerte en la parte apical del carpelo, estilo y estigma, y ausente en anteras (Fig.R2.6 E y G, Fig. R2.7 D y F), en las flores en anthesis la expresión se concentró en el borde superior del carpelo y del estilo y se intensificó en el estigma, y finalmente en las flores maduras

estadios 14-16 la expresión en estigma y estilo se redujo al tiempo que se observó una expresión fuerte en los estambres, en el filamento de la antera y en el polen maduro (Fig.R2.6 E, H, I, Fig.R2.7 D y G).

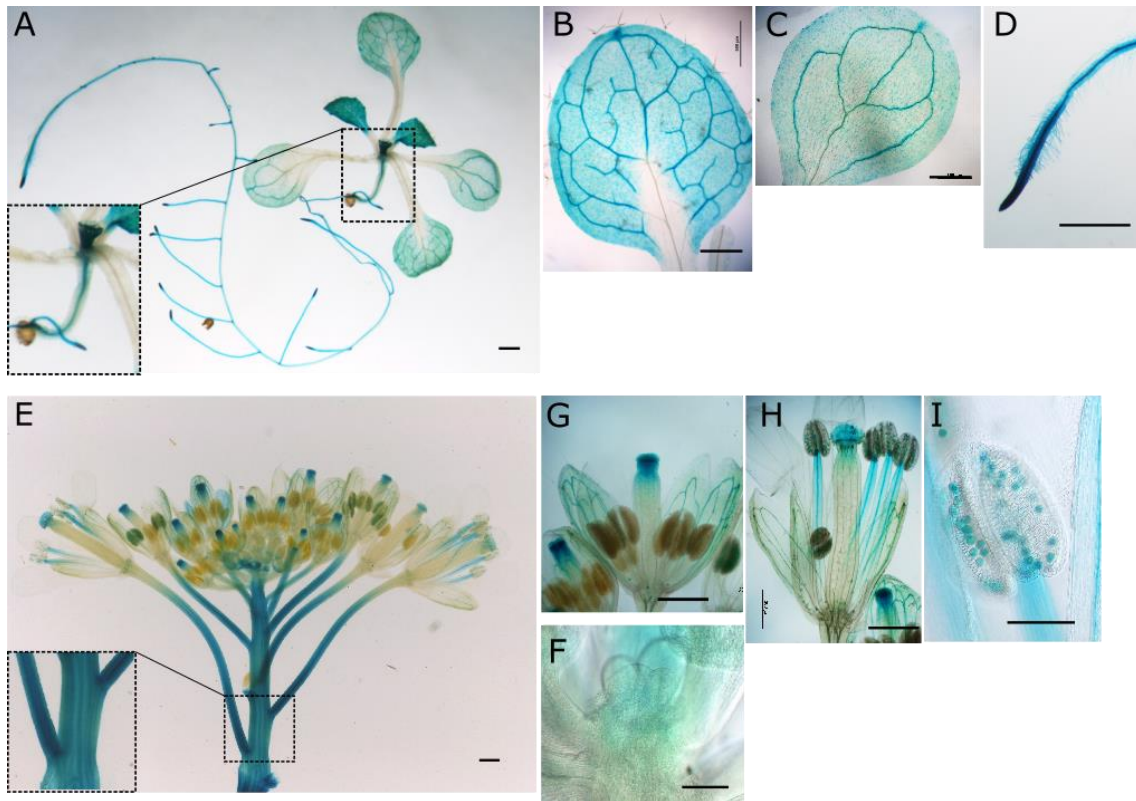


Figura R2.6. Patrón de expresión de la construcción reportera pbZIP52:gbZIP52.1-GUS A-D) Expresión en plántulas de 10 días A) Plántula completa, en el recuadro de la parte inferior izquierda detalle de la expresión en hipocotilo, B) Hoja C) Cotiledón D) Raíz. E-I) Expresión en tallo y ápices de inflorescencia. E) Ápice G) Flor en antésis H) Flor estadio 15 I) Anteras F) Detalle del ápice. Escala en A,B,C,D,E,G,y H 1mm, escala en F e I 0.5mm.

Pese a la elevada similitud en los patrones de expresión de ambas construcciones se observaron pequeñas diferencias, así bZIP52.1 (Fig.R2.6) presentó expresión fuerte en el hipocótilo y se encontró ausente en el pedicelo de la hoja. Por el contrario, bZIP52.2 (Fig.R.2.7) presentó expresión débil en el hipocótilo y fuerte en pedicelo de la hoja.

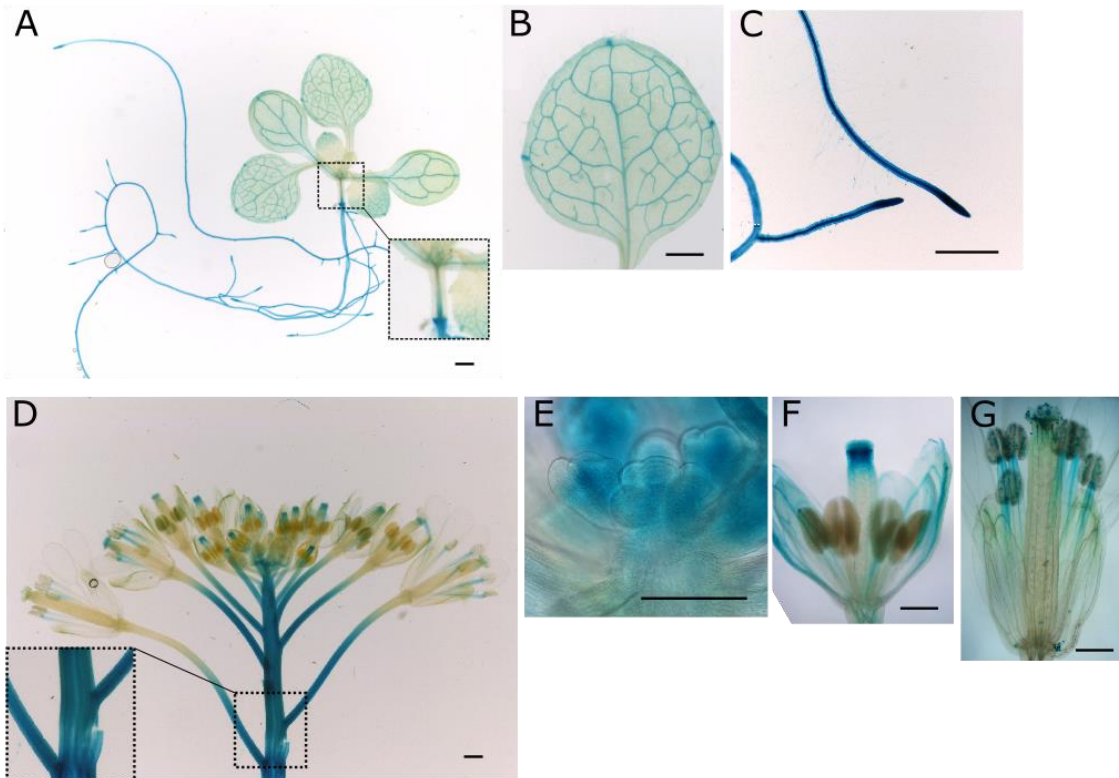


Figura R2.7. Patrón de expresión de la construcción reportera pbZIP52:gbZIP52.2 A-C) Expresión en plántulas de 10 días A) Plántula completa, en el recuadro de la parte inferior derecha detalle de la expresión en hipocotilo, B) Hoja C) Raíz. D-G) Expresión en tallo y ápices de inflorescencia. D) Ápice F) Flor en antesis G) Flor estadio 15 E) Detalle del ápice. Escala en A,B,C,D,E,G, H 1mm, escala en E 0.5mm.

El análisis de las líneas reporteras para bZIP59 mostró también un patrón de expresión ubicuo en la mayoría de los tejidos de la planta en los distintos momentos del desarrollo, destacando de nuevo la expresión fuerte en la vasculatura de hojas y raíces en plántulas, así como en la vasculatura del tallo de la inflorescencia, y en el meristemo (Fig.R2.8). También se observó expresión en los órganos florales, sépalos y pétalos, así como en la parte apical del carpelo, estigma y estilo, aunque la señal era más débil que en el caso de bZIP52.

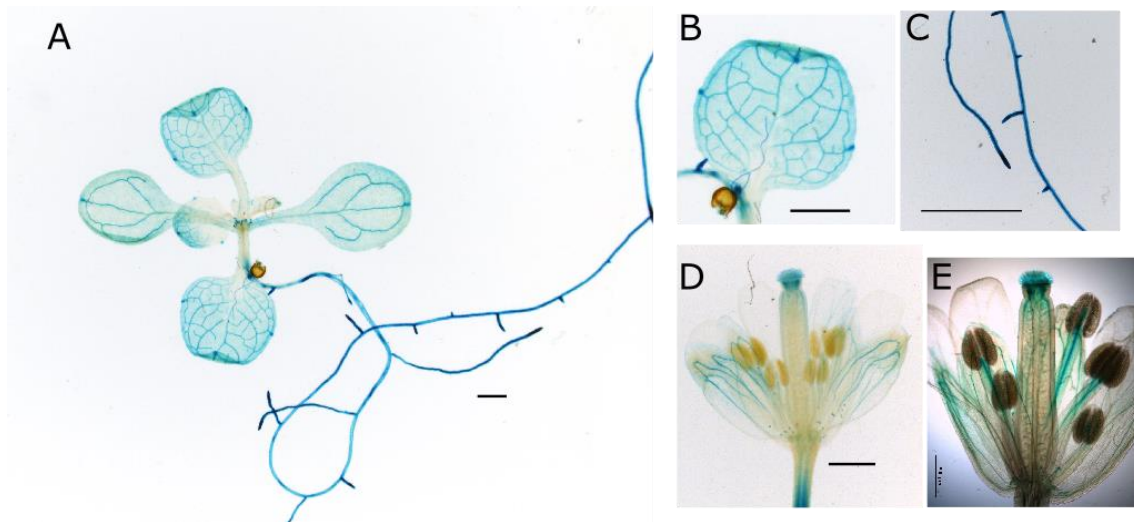


Figura R2.8. Patrón de expresión de la construcción reportera pbZIP59:gbZIP59 A-C) Expresión en plántulas de 10 días A) Plántula completa B) Hoja C) Raíz. D-E) Expresión en flores D) Flor en antésis E) Flor estadio 15 Escala 1mm.

En resumen, todos estos resultados indican que tanto bZIP52 como bZIP59 se expresan en la mayoría de los órganos de la planta en todos los estadios de desarrollo, sugiriendo que puedan actuar en diferentes aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*. Ambos genes presentaron un patrón de expresión solapante con el patrón descrito anteriormente para TFL1, en el ápice y en la vasculatura del tallo de la inflorescencia, y para FT en la vasculatura de la hoja. Esto apoya la hipótesis de que tanto bZIP52 como bZIP59 puedan participar en el control de la floración mediante la formación de complejos proteicos con TFL1 y FT.

2.2.2. Estudio del patrón de expresión de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 mediante hibridación “*in situ*”

Los resultados obtenidos del estudio de las líneas reporteras genómicas pbZIP:gbZIP-GUS sugieren que tanto bZIP52 como bZIP59 podrían participar en el desarrollo de *Arabidopsis* formando un complejo proteico con TFL1 en el ápice, o en la vasculatura del tallo y/o con FT en la vasculatura de la hoja. El ensayo de actividad GUS nos informa sobre los tejidos en los que se localiza la proteína de fusión bZIP-GUS, pudiendo ser algo distintos a los dominios de expresión del gen. Por otro lado, la región 5' intergénica utilizada como promotor en la construcción pbZIP30:gbZIP30 resultó no ser suficiente para dirigir la expresión del gen, por lo que no disponíamos de ningún dato de expresión para bZIP30. Es por ello que decidimos complementar los resultados obtenidos con las líneas reporteras gbZIP-GUS, con un análisis de la expresión de los genes *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59* mediante hibridación *in situ*.

Para ello, se diseñaron sondas específicas para cada uno de los tres genes, evitando regiones conservadas entre ellos y con otros bZIP. Las sondas se hibridaron sobre secciones de

ápices vegetativos (plántulas de 15 días) e inflorescentes (5-7 días tras bolting). Como control negativo se emplearon sondas "sentido" incapaces de hibridar con el mRNA del gen.

La expresión de *bZIP30* en ápices vegetativos resultó bastante generalizada, destacando una señal fuerte en los primordios foliares y hojas jóvenes, los haces vasculares y algo más débil en el meristemo apical (Fig.R2.9. A). Por lo que respecta a los ápices inflorescentes, se observó expresión de *bZIP30* fundamentalmente en los primordios florales y en el meristemo apical (Fig.R2.9. D). Por su parte, *bZIP52* presentó una expresión bastante generalizada en los diferentes tejidos del ápice vegetativo, siendo especialmente fuerte la expresión en los primordios foliares, las hojas jóvenes, la vasculatura del tallo y las hojas. Asimismo, también se observó expresión extendida en el meristemo apical (Fig.R2.9. B). En el ápice inflorescente la expresión de *bZIP52* se observó sobre todo en las capas externas del meristemo apical y en los primordios florales (Fig.R2.9. E). En ninguno de los casos se apreció señal o fondo en las muestras control de ápices vegetativos e inflorescentes hibridadas con las sondas "sentido" para ninguno de los dos genes (Fig. R2.9, C y F).

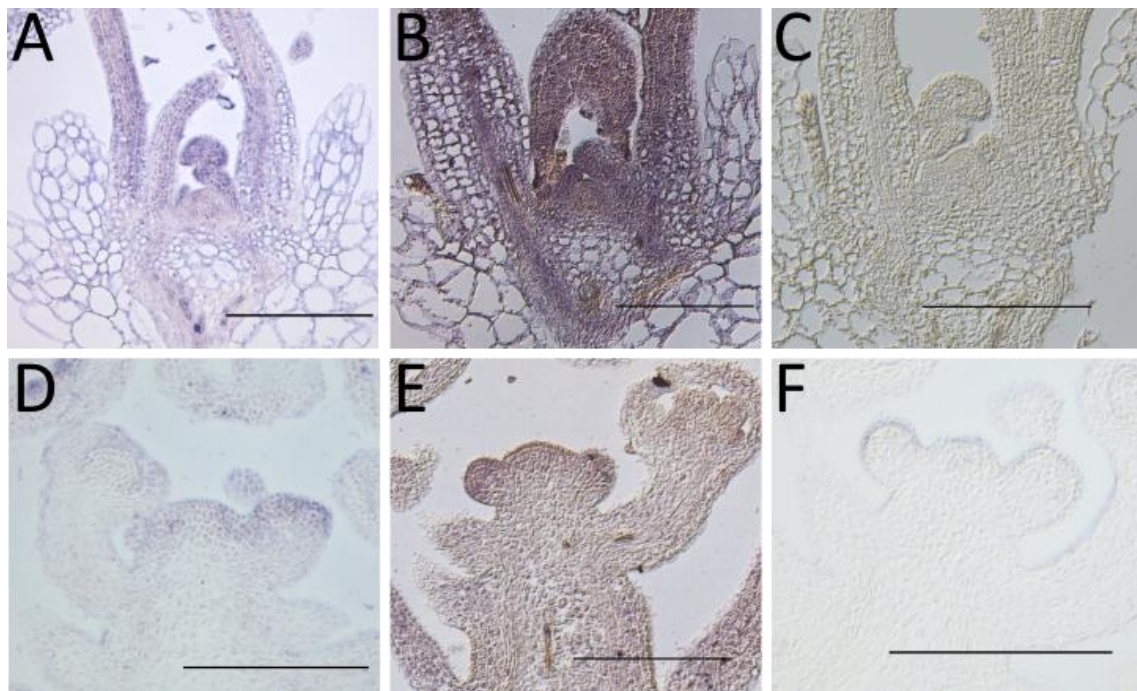


Figura R2.9 Análisis de la expresión de bZIP30 y de bZIP52 mediante hibridación in situ A) Expresión del mRNA de *bZIP30* en ápices vegetativos, expresión uniforme en hojas y primordios foliares, haces vasculares y meristemo apical. D) Expresión de *bZIP30* en ápices inflorescentes, se observa expresión en los primordios de las flores, y en el meristemo apical B) Expresión de *bZIP52* en ápices vegetativos, se observa expresión en primordios foliares y hojas, meristemo apical y haces vasculares. E) Expresión de *bZIP52* en ápices inflorescentes, se observa expresión sobre todo en primordios florales, y capas externas del meristemo apical. C y F) Controles negativos, correspondientes a la hibridación de las sondas "sentido" de *bZIP30*, C, y *bZIP52*, F, sobre ápice inflorescente y vegetativo respectivamente, no se observa hibridación de la sonda en ninguno de los casos. Escala 100μm.

Estos resultados, junto con los obtenidos con las líneas reporteras genómicas *bZIP-GUS*, están de acuerdo con la hipótesis de que las proteínas *bZIP30*, *bZIP52* puedan formar un

complejo con TFL1 en los meristemos del tallo y/o en la vasculatura del tallo de la inflorescencia. El patrón de expresión de estos genes, en general ubicuo en la mayor parte de los tejidos en distintos estadios de desarrollo de la planta, sugiere además que estos factores de transcripción junto con bZIP59 podrían participar en diferentes procesos del desarrollo, quizás interactuando con diferentes proteínas. Además, el hecho de que los patrones de expresión de estos genes sean altamente solapantes sugiere que podrían actuar de forma redundante entre ellos, siendo ésta una característica frecuente en las familias génicas grandes como, por ejemplo, la de los factores de transcripción de tipo bZIP o TCP (Kafri et al., 2009).

2.3. Análisis de la localización subcelular de bZIP30, bZIP52 y bZIP59

Los factores de transcripción se caracterizan por poseer un dominio de unión al DNA y generalmente se encuentran presentes en el núcleo, dónde se unen a sus genes diana para activar o reprimir su expresión. Sin embargo, se ha descrito que algunos factores como el bZIP de grupo-I VIP1 (bZIP51) se encuentran presente tanto en núcleo como en citoplasma. Dado que bZIP30, bZIP52 y bZIP59 son bZIPs del grupo-I, al igual que VIP1, cabría pensar que también puedan tener una localización no exclusivamente nuclear, relacionada con su función. Por ello, decidimos estudiar la localización subcelular de estas proteínas mediante estudios de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Para ello se generaron construcciones en las que se fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) a la región N-terminal de la región codificante de cada bZIP, expresadas bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Para estudiar la localización de las proteínas de fusión GFP-bZIP, se agoinfiltraron hojas de *N. benthamiana* con cada una de las construcciones y, transcurridos tres días tras la infección, las hojas infiltradas se observaron al microscopio confocal. En todos los casos, las proteínas de fusión, GFP-bZIP30, GFP-bZIP52 y GFP-bZIP59 localizaron tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig.R2.10).

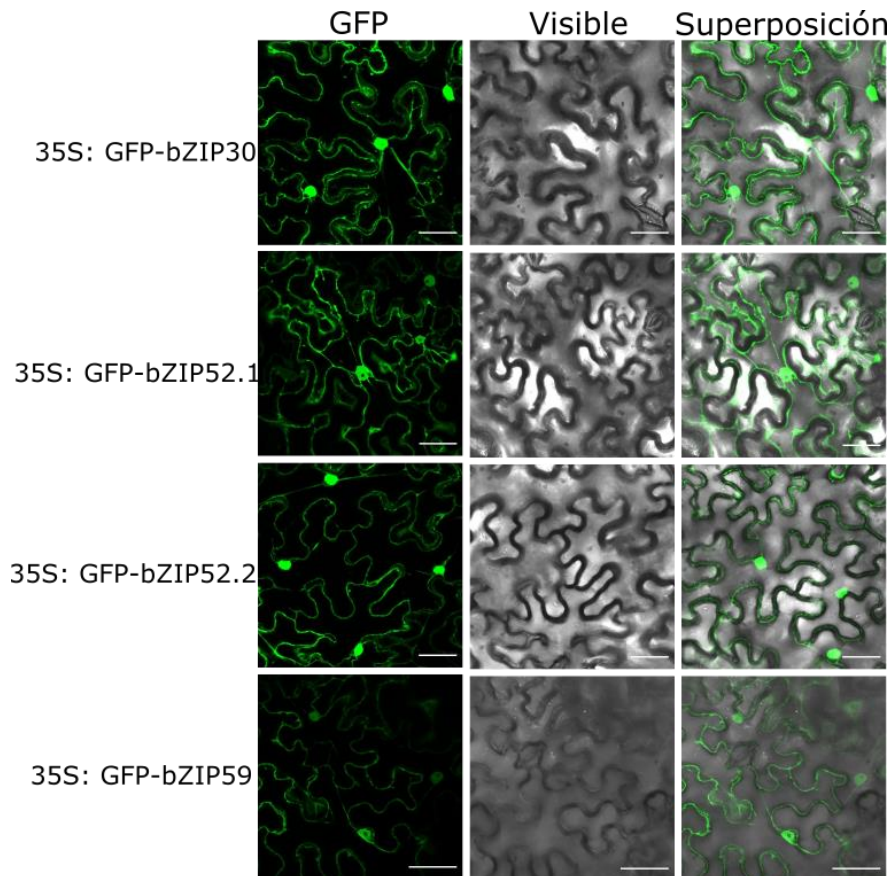


Figura R2.10. Localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-bZIP30, GFP-bZIP52.1, GFP-bZIP52.2 y GFP-bZIP59. Imágenes de microscopio confocal de la epidermis del envés de las hojas de *N. benthamiana* transformadas con las construcciones indicadas a la izquierda. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

Pese a que la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* supone una forma rápida y sencilla de observar la localización de la correspondiente a la proteína de fusión resultante de una construcción como las nuestras, 35S:GFP-bZIP, es posible que en *Arabidopsis* la proteína esté sujeta a modificaciones post-traduccionales distintas a las que puedan tener lugar en *N. benthamiana*, de modo que la localización observada en este sistema podría diferir en parte de la que la proteína tiene en la planta nativa. Por esto, estimamos conveniente la obtención de líneas transgénicas estables que expresaran estas mismas construcciones en un fondo silvestre *Arabidopsis* Col-0. Se observaron al microscopio confocal hojas y raíces de 2 líneas homocigotas T3 independientes para cada una de las construcciones 35S:GFP-bZIP30, 35S:GFP-bZIP52.1, 35S:GFP-bZIP52.2 y 35S:GFP-bZIP59. A diferencia de los ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, en *Arabidopsis* las proteínas de fusión GFP-bZIP30, GFP-bZIP52.1, GFP-bZIP52.2 y GFP-bZIP59 se localizaron mayoritariamente en el citoplasma (Fig. R2.11). No obstante, el nivel de expresión de las transgénicas estables fue sensiblemente más bajo que el observado en los ensayos de expresión transitoria.

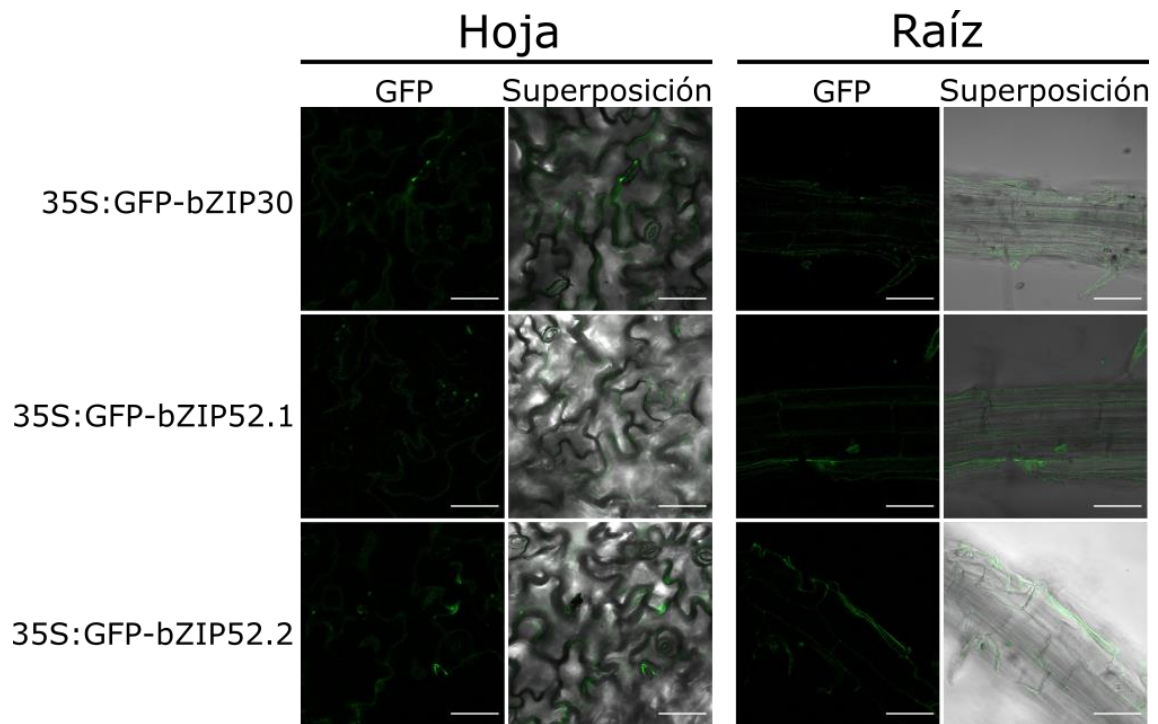


Figura R2.11. Localización subcelular de las proteínas de fusión GFP-bZIP30, GFP-bZIP52.1, GFP-bZIP52.2, GFP-bZIP59. Imágenes de microscopio confocal de la epidermis del envés de hojas y raíces de líneas transgénicas T3 de *Arabidopsis*. Las barras de escala corresponden a 10 μ m.

Teniendo en cuenta los resultados observados en los ensayos de expresión transitoria y los resultados obtenidos con las transgénicas estables no podemos establecer de manera definitiva una localización subcelular para bZIP30, bZIP52.1, bZIP52.2 y bZIP59, por lo que una posibilidad sería que estas proteínas puedan localizarse tanto en núcleo como en citoplasma y su localización varíe en respuesta a diferentes estímulos internos y/o externos, tal y como ya se ha descrito para otros bZIPs del grupo-I como bZIP51, y bZIP18 (Tsugama *et al.* 2014, 2016; Pawar *et al.* 2016).

2.4 Caracterización del fenotipo asociado a la pérdida de función de *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59*

2.4.1 Identificación y análisis de los mutantes simples

Se ha descrito que los bZIP del grupo-I participan en diferentes procesos, como la respuesta a los estímulos mecánicos (e.g., tacto) o al estrés osmótico, el crecimiento de la raíz y la hoja, el desarrollo del carpelo, y del gametofito masculino (Tsugama et al., 2012; Gibalová et al., 2016; Van Leene et al., 2016; Lozano-Sotomayor et al., 2016; Tsugama et al., 2016) No obstante, el conocimiento que se tiene hasta la fecha sobre su modo de acción y sobre su posible papel en el control del desarrollo y la arquitectura de *Arabidopsis* todavía es muy escaso. Es por ello que decidimos profundizar en el estudio de la función de los bZIPs del grupo-I, bZIP30, bZIP52, interactores de FT y TFL1 y bZIP59, interactor de FT, mediante el análisis fenotípico de sus mutantes de pérdida de función. Dado que se ha descrito redundancia funcional para algunos bZIPs del grupo-I, decidimos estudiar además los bZIPs más cercanos filogenéticamente a ellos, bZIP18, bZIP29 y bZIP69.

Para ello, se identificaron y obtuvieron, de colecciones públicas, diferentes líneas mutantes por inserción de T-DNA de cada uno de estos bZIPs (Fig.R2.12 A). Las semillas de las distintas líneas se sembraron en condiciones de día largo y se comprobó la presencia del transgén mediante PCR con cebadores específicos (Tabla S1), seleccionándose en todos los casos las plantas que portaban la inserción en homocigosis.

Seguidamente, se analizó el nivel de expresión de los correspondientes bZIPs en los mutantes homocigotos mediante RT-qPCR de plántulas de 10 días. Para el análisis de las diferentes líneas de inserción de T-DNA se diseñaron oligos específicos ubicados en el cDNA del gen aguas abajo de la inserción. En la mayoría de las líneas que contenían la inserción de T-DNA en la región 5'UTR o en el promotor no se redujo significativamente el nivel de expresión del mRNA, a excepción de las líneas mutantes *bzip18*, SK_110712, y GK-641D12, en las que se observó una reducción de aproximadamente el 80% del nivel de mRNA (Fig. R2.12 B). Por el contrario, en la mayor parte de las líneas que contenían inserciones de T-DNA en los exones, *bzip29* SK_065254, *bzip30* SK_003885, *bzip59* SK_024459 sí se redujo significativamente el nivel de expresión de los genes, por lo que decidimos continuar trabajando solamente con estas líneas (Fig. R2.12). En el caso de las líneas mutantes *bzip52* GK-457B12 y *bzip69* SAIL1211H04 también se decidió seguir trabajando con las mismas, pese a que no presentaban reducción en los niveles de mRNA, ya que no se consiguió amplificar en ningún caso el mRNA completo a partir de cDNA, por lo que posiblemente los niveles detectados en la qRT-PCR correspondían a mensajeros truncados, que generen proteínas truncadas que posiblemente no conserven su funcionalidad.

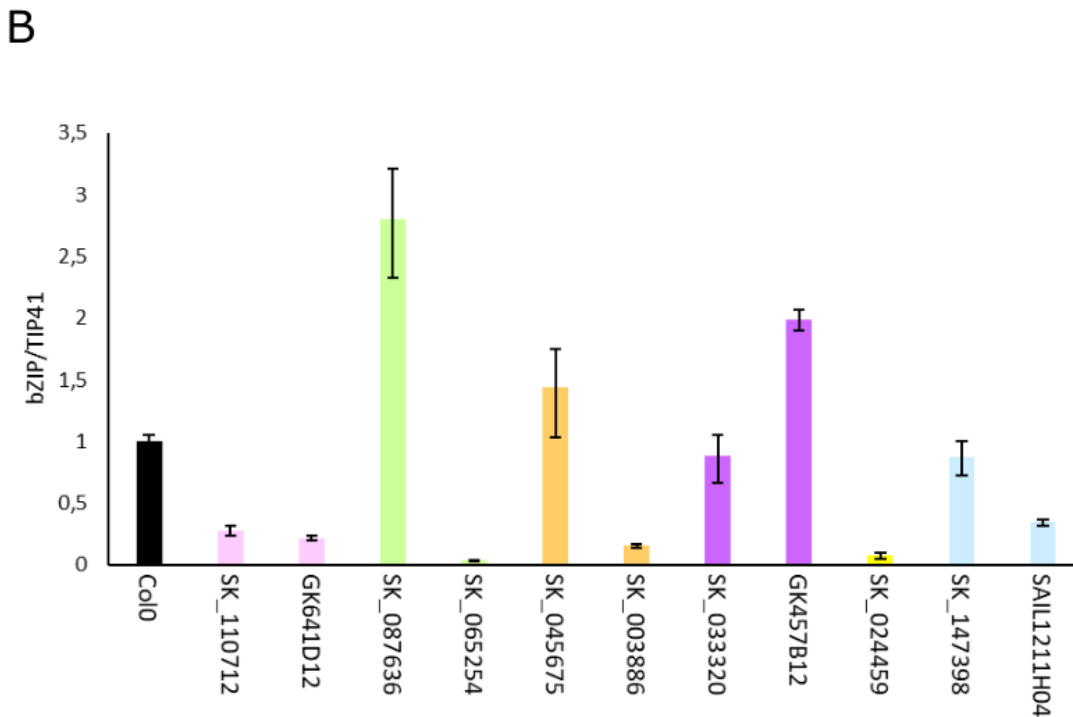
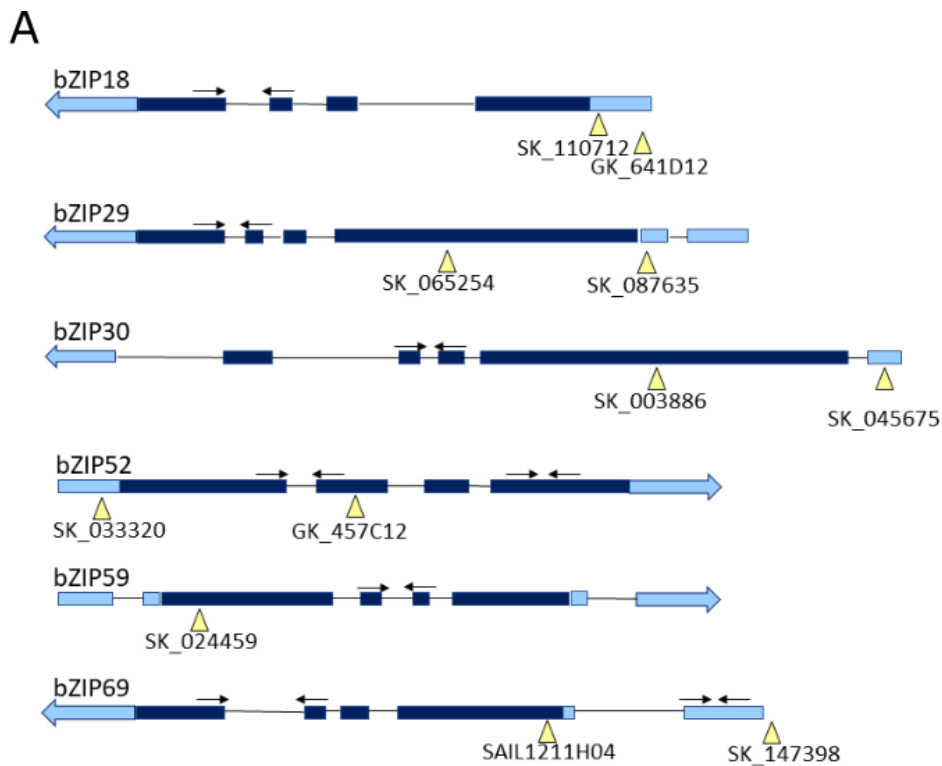


Figura R2.12. Líneas mutantes de inserción de T-DNA analizadas para cada uno de los bZIPs. A) Esquema de los genes y las inserciones. Las flechas amarillas indican la posición de cada una de las inserciones de T-DNA en los genes de cada uno de los bZIPs. En los bZIPs con más de una forma de *splicing* se representa siempre la forma de *splicing* 1. Las flechas negras indican las parejas de cebadores utilizadas para la cuantificación por RT-qPCR de los niveles de expresión B) Niveles de expresión de las líneas mutantes por inserción de T-DNA para cada uno de los bZIPs. Se muestra el nivel de expresión relativo con respecto a la expresión del gen en el silvestre Col-0. Los niveles de expresión se midieron mediante RT-qPCR a partir de muestras de plántulas de 10 días crecidas en condiciones de LD. Se muestra la media de los resultados de 3 réplicas biológicas, las barras de error representan el Error Standard (ES).

Para caracterizar fenotípicamente cada uno de los mutantes, se sembraron un mínimo de 25 plantas en condiciones de fotoperiodo de día largo y de día corto y se analizó el tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor (Fig.R2.13). Asimismo, se buscó la presencia de alteraciones fenotípicas asociadas a la pérdida de función de los genes. Sin embargo, no se pudo observar ninguna diferencia fenotípica con el parental silvestre Col-0, a excepción de la línea mutante *bzip69* SAIL1211H04, que se describirá posteriormente en el apartado 2.4.2.

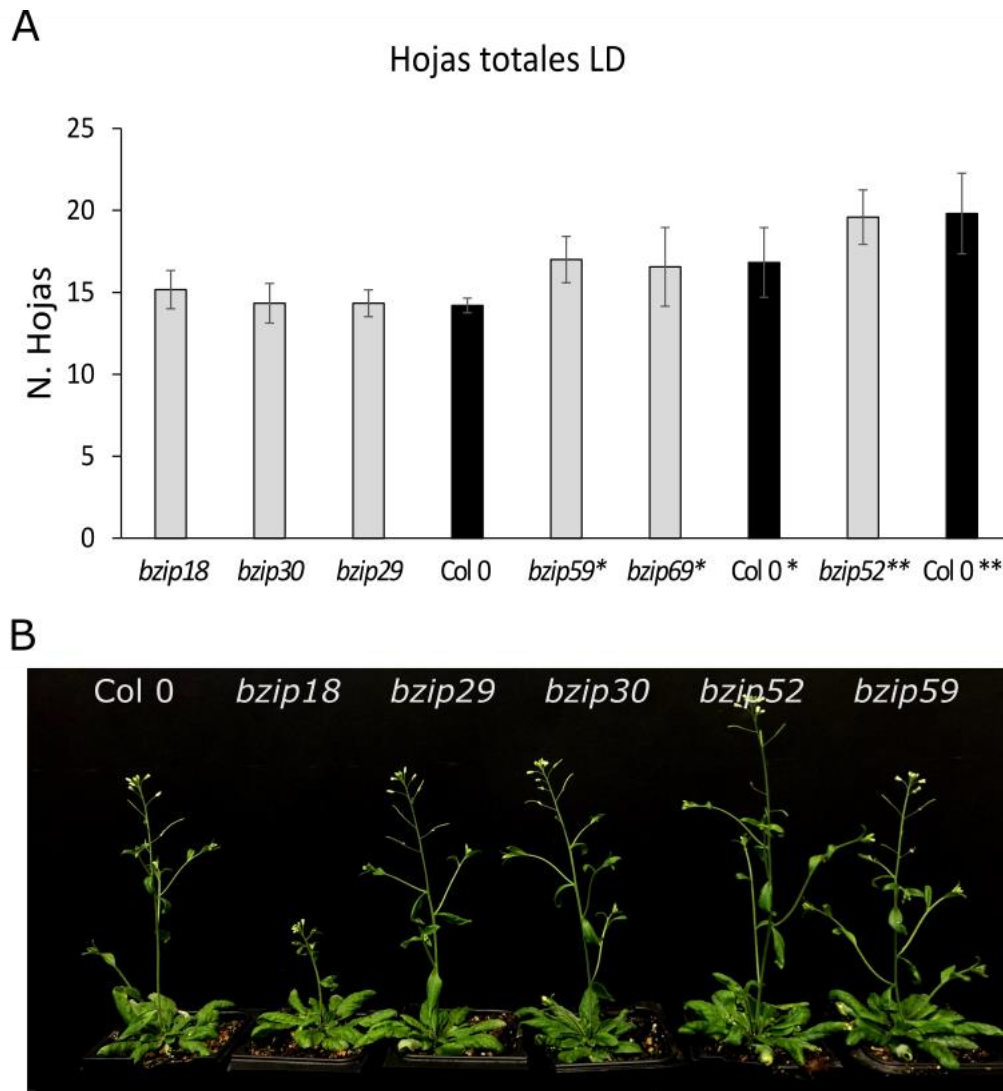


Figura R2.13. Fenotipo asociado a los mutantes simples por inserción de T-DNA en condiciones de fotoperiodo de día largo. A) Tiempo de floración medido como el número de hojas total producidas por el tallo principal. Los mutantes se analizaron en 3 experimentos independientes, Experimento1, experimento2*, experimento3**, por lo que cada uno se representa junto con el control silvestre correspondiente. Se representa la media aritmética del número de hojas totales producidas ($n \geq 15$). Las barras de error representan la desviación estándar. B) Imagen de los mutantes simples tras 4 semanas creciendo en día largo.

2.4.2 Caracterización del mutante *bzip69* SAIL1211H04

La proteína bZIP69 fue la única para la que no observamos ningún tipo de interacción con TFL1 o FT, tanto en los ensayos de BiFC como en doble híbrido en levadura. Sin embargo, bZIP69 es el gen filogenéticamente más cercano a bZIP59 que sí mostró interacción fuerte con FT, y conforma junto con bZIP30, bZIP18, bZIP29, bZIP52 y bZIP59 un pequeño subclado dentro de los bZIPs del grupo-I (Fig.R2.1). Es por ello que decidimos estudiar el fenotipo asociado su pérdida de función. Para ello, identificamos en las bases de datos el mutante por inserción de T-DNA SAIL1211H04, en adelante *bzip69-1*. Para caracterizar este mutante, sembramos 25 plantas homocigotas portadoras de la inserción de T-DNA en condiciones de fotoperiodo de día largo y día corto, y caracterizamos el fenotipo del mutante a nivel morfológico, así como el tiempo de floración, medido como el número de hojas producidas por el tallo principal.

Los mutantes homocigotos *bzip69-1* se caracterizaron por la fasciación del tallo (Fig.R2.14 A) y por mostrar defectos severos en la formación de los órganos laterales como flores deformes en las que los órganos de un mismo verticilo aparecían fusionados y hojas de roseta con deformaciones en sus márgenes (Fig.R2.14, C), siendo estas especialmente severas a partir de la hoja 7-8, pudiendo coincidir con la etapa adulta del desarrollo vegetativo. Asimismo, los mutantes homocigotos *bzip69-1* mostraron esterilidad parcial, probablemente causada por las deformaciones en los órganos florales que posiblemente dificulta la correcta entrada del polen en el pistilo, aunque los óvulos y el polen mantenían su viabilidad. Por otra parte, no se apreciaron diferencias significativas en el tiempo de floración en día largo o día corto (Fig.R2.14, B).

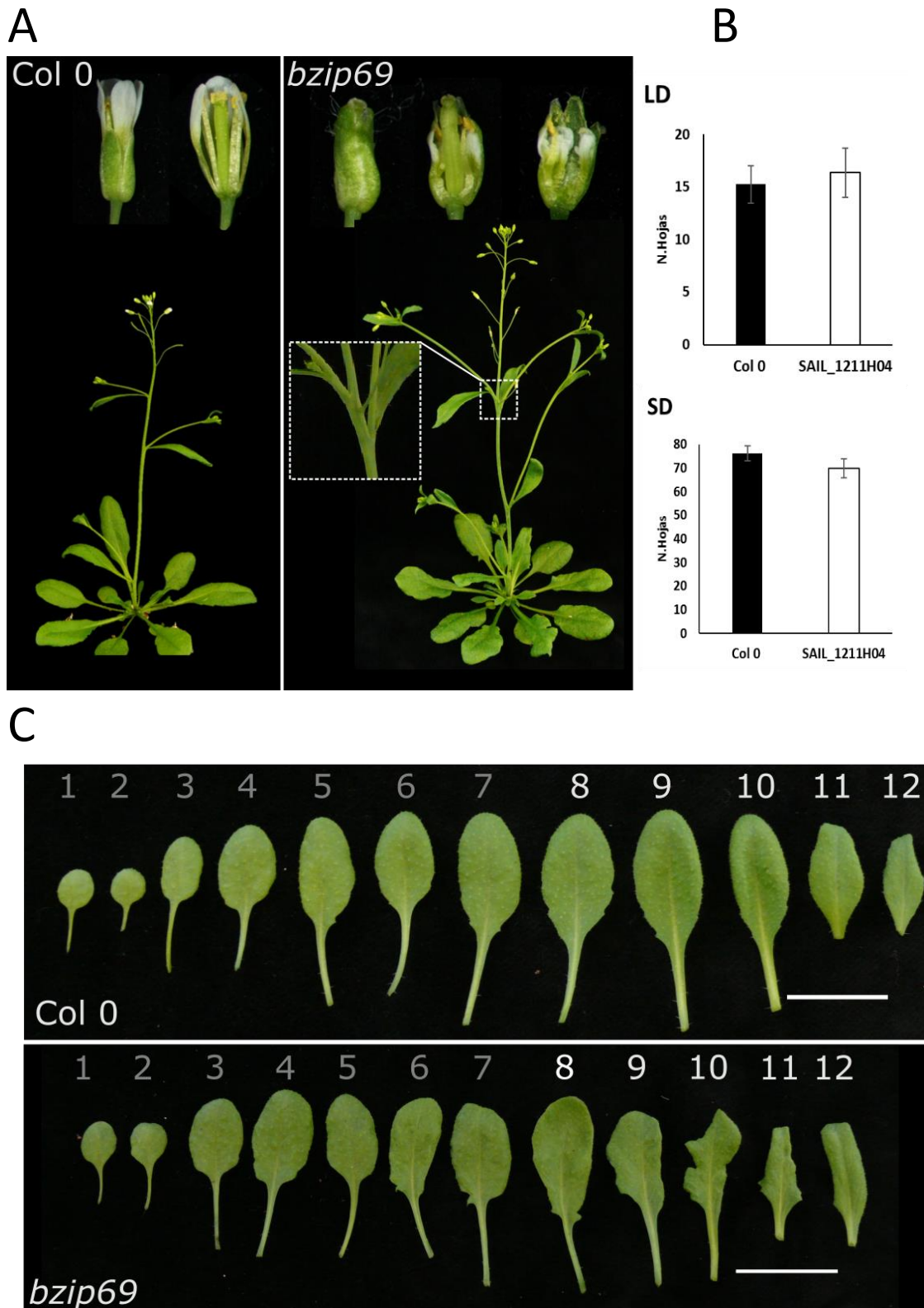


Figura R2.14. Alteraciones fenotípicas asociadas a la línea de inserción de T-DNA *bzip69-1*. A) Plantas de 6 semanas crecidas en día largo. En la parte superior se muestra detalle de flor en antesis en el que se aprecian las deformaciones en el mutante *bzip69-1*. El recuadro blanco muestra detalle de la fasciación de la coflorescencia de la línea *bzip69-1* y del parental silvestre Col-0 en día largo (LD) y día corto (SD). B) Tiempo de floración de la línea *bzip69-1* y del parental silvestre Col-0 en día largo (LD) y día corto (SD). Se representa la media aritmética del número total de hojas producidas hasta la primera flor. Las barras de error representan la desviación estándar ($n \geq 15$). C) Series de hojas de plantas crecidas en día largo. Se aprecian deformaciones en el borde de las hojas en las hojas 8-12 del mutante *bzip69*.

Con el fin de comprobar que el fenotipo observado se encontraba ligado a la presencia del T-DNA en el primer exón de la región genómica de *bZIP69*, realizamos cruces con el parental silvestre Col 0, y analizamos la proporción de descendientes F2 que mostraban el fenotipo teniendo en cuenta que éste solamente aparecía en las plantas que presentan la inserción en homocigosis. Para ello, se fenotiparon y posteriormente se genotiparon para la presencia de la inserción de T-DNA mediante PCR con cebadores específicos un total de 75 plantas. Tal y como esperábamos, el 100% de plantas homocigotas recuperadas en la F2 presentaron el fenotipo descrito en las hojas y flores, mientras que no se encontró en ningún caso plantas con ese fenotipo entre las plantas que no mostraban la inserción en *bZIP69* o presentaban la inserción en heterocigosis. Los resultados de este experimento indican que la inserción de T-DNA es la responsable de descritas para la línea *bzip69-1*.

Hasta el momento no se ha reportado ninguna función para bZIP69 en Arabidopsis, ni se ha encontrado ningún tipo de interacción proteína-proteína con FT o TFL1. Sin embargo, las alteraciones fenotípicas asociadas al mutante *bzip69-1* sugieren que podría desempeñar un papel en algunos aspectos del desarrollo de Arabidopsis como la formación de los órganos laterales (hojas, flores), es por ello que decidimos investigar más en profundidad esta línea mutante. Para obtener una visión general de las rutas genéticas alteradas en el mutante *bzip69-1* con respecto al parental Col-0, realizamos un análisis transcriptómico, mediante RNA-Seq, en plántulas de 10 días cultivadas en día largo, en el que comparamos el transcriptoma del mutante con respecto al del control silvestre. Como resultado de este análisis se obtuvieron un total de 477 genes diferencialmente expresados en el mutante *bzip69-1* con respecto a Col-0, 310 genes cuya expresión aumenta en el mutante *bzip69-1* y 167 cuya expresión se reduce. El análisis de enriquecimiento de términos GO (AgriGO) reveló que los genes diferencialmente expresados en el mutante con respecto al silvestre se agrupaban en unas pocas categorías funcionales como la respuesta a estrés biótico y abiótico, desarrollo de la vasculatura, o regulación del crecimiento (Fig.R2.15, A y B).

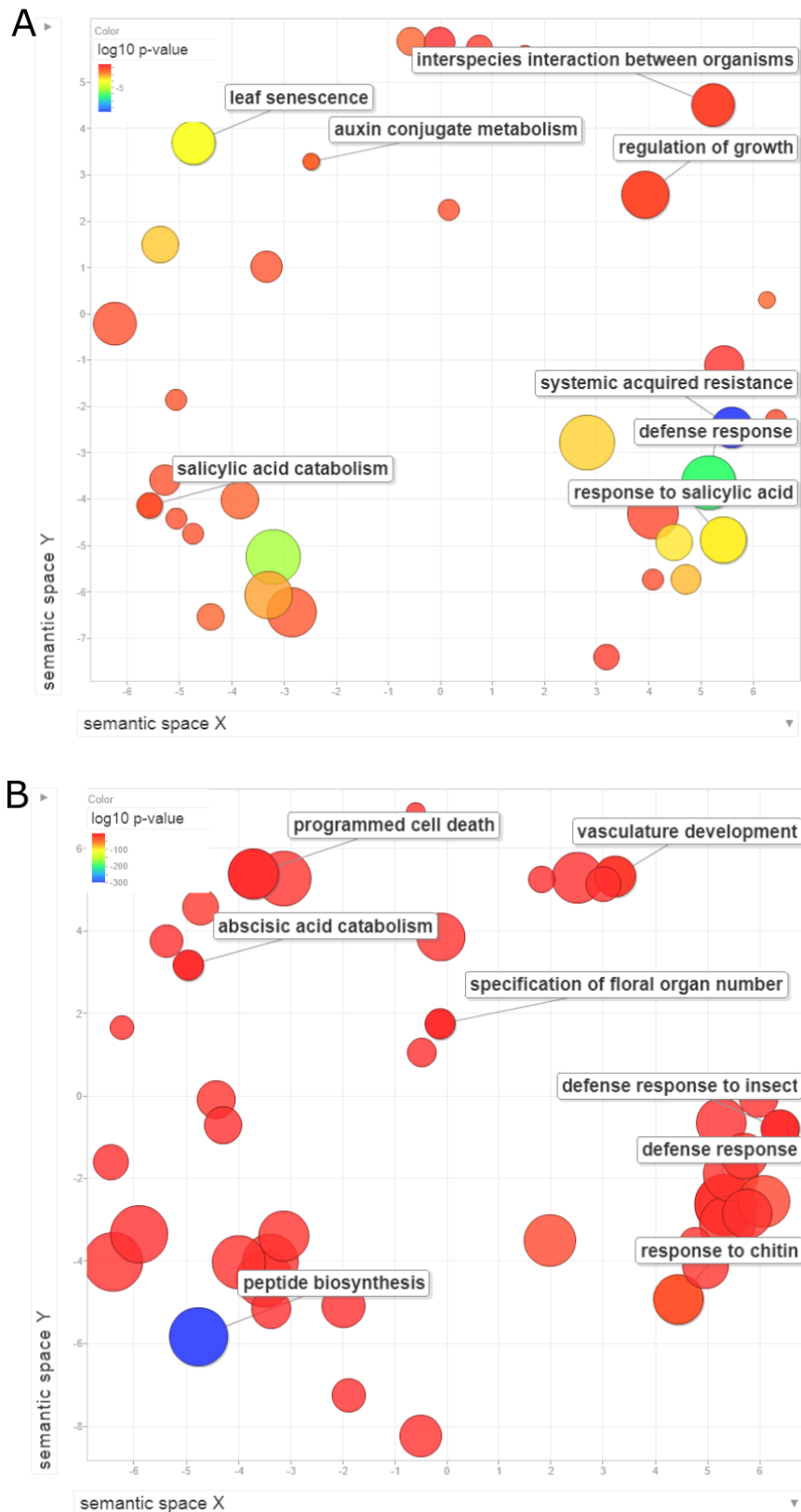


Figura R2.15 Términos GO enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados del mutante *BZIP69-1* con respecto a *Col 0*. A) Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión baja en el mutante *bZIP69-1* B) Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión sube en el mutante *bZIP69-1*. El diagrama de dispersión muestra los términos GO más representativos del clúster en un espacio bidimensional derivado de la aplicación de la escala multidimensional a una matriz de similitudes semánticas de los términos GO. Los colores de las burbujas representan el logaritmo del p-Valor de los términos GO en el análisis y el tamaño de las burbujas indica la representación del término GO en la base de datos utilizada, las etiquetas indican función molecular.

Entre los términos GO más sobrerrepresentados en nuestro RNA-Seq encontramos categorías relacionadas con la respuesta al estrés biótico, y más concretamente con la respuesta a ácido Jasmónico y ácido Salicílico, ambas, hormonas esenciales en la respuesta a patógenos y cuyas rutas metabólicas se encuentran estrechamente conectadas (Spoel et al., 2007; Thaler et al., 2012).

Con el fin de profundizar más en el posible papel de bZIP69 en la respuesta a estrés biótico decidimos analizar la susceptibilidad del mutante *bzip69-1* y de dos líneas sobreexpresoras bZIP69 a la bacteria *Pseudomonas syringae*, así como el papel de las rutas del ácido salicílico en dicha resistencia. Para ello, generamos en primer lugar líneas de sobreexpresión de bZIP69, mediante la transformación de plantas Col-0 con una construcción que contenía la región codificante del gen bZIP69 bajo el control de un doble promotor 35S. Seguidamente, se aislaron tres líneas independientes de una sola copia, homocigotas para el transgén, #1.2, #7.2 y #20.1 (Fig.R2.16 A). Dichas líneas se cultivaron junto con el silvestre Col-0 y el mutante *bzip69-1* en condiciones de día corto durante 28 días, momento en el que se infectaron con la bacteria *Pseudomonas syringae*, crecida a una OD₆₀₀ de 0,05. Transcurridos tres días tras la infección se procedió a extraer y cuantificar la cantidad de unidades formadoras de colonias presentes en las hojas infiltradas tal y como se describe en Tornero and Dangl (2001). No se pudieron encontrar diferencias significativas en la susceptibilidad de las líneas de sobreexpresión o del mutante *bzip69-1* a la bacteria (Fig.R2.16 B).

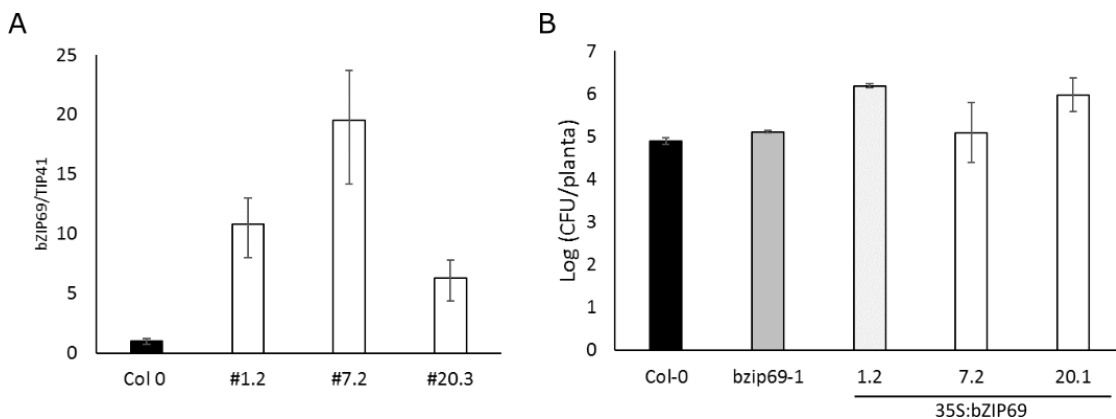


Figura R2.16 Resistencia a *Pseudomonas syringae* de los genotipos 35S:bZIP69 y *bzip69-1*. A) Nivel de expresión relativa de *bZIP69*, con respecto al parental silvestre Col-0, de 3 líneas independientes 35S:bZIP69, #1.2, #7.2 y #20.3. B) Crecimiento de la bacteria *P.syringae* en hojas de los genotipos señalados. En todos los casos se muestra el promedio de los valores de tres medidas independientes. El experimento se repitió tres veces con similares resultados. No se observan diferencias significativas entre la resistencia de los genotipos 35S:bZIP69 y *bzip69-1* con respecto al silvestre Col 0. Nivel de significatividad analizado con t-test ($p \geq 0.05$).

2.4.3 Generación de nuevos alelos mutantes de *bZIP52* y *bZIP69* mediante CRISPR-Cas9

Entre los mutantes de los seis bZIPs de grupo-I analizados en este estudio el único que mostró un fenotipo evidente fue *bzip69-1*. Sin embargo, los análisis de expresión, mediante RT-qPCR, de los mRNA de los distintos genes en cada mutante mostraron que, si bien la inserción de T-DNA impedía la síntesis de mensajeros completos funcionales, en el caso de los mutantes *bzip52-1* y *bzip69-1* sí que se seguía produciendo una forma incompleta del mensajero (Fig. R2.17, C) que podría estar traduciéndose en una proteína truncada quizás capaz de conservar parte de su función o de unirse a las mismas dianas que la proteína nativa interfiriendo con la función de otras proteínas que actúen redundantemente con ellas.

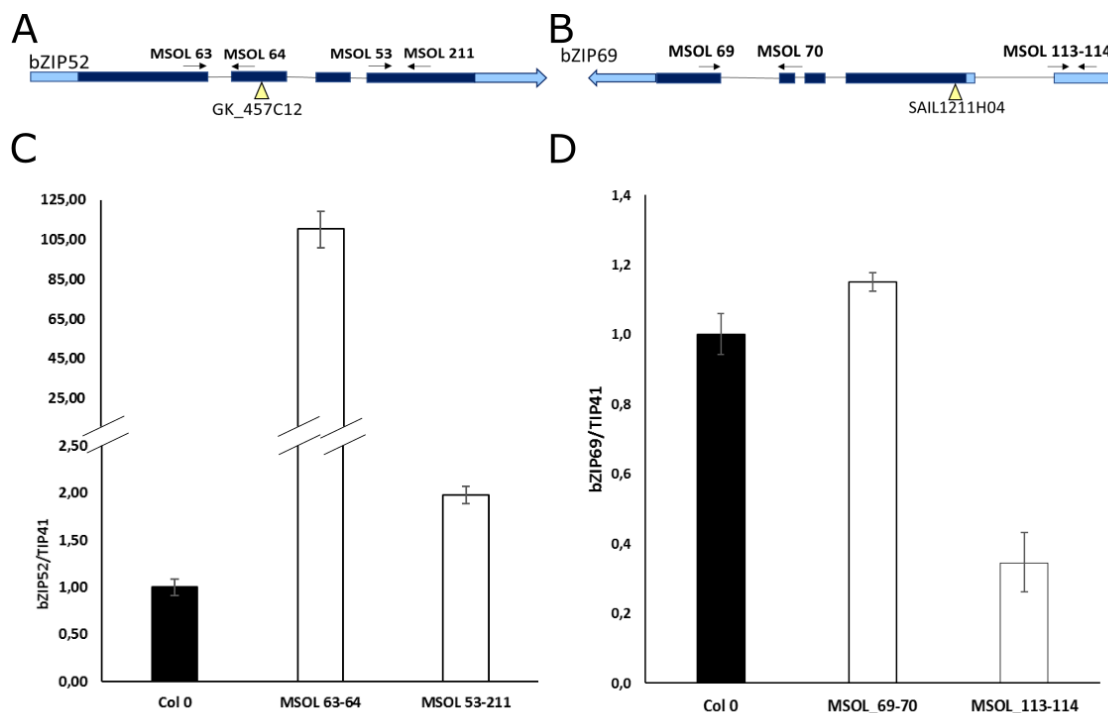


Figura 2.17. Expresión del mRNA de *bZIP52* y *bZIP69* en las líneas mutantes *bzip52-1* y *bzip69-1*. A) Esquema del gen *bZIP52*, la flecha amarilla marca la posición de la inserción de T-DNA correspondiente al alelo mutante *bzip52-1*. Las flechas negras marcan las posiciones de los oligos utilizados para la RT-qPCR. C) Resultado de la RT-qPCR de *bZIP52* con dos combinaciones distintas colocada antes y después de la inserción de T-DNA respectivamente. B) Esquema del gen *bZIP69*, la flecha amarilla marca la posición de la inserción de T-DNA correspondiente al alelo mutante *bzip69-1*. Las flechas negras marcan las posiciones de los oligos utilizados para la RT-qPCR. D) Resultado de la RT-qPCR para *bZIP69* con dos combinaciones distintas colocada antes y después de la inserción de T-DNA respectivamente.

Teniendo en cuenta las particularidades de los mutantes *bzip69-1* *bzip52-1*, y con el fin de discriminar cuáles de las alteraciones fenotípicas observadas en *bzip69-1* son debidos exclusivamente a la ausencia de bZIP69, decidimos estudiar un segundo alelo mutante para cada uno de los dos genes. Sin embargo, al no existir en las bases de datos más líneas de inserción de T-DNA en estos genes, decidimos generar nuevos alelos mutantes utilizando la tecnología CRISPR-Cas9. Para ello seguimos el protocolo descrito por Wang et al. (2015), y diseñamos dos

gRNAs que flanqueaban el dominio bZIP de bZIP69 y bZIP52, respectivamente, dominio principal de la proteína, esencial para la interacción con el DNA y/o la dimerización con otros bZIPs. Ambos gRNAs se clonaron en el vector binario pHEE401e bajo el control del promotor U6, este vector contiene además las secuencias necesarias para el correcto plegamiento del gRNA, y la Cas9 dirigida por el promotor EC1.2 específico para la célula huevo. Finalmente, este vector se agroinfiltró en plantas de *Arabidopsis Col-0* y también sobre el mutante simple *bzip30*, en el caso de la construcción para *bZIP52*. Las semillas transformantes T1 se seleccionaron mediante resistencia a Higromicina para a continuación seleccionar aquellas en las que se hubiera producido la deleción esperada mediante PCR con cebadores específicos. En el caso de *bZIP69* se obtuvieron un total de 3 plantas T1 que mostraban la deleción esperada, sin embargo, todas ellas resultaron ser quimeras que portaban la deleción en hojas pero no en flores, por lo que ésta no se heredó en la T2. En el caso de *bZIP52* se obtuvieron, tanto en fondo *Col-0* como en fondo mutante *bzip30*, 1 y 2 plantas, respectivamente, portadoras de una deleción del dominio bZIP completo heredable en T2; este nuevo alelo mutante se denominó *bzip52-2*.

Se analizó la presencia de fenotipos diferentes del del parental silvestre *Col-0* en la línea mutante *bzip52-2*, así como en el doble mutante *bzip52-2 bzip30*. Para ello, se sembraron un mínimo de 20 plantas de cada uno de los genotipos y del control *Col-0* en condiciones de fotoperiodo de día largo y se estudió la presencia de fenotipos diferentes del silvestre en la morfología, el desarrollo de los diferentes órganos vegetativos y florales o en la arquitectura de la planta; además, se analizó el tiempo de floración de ambas líneas. No se encontraron fenotipos diferentes del silvestre en cuanto a la morfología o el desarrollo de la planta, pero si se apreció un ligero retraso de la floración de aproximadamente 3 hojas en el mutante *bzip52-2* con respecto al parental silvestre (Fig. R2.18). Dicha diferencia se reducía significativamente en el caso del doble mutante *bzip52-2bzip30*.

En conjunto, los fenotipos encontrados en los diferentes mutantes *bzips* podrían apuntar hacia un posible papel de los bZIPs del grupo-I en diferentes procesos del desarrollo como la formación y el desarrollo de los órganos laterales, tal y como sugiere el fenotipo asociado al mutante *bzip69-1*, o el control de la floración tal y como sugiere el fenotipo tardío del mutante *bzip52-2*.

Del mismo modo, la sutileza de los fenotipos asociados a los diferentes mutantes simples analizados en este estudio, así como los descritos anteriormente en la literatura para *bzip30* en el tamaño del meristemo, y para *bzip18* en cuanto a la fertilidad del gametofito masculino (Gibalová et al., 2016; Lozano-Sotomayor et al., 2016), apuntan hacia una posible

redundancia funcional entre los bZIPs del grupo-I, por lo que es probable que sólo se aprecien fenotipos claros que permitan descifrar su función en mutantes múltiples de alto nivel.

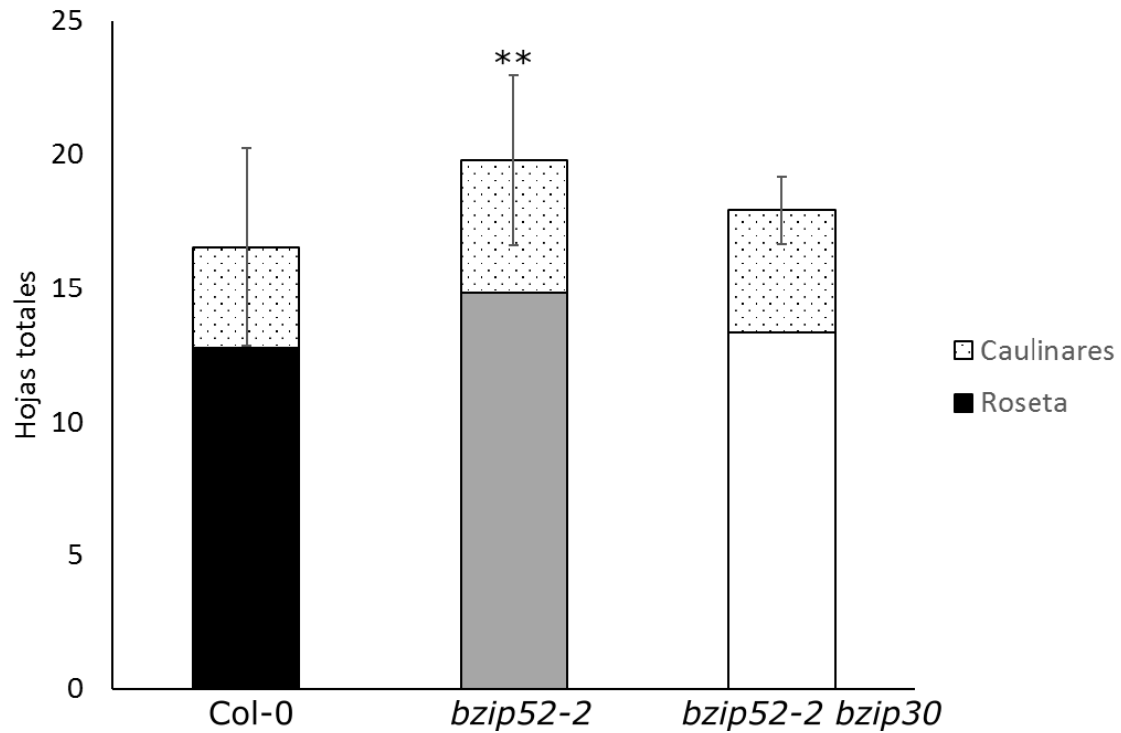


Figura 2.18. La línea mutante simple *bzip52-2* presenta floración tardía en día largo. A) Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la primera flor en condiciones de fotoperiodo de día largo de las líneas Col-0, *bzip52-2* y *bzip52-2bzip30*. En todas las líneas se contabilizaron un mínimo de 20 plantas. Nivel de significatividad se calculó utilizando la prueba de Tukey comparando con Col 0 $**p \geq 0.001$. Las barras de error representan la desviación estándar de las hojas totales.

2.5 Obtención y caracterización de líneas de cambio de función para *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59*

El análisis de los mutantes simples nos permitió asociar algunos fenotipos a la pérdida de función de algunos bZIPs del grupo I. Sin embargo, la sutileza de estos fenotipos sugiere la hipótesis de que los diferentes bZIPs del grupo I puedan actuar de forma redundante entre ellos. Un enfoque clásico para abordar el estudio funcional de familias multigénicas altamente redundantes es la obtención de mutantes múltiples, frecuentemente costosos de generar. Antes de abordar una estrategia compleja y costosa decidimos tratar de obtener una visión aproximada de los fenotipos asociados a un putativo mutante múltiple mediante el estudio de líneas del tipo “dominante negativo” para cada uno de los *bZIPs*: *bZIP30*, *bZIP52.1*, *bZIP52.2* y *bZIP59*. Para ello, se generaron tres construcciones en las cuales se fusionó la secuencia de 22 aminoácidos correspondiente al dominio de represión fuerte SRDX (Hiratsu et al., 2003) a la región C-terminal de la secuencia codificante de los genes *bZIP30*, *bZIP52.1*, *bZIP52.2* y *bZIP59*. Las cuatro secuencias bZIP-SRDX resultantes se subclonaron en el vector binario pMDC32, bajo el control de un doble promotor 35S. Las construcciones resultantes se utilizaron para transformar plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0. El dominio SRDX es un péptido de 12 aminoácidos (LDLDLELRGFA) que constituye un dominio de represión fuerte altamente conservado en los factores de transcripción de tipo ERF (*Ethylene-Responsive element-binding factor*) y TFIIIA (Hiratsu et al., 2003). Este dominio, cuando se fusiona a un factor de transcripción lo convierte en un represor fuerte, de modo que su sobreexpresión provoca la represión dominante de sus genes diana, aunque existan otros factores de transcripción de función activadora actuando sobre dichos genes. Esta aproximación puede permitir, por lo tanto, observar fenotipos relacionados con la alteración de la función del gen bajo estudio, pasando por alto los problemas de redundancia génica (Hiratsu et al., 2003).

2.5.1. Fenotipo asociado a las líneas dominantes negativas 35S: *bZIP30-SRDX*

Para analizar el fenotipo asociado a la modificación de la función de *bZIP30*, causado por la expresión constitutiva de *bZIP30-SRDX*, se realizó un primer análisis en una población de 90 plantas transgénicas T1, transformadas con la construcción 35S:*bZIP30-SRDX*, en el que se identificaron las alteraciones fenotípicas más representativas en comparación con el parental silvestre Col-0 (Fig.R2.19)

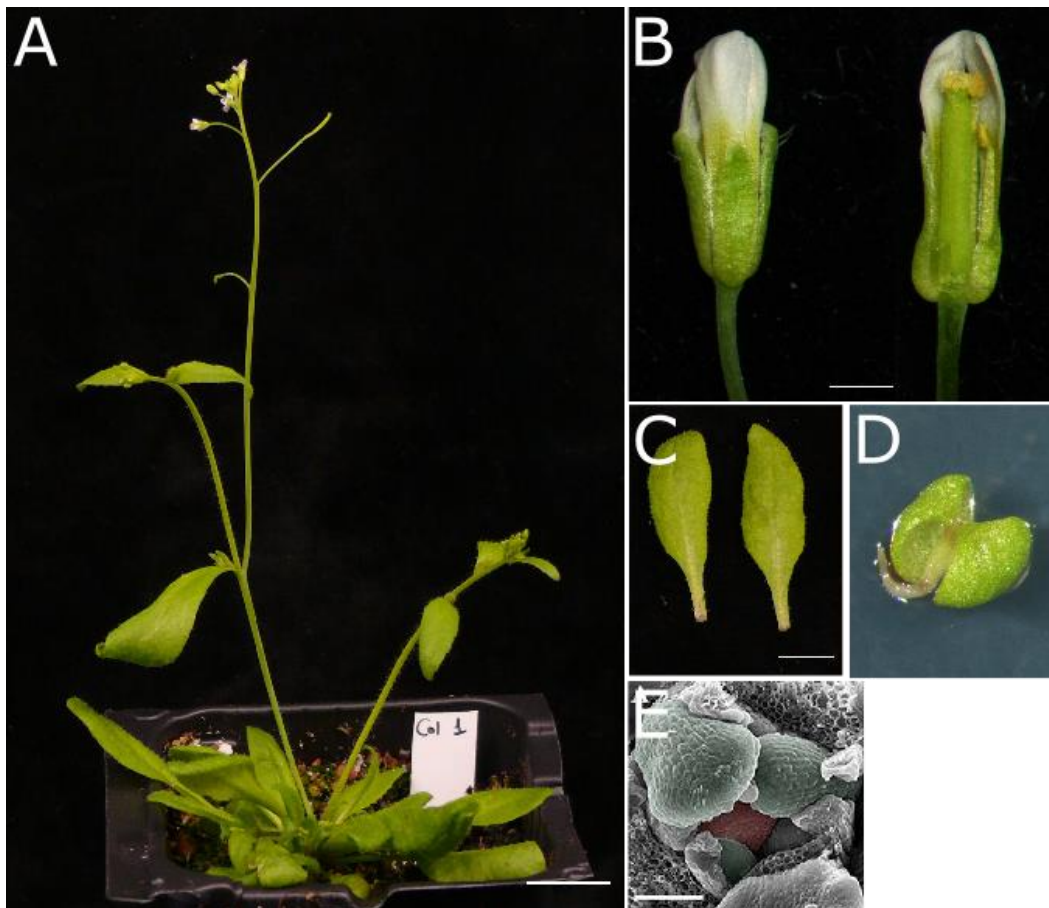


Figura R2.19. Fenotipo de plantas Col-0 cultivadas en día largo. A) Planta Col-0 en estadio reproductivo B) Flor Col-0 en antesis C) Hojas de roseta 7 y 8 respectivamente D) Plántula Col-0 crecida en medio MS + Higromicina. E) Imagen de SEM del meristemo vegetativo, tomada en plántula de 10 días tomada de Mandel et al. (2016).

En este primer rastreo se apreciaron tres alteraciones fenotípicas mayoritarias, 1) plantas que mostraban el borde de las hojas serrado (Fig. R2.20 A y D); 2) plantas que mostraban daño en el meristemo apical del tallo (SAM) (Fig.R2.20 C), que generaba la aparición de fasciación del tallo principal, o la aparición de múltiples tallos principales (Fig.R2.20 C, G y H) 3) órganos florales con los verticilos externos, sépalos y pétalos, fusionados (Fig.R2.20 B y F), en estas flores se apreciaba además un alargamiento inusual de dos de los sépalos que se fusionaban cubriendo por completo el gineceo provocando deformidades en los pétalos, los estambres y el carpelo y, posiblemente, dificultando la llegada del polen al estigma y 4) plantas

con alguna hoja curvada, siendo este último un fenotipo minoritario, presente en menos del 30% de las plantas analizadas. Cabe destacar que en muchos casos varios de estos fenotipos aparecían combinados en una misma planta.

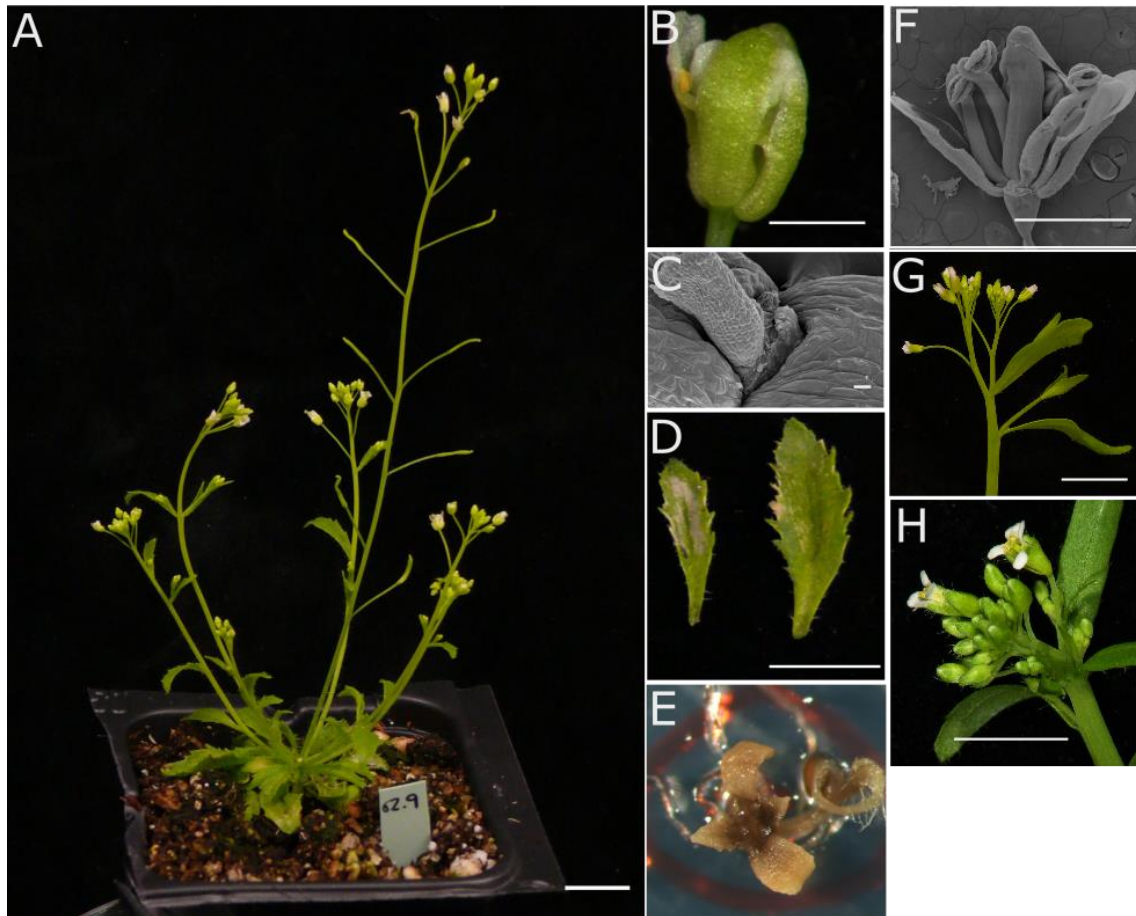


Figura R2.20. Fenotipos de las líneas dominantes 35S:bZIP30-SRDX. A) Planta adulta 35S:bZIP30-SRDX muestra hojas serradas y porte más pequeño B, F) Flor 35S:bZIP30-SRDX, se aprecia la fusión de los verticilos más externos de las flores, que cubren por completo el gineceo impidiendo su polinización y la deformación de los órganos de los verticilos internos, estambres y carpelo C) Imagen de SEM del meristemo de una plántula de 10 días 35S:bZIP30-SRDX con el meristemo apical dañado D) Hojas 7 y 8 de roseta de una planta 35S:bZIP30-SRDX, presentan un menor área total, así como márgenes de hojas serrados E) Plántula T2 crecida en placa MS+Higromicina con fenotipo inviable. G, H) Fasciaciones en tallo y la inflorescencia de plantas 35S:bZIP30SRDX.

Se seleccionaron un total de 13 plantas T1 representativas de los distintos fenotipos y se sembraron aproximadamente 60 semillas T2 de cada una de ellas, para determinar el número de inserciones presentes en cada una de las líneas, así como la heredabilidad de los fenotipos descritos en T1. Como resultado se observó que todos los fenotipos descritos en T1 se mantenían en la generación T2. Además, el análisis en placas con medio MS con la selección de higromicina nos permitió identificar un nuevo fenotipo, muy extremo; plantas pequeñas blanquecinas, que tras germinar y producir los cotiledones y los primeros primordios foliares se necrosaban y morían. Este último fenotipo se observó siempre en la descendencia de plantas

que en la T1 presentaban hojas serradas, y apareció en aproximadamente $\frac{1}{4}$ de las semillas, lo que sugiere que posiblemente se tratasen de plantas homocigotas para el transgén.

2.5.2. Fenotipos asociados a las líneas dominantes negativas 35S:bZIP52.1-SRDX y 35S:bZIP52.2-SRDX

Para el análisis de los fenotipos asociados al cambio de función de bZIP52.1 y bZIP52.2 procedimos de igual modo que con las líneas bZIP30-SRDX, realizando un primer rastreo en 90 plantas T1 para cada una de las dos construcciones e identificando los fenotipos mayoritarios, que resultaron ser muy similares para ambas formas de *splicing* de bZIP52.

Los fenotipos más frecuentes entre las plantas 35S:bZIP52.1-SRDX fueron: 1) plantas con hojas de roseta y/o caulinares con bordes curvados; análisis por SEM de las zonas de curvatura mostraron que las deformaciones éstas zonas se hallaban asociadas con regiones con daño celular (Fig.R2.21 A, C y D); 2) plantas con daño en el SAM, lo que generaba plantas sin tallo principal y desarrollo de numerosos tallos secundarios o con fasciaciones en el tallo principal (Fig.R2.21 B); 3) flores con los verticilos externos, pétalos y sépalos, fusionados, y deformaciones de los órganos situados en los verticilos más internos, estambres y carpelo (Fig.R2.21 F, G y H). Los defectos fenotípicos 2 y 3 se habían observado también en las plantas bZIP30-SRDX. Nuevamente, apareció un cuarto fenotipo con menor incidencia que los anteriores: plantas con las hojas de roseta lanceoladas, más estrechas y largas que las de Col-0. Todos estos fenotipos aparecieron tanto de forma aislada como combinados en una misma planta. Nuevamente el análisis de plantas crecidas en medio MS con higromicina permitió identificar un grupo de plantas que mostraban fenotipo extremo, mostrando plantas albinas, y que tras desarrollar los cotiledones, elongar la raíz y empezar a desarrollar el primer par de hojas verdaderas se necrosaban y morían. Nuevamente este fenotipo apareció en aproximadamente $\frac{1}{4}$ de las plantas analizadas por lo que es probable que se trate del fenotipo correspondiente a las plantas homocigotas para el transgén.

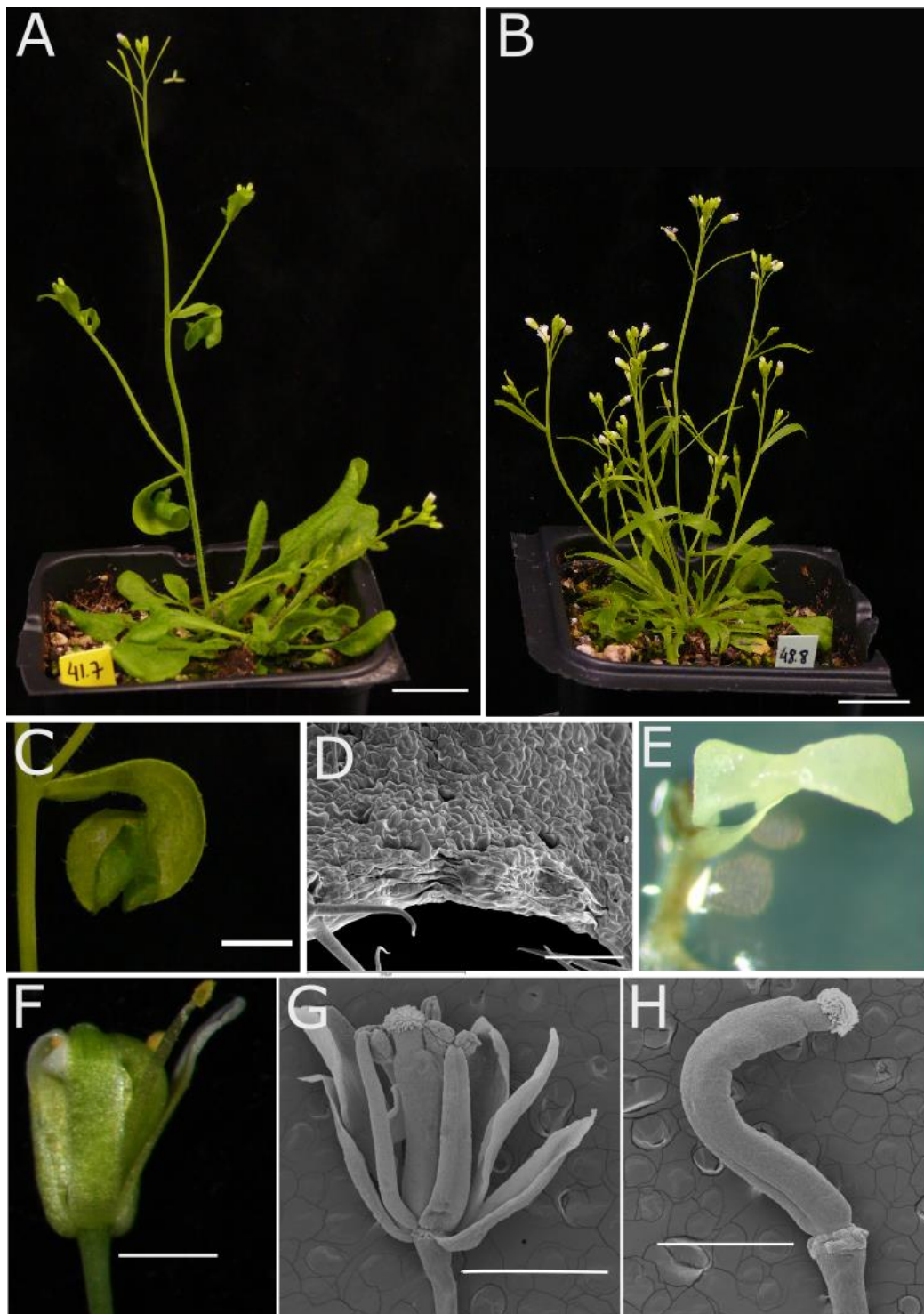


Figura R2.21. Fenotipos de las líneas dominantes negativas *35S:bZIP52.1SRDX*. A) Planta adulta *35S:bZIP52.1-SRDX* que muestra hojas curvadas B) Planta adulta *35S:bZIP52.1-SRDX* muestra hojas lanceoladas, y múltiples tallos. C) Hoja caulinar curvada D) Imagen de SEM la zona de curvatura de una hoja de roseta en el que se aprecia daño celular en la zona deformada. E) Plántula T2 crecida en placa MS+Higromicina plantas homocigotas T2, con fenotipo inviable. F, G, H) Flores en anthesis *35S:bZIP52.1-SRDX* que muestran deformaciones en los diferentes verticilos tanto externos como internos. G) Imagen de SEM de una flor a la que se le ha quitado un sépalo, se aprecia deformación en los estambres y el carpelo, así como defectos en la formación de los márgenes de los órganos florales H) Imagen de SEM de un carpelo curvado *35S:bZIP52.1-SRDX*.

En el caso de las líneas *35S:bZIP52.2-SRDX* los fenotipos observados fueron muy similares a los de las plantas *35S:bZIP52.1-SRDX*. Todas las plantas presentaron por lo general

una menor envergadura que el parental silvestre Col-0 además de los siguientes fenotipos más representativos: 1) plantas con las hojas caulinares y/o de roseta curvadas (Fig. R.22 A y D); 2) plantas con daño en el SAM, que desarrollaban fasciaciones y/o proliferación de tallos secundarios (Fig. R.2.22 A, C, F, G); 3) flores aberrantes con los sépalos deformados y fusionados que provocaban deformidades en los órganos florales internos y esterilidad parcial (Fig. R.2.22 B y E). Por último, con menor frecuencia también se encontraron 4) plantas con hojas lanceoladas y levemente serradas en el borde (Fig. 2.22 G).

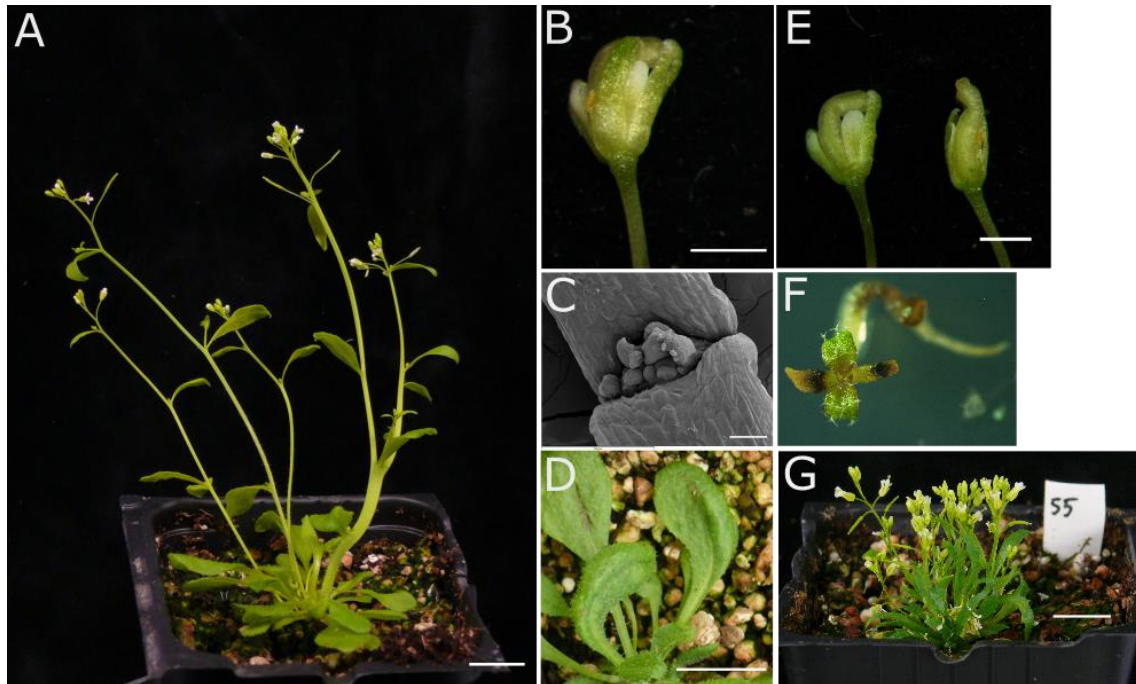


Figura R2.22. Fenotipos de las líneas dominantes negativas 35S:bZIP52.2SRDX. A y G) Planta adulta 35S:bZIP52.2-SRDX que muestra hojas curvadas y ligeramente lanceoladas, así como pérdida de la dominancia apical. B y E) Flor 35S:bZIP52.2-SRDX, se aprecia la fusión de los verticilos más externos de las flores que cubren por completo el gineceo impidiendo su polinización C) Imagen de SEM del meristemo apical de una plántula de 10 días D) Hojas de roseta curvadas F) Plántula T2 crecida en placa MS+Higromicina plantas homocigotas T2, con fenotipo inviable. G) Planta adulta con proliferación de múltiples tallos secundarios, y hojas lanceoladas.

En la población T1 se seleccionaron un total de 12 plantas de cada una de las construcciones, eligiendo aquellas que mostraron los fenotipos más representativos de la población. Se sembraron en medio MS con Higromicina un total de 60 semillas por línea para, por un lado, corroborar que los fenotipos descritos en la T1 eran heredables, y por lo tanto estaban causados por la inserción del transgén, y por otro lado, para determinar el número de inserciones presentes en cada línea y elegir aquellas que presentaran una única copia del transgén. Como resultado, todos los fenotipos descritos en T1 se reprodujeron en la generación T2. Al igual que en las líneas 35S:bZIP30S-RDX, encontramos plantas que tras desarrollar los cotiledones y el primer par de hojas se necrosaban y morían (Fig. R2.22 F). La aparición de este fenotipo de letalidad, que en algunos casos se asemejaba al de las plantas sensibles a higromicina, marcador utilizado para la selección de las plantas transgénicas, así como de

plantas con daños muy severos en el SAM incapaces de progresar, hizo muy difícil el análisis de la segregación del transgén, por lo que no pudimos seleccionar plantas que contaran con una única inserción del transgén. No obstante a diferencia de las plantas sensibles a higromicina, las plantas con fenotipo letal sí desarrollaron raíces y en muchos casos también un primer par de hojas verdaderas, sugiriendo que efectivamente se pueda tratar de las plantas homocigotas para el transgén.

2.5.3. Fenotipos asociados a las líneas dominantes negativas 35S:bZIP59-SRDX

El análisis de los fenotipos asociados al cambio de función de bZIP59 se realizó del mismo modo que lo descrito en los apartados 2.5.1 y 2.5.2 para bZIP30, bZIP25.1 y bZIP52.2.

Los fenotipos más frecuentes en la población T1 35S:bZIP59-SRDX fueron: 1) plantas con hojas lanceoladas, más estrechas y largas que el parental Col-0 y que a menudo presentaban un borde ligeramente serrado (Fig. R2.23 A, D y F); 2) plantas con daños en el SAM que causaban la proliferación de tallos secundarios (Fig. R2.23 F) y 3) flores aberrantes con deformaciones en los órganos de los diferentes verticilos, fusión de los sépalos y esterilidad parcial, probablemente por impedimento mecánico de la polinización (Fig. R2.23 B,C y E). De entre la población de plantas T1 se eligieron un total de 15 líneas representativas para todos los fenotipos mayoritarios, y se sembraron un total de 60 semillas T2 en medio selectivo para el transgén, MS con higromicina, para seleccionar las líneas que presentaran una única copia del transgén, y por otro lado para comprobar la heredabilidad de los fenotipos descritos en T1. Como resultado se seleccionaron un total de 15 líneas T2 de una sola copia, que reprodujeron todos los fenotipos descritos en la población T1, por lo que podemos concluir que todos ellos estaban debidos a la presencia del transgén.



Figura R2.23 Fenotipos de las líneas dominantes negativas *35S:bZIP59SRDX*. A) y F) Planta adulta *35S:bZIP59-SRDX* muestra hojas lanceoladas y ligeramente serradas, así como deformidades en los órganos florales. B) Flor *35S:bZIP59-SRDX*, se aprecia la fusión de los verticilos más externos de las flores que cubren por completo el gineceo impidiendo su polinización C) Frutos estériles *35S:bZIP59-SRDX* la fusión de un pétalo al estigma y la curvatura del carpelo impiden la polinización D) Hojas de roseta lanceoladas y serradas. E) Imagen de SEM de un carpelo *35S:bZIP59SRDX* que presenta curvatura en las valvas.

2.5.4. Análisis del transcriptoma de la línea dominante negativa *35S:bZIP30-SRDX*

Los datos fenotípicos obtenidos con las líneas dominantes negativas sugieren que los bZIPs de clase I podrían participar en procesos importantes del desarrollo y el control de la arquitectura de la planta en *Arabidopsis* aunque todavía desconocemos cuál podría ser su papel en estos procesos. Algunas cuestiones por resolver para identificar la función de los diferentes bZIPs de clase I en el desarrollo de *Arabidopsis* son: ¿En qué rutas genéticas participan *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59*?, ¿Cuáles son sus dianas transcripcionales?, ¿Están algunas de estas rutas relacionadas con *TFL1*? Para arrojar algo de luz sobre estas cuestiones decidimos estudiar el transcriptoma de la línea dominante negativa *35S:bZIP30-SRDX* mediante RNA-Seq. Elegimos *bZIP30* ya que únicamente *bZIP30* y *bZIP52* fueron capaces de interactuar directamente con *TFL1*, y sólo en el caso de *35S:bZIP30-SRDX* pudimos identificar líneas de una sola copia del transgén.

El experimento de RNA-Seq se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Marcio Alves Ferreira en la Universidad Federal de Rio de Janeiro. Para este experimento seleccionamos la línea de una sola copia, *35S:bZIP30-SRDX* #62.4, que se caracterizaba por

presentar una menor envergadura que el parental silvestre, hojas serradas, flores deformadas y esterilidad parcial. Se sembraron aproximadamente 60 semillas de la línea 35S:bZIP30-SRDX #62.4 en medio selectivo, MS + Higromicina durante 10 días en condiciones de fotoperiodo de día largo. Como control se sembraron, también en medio selectivo MS + Higromicina, 60 semillas de una línea T2 de copia única que contenía una construcción reportera para el gen *DVL8*, *pDVL8:GUS*, cuyo fenotipo es indistinguible del parental Col-0. Elegimos este control con el fin de descartar los posibles cambios transcripcionales inducidos por la presencia de Higromicina en el medio. Las muestras de tres réplicas biológicas de cada una de las líneas se analizaron en una plataforma de secuenciación MiSeq de Illumina, en el servicio de Genómica de la Universidad Federal de Rio de Janeiro.

Se identificaron un total de 178 genes diferencialmente expresados con un Log2FC superior a 1.5 entre la línea 35S:bZIP30-SRDX #62.4 y el control, 90 cuya expresión subía en la línea dominante negativa y 88 cuya expresión se encontraba regulada a la baja. El análisis de los términos GO mostró que las categorías funcionales más sobrerrepresentadas entre los genes regulados al alza son: regulación del tamaño de las estructuras anatómicas, regulación del crecimiento, respuesta a estímulos, o morfogénesis de estructuras anatómicas. Por su lado las categorías funcionales más representadas entre los genes regulados a la baja encontramos procesos del desarrollo, procesos del sistema inmune, modificación posttranslacional de proteínas o metabolismo (Fig. R2.24).

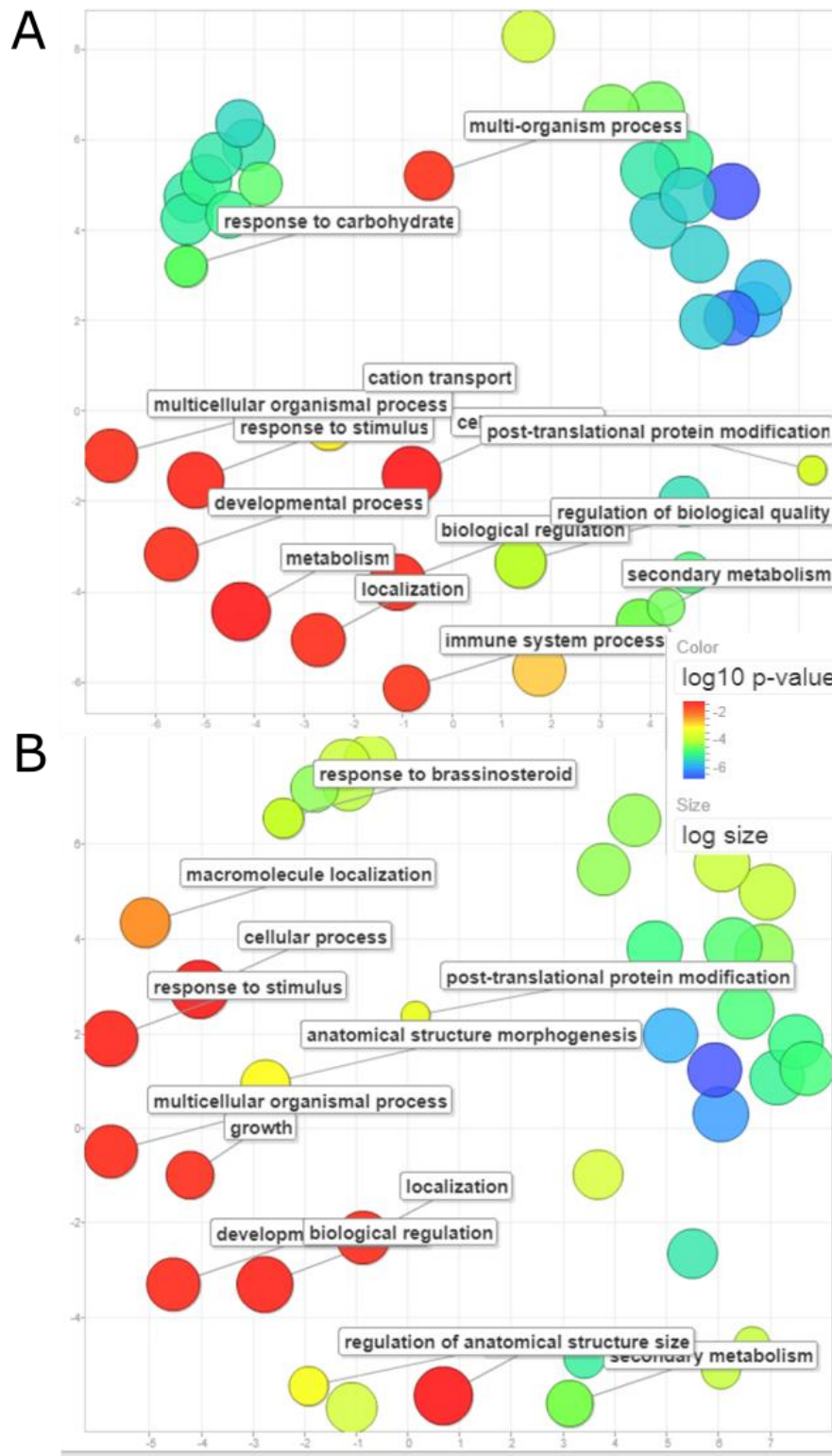


Figura R2.24. Términos GO enriquecidos entre los genes diferencialmente expresados entre la línea dominante negativa *35S:bZIP30-SRDX* y el control. A) Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión sube en *35S:bZIP30-SRDX* B) Términos GO enriquecidos entre los genes cuya expresión baja en *35S:bZIP30-SRDX*. Los colores representan el logaritmo del p-Valor; Las etiquetas indican función molecular. El color del círculo indica el p-valor para el FDR (*False Discovery rate*), el tamaño de los círculos indica la frecuencia del término GO en las bases de datos GO (*Gene Ontology Analysis*).

Entre los genes desregulados en la línea *35S:bZIP30-SRDX* encontramos genes relacionados con el desarrollo como las expansinas *ATEXPA14*, *ATEXPA11*, la respuesta a estrés como *KIN1*, *MYB77*, *ADH*, *PP2C*, *ERF2*, *JAZ6* o el tráfico de membranas, *MtN21*, *POT*.

En resumen, todos los fenotipos observados en las diferentes líneas dominantes negativas de los tres bZIPs estudiados sugieren que todos ellos podrían tener un papel en el control del meristemo apical del tallo y la formación y el desarrollo de los órganos laterales, hojas y flores. Este papel podría ser altamente redundante en algunos procesos, como el desarrollo de las flores, tal y como sugieren los fenotipos altamente coincidentes en las cuatro líneas estudiadas. Por el contrario, las diferentes morfologías observadas en las hojas, curvadas en las líneas *bZIP52-SRDX* y serradas en *bZIP30-SRDX*, y *bZIP59-SRDX*, sugieren un papel complementario de los tres bZIPs, participando conjuntamente en un mismo proceso, el desarrollo de las hojas, pero llevando a cabo papeles diferentes y/o complementarios.

2.6. Obtención y caracterización de mutantes múltiples *bZIP*

La levedad de los fenotipos descritos para los mutantes simples *bzip30*, *bzip52-1* y *bzip59* sugiere que, o bien estos genes no desempeñan un papel importante en el desarrollo de *Arabidopsis*, o bien lo hacen de forma redundante con otros genes. Los fenotipos fuertes observados en las líneas dominantes negativas *35S:bZIP30-SRDX*, *35S:bZIP52-SRDX*, y *35S:bZIP59-SRDX* hace improbable la primera de estas hipótesis. Además, la similitud de los fenotipos observados en algunos aspectos, como el desarrollo de las flores en las diferentes líneas *bZIP-SRDX*, sugiere que *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59* podrían actuar de forma redundante entre ellos y/o con otros genes emparentados. Para contrastar esta hipótesis decidimos generar un doble mutante que incluyera los dos bZIPs capaces de interaccionar proteína-proteína con TFL1, *bzip30 bzip52*. Además, generamos dobles mutantes de cada de los genes, *bZIP30* y *bZIP52* con el *bZIP* más próximo filogenéticamente: *bZIP18* en el caso de *bZIP52*, y *bZIP29* en el caso de *bZIP30*.

2.6.1. Análisis de los fenotipos asociados a los dobles mutantes *bZIP*

En primer lugar, se generaron las diferentes combinaciones de mutantes dobles mediante cruce de los correspondientes mutantes simples y posterior genotipado de la población F2 mediante PCR con cebadores específicos (Tabla S1, materiales y métodos). Una vez identificados los dobles mutantes homocigotos, se procedió a estudiar los fenotipos asociados a las diferentes combinaciones de mutantes múltiples. Para ello se sembraron un mínimo de 20 plantas de cada una de las combinaciones de mutantes, así como del parental silvestre Col-0, y se analizó la posible presencia de fenotipos diferentes del silvestre en cuanto al tiempo de

floración, la morfología de los órganos vegetativos y florales o la arquitectura de la planta. Como resultado, no se apreciaron fenotipos diferentes al del silvestre en ninguna de las combinaciones estudiadas (Fig. R2.25).

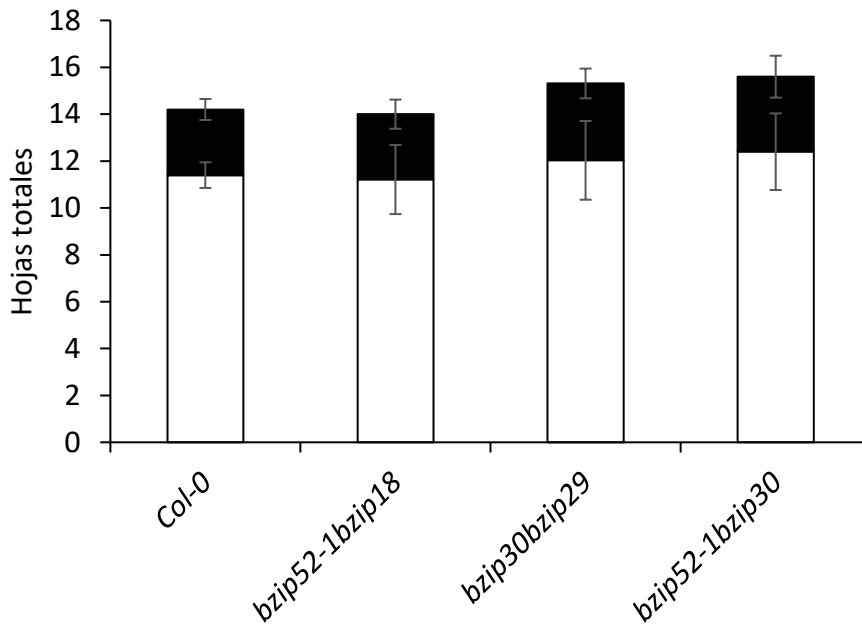


Figura R2.25. Fenotipo de los mutantes dobles de genes *bZIP*. Tiempo de floración de los dobles mutantes *bZIP*. Las plantas se cultivaron en condiciones de fotoperiodo de día largo. Se representa el promedio del número de hojas de roseta, barra blanca, y caulinares, barra negra. Las barras de error representan la desviación standard. Nivel de significatividad analizado con la prueba de Tukey.

2.6.2. Análisis de los fenotipos asociados a los mutantes triple, cuádruple y quíntuple *bZIP*

Ante la ausencia de fenotipos evidentes en los dobles mutantes decidimos continuar generando mutantes múltiples de mayor orden. En este sentido, obtuvimos un triple mutante *bzip30bzip52bzip59*, incluyendo una mutación en el gen *bZIP9*, del mismo clado que *bZIP30* y *bZIP52* y al igual que estos también interactúan con FT, un cuádruple mutante con los dos *bZIPs* que interactúan con TFL1, *bZIP30* y *bZIP52*, y los *bZIPs* más próximos filogenéticamente a ellos; *bzip30bzip29bzip52-1bzip18*, y un quíntuple mutante con todos los *bZIPs* que añadía a éste cuádruple mutante el siguiente *bZIPs* más próximo filogenéticamente a los anteriores, *bZIP59*, generando un quíntuple mutante con todos los *bZIPs* del grupo I capaces de interactuar con FT, *bzip30bzip29bzip52-1bzip18bzip59*. Estos mutantes múltiples se obtuvieron mediante cruce de los dobles obtenidos anteriormente y posterior genotipado mediante PCR. Una vez aislados los mutantes múltiples homocigotos se sembraron de nuevo un mínimo de 25 plantas de cada uno de los genotipos, así como del parental silvestre Col-0 y se analizaron en busca de fenotipos diferentes del silvestre en cuanto al tiempo de floración, arquitectura de la planta o cualquier

otro aspecto del desarrollo. En condiciones de fotoperiodo de día largo solamente se observó un pequeño retraso en el tiempo de floración del cuádruple mutante *bzip30bzip29bzip52-1bzip18* (Fig. R2.26 A). Por otra parte, en condiciones de día corto se observaron ligeros cambios en el tiempo de floración en el mutante cuádruple *bzip30bzip29bzip52-1bzip18*, que presentó floración tardía, y en el quintuple mutante *bzip30bzip29bzip52-1bzip18bzip59* que floreció más temprano que el control Col-0 (Fig. R2.26 B).

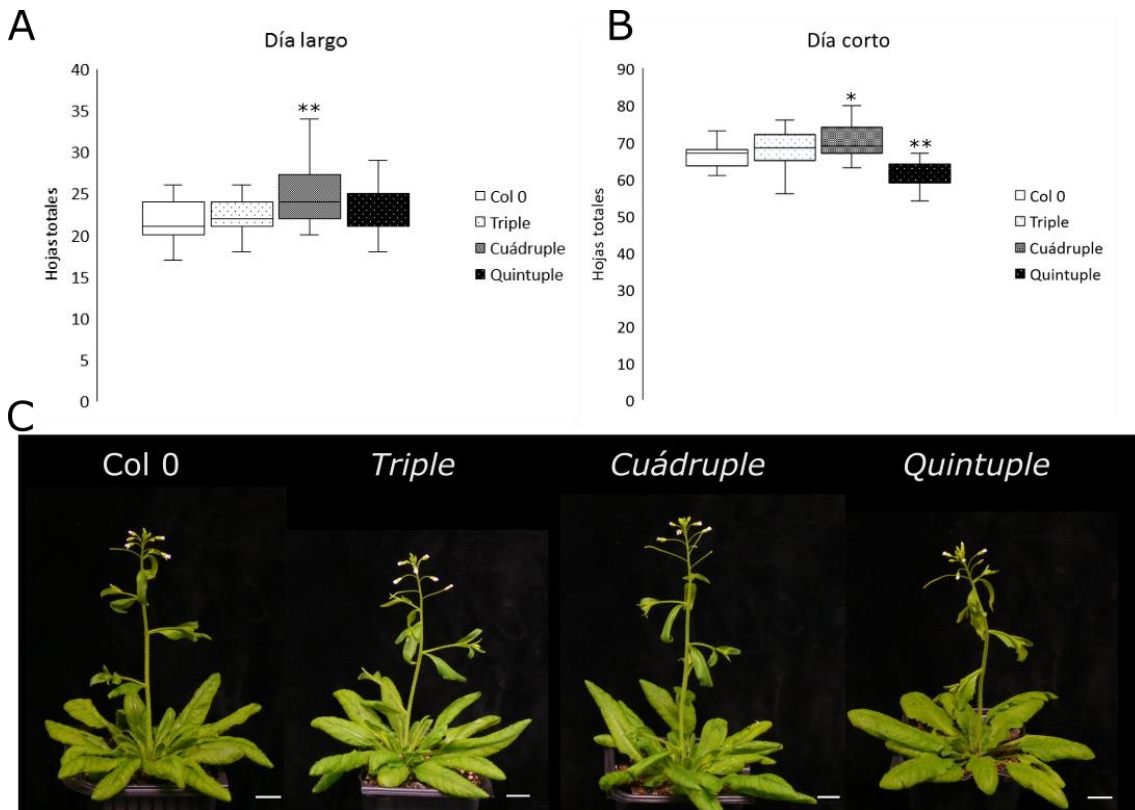


Figura R2.26. Fenotipos asociados a los múltiples mutantes bZIP. A y B) Tiempo de floración en fotoperiodo de día largo (DL) y de día corto (DC), respectivamente, de los múltiples mutantes bZIP; *bzip30bzip52bzip59* (Triple), *bzip30bzip29bzip52-1bzip18*, (Cuádruple) y *bzip30bzip29bzip52bzip18bzip59* (Quintuple). C) Planta adultas de 5 semanas crecidas en día largo. La barra de escala corresponde a 1cm. Nivel de significatividad estadística test de Tukey * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.001$.

Además, se apreciaron cambios en las hojas del quintuple mutante *bzip30bzip29bzip52-1bzip18bzip59*, que presentaron una forma más redondeada que el control Col-0, así como una mayor área foliar, similar a las hojas del mutante *tfl1-1* y una coloración verde más clara (Fig. R2.27)

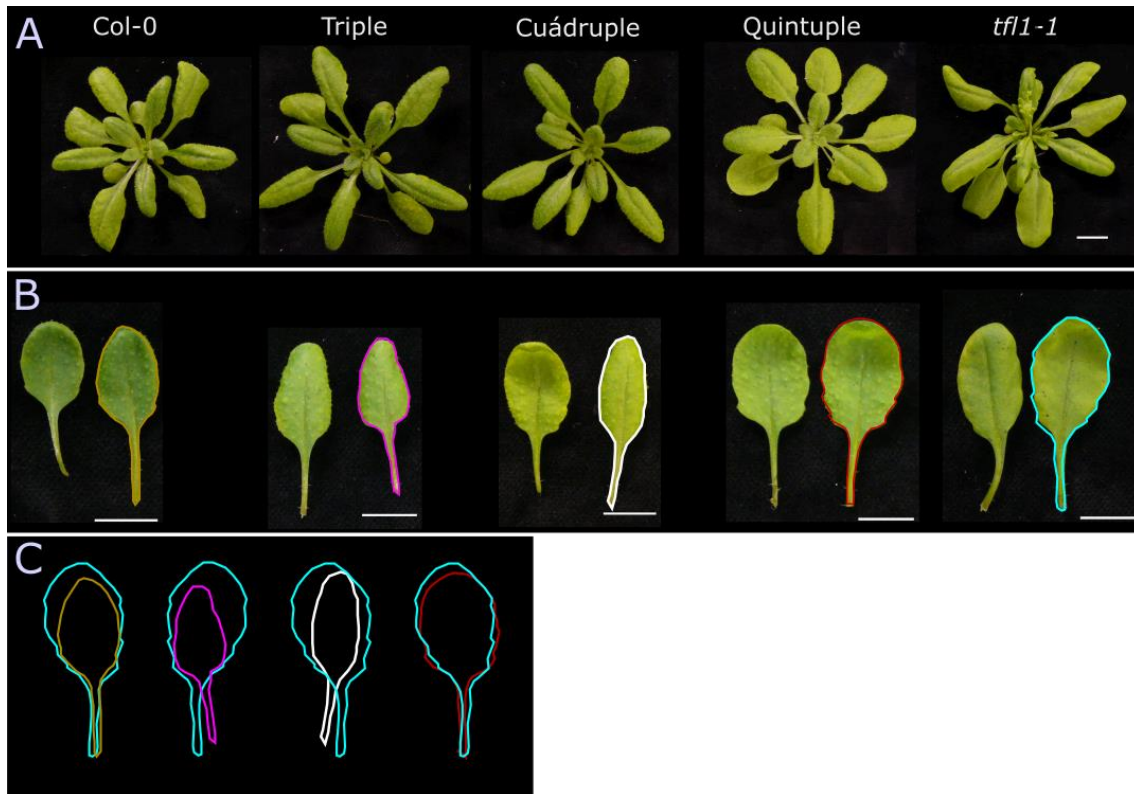


Figura R2.27. Fenotipos en las hojas de roseta de los múltiples mutantes bZIP. A) Rosetas de plantas de los distintos genotipos múltiple mutante *bZIP*, 25 días tras la germinación. B) Hojas expandidas de roseta de posiciones 5-6 de plantas de los distintos genotipos C) Comparación de la silueta de la hoja en posición 6 de los diferentes genotipos múltiple mutante *bZIP* con el mutante *tf1-1* (línea azul). La barra de escala corresponde a 1cm.

Se apreció también una reducción significativa en la longitud de los frutos del triple mutante *bzip30bzip52-1bzip59*, por el contrario, esta reducción no fue significativa en el caso de los mutantes cuádruple y quintuple. Por último, se apreciaron cambios en el tamaño, coloración y morfología de las semillas, que eran por lo general entre un 10 y un 15% más pequeñas que el parental silvestre, además de una reducción en el número de semillas por fruto (Fig. R2.28). Sin embargo, estos resultados no fueron reproducibles en todas las siembras que se han realizado de las diferentes combinaciones de mutantes múltiples. Esto podría deberse a pequeños cambios en las condiciones de crecimiento de las plantas: tratamientos plaguicidas, cantidad de plantas por fitotrón, o por la presencia de plagas que generen diferentes niveles de estrés, lo que sugeriría que el fenotipo en el número y tamaño de las semillas podría ser una respuesta de los mutantes al estrés. Se necesitarían más experimentos que permitan confirmar esta observación preliminar.

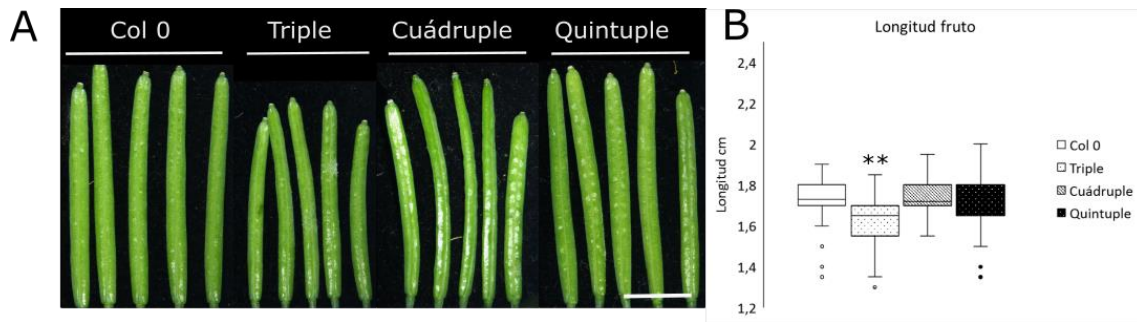


Figura R2.28. Tamaño de los frutos de los mutantes múltiples bZIP. A) Frutos 7-11 del tallo principal de plantas silvestre Col 0, y de las diferentes combinaciones de múltiples mutantes bZIP. B) Grafico de cajas del promedio de la longitud de los frutos de los mutantes múltiples bZIP. Se contaron los frutos 5-25 de 5 plantas independientes por fenotipo. Nivel de significatividad medido por el test de Tukey ** $t \leq 0.001$.

Los fenotipos observados en los mutantes múltiples *bZIP*, si bien son bastante sutiles, apuntan hacia un posible papel de *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59* en algunos aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*, como la formación y el desarrollo de las hojas, los frutos, y las semillas, tal y como ya apuntaban los fenotipos asociados a las líneas dominantes negativas en el apartado 2.5. Los fenotipos observados en hojas coinciden en gran medida con los observados en el mutante *tfl-1*, por lo que no podemos descartar que estos *bZIPs* puedan participar de forma conjunta con *TFL1* en el desarrollo de la hoja. El hecho de que no se aprecien fenotipos fuertes en los quintuples mutantes, así como que algunos de los fenotipos, como la reducción de la longitud del fruto, sólo se observe en el triple mutante pero no en el quintuple, sugiere que si bien estos *bZIPs* probablemente actúen en los mismos procesos podría ser que lo hagan desempeñando funciones diferentes, complementarias en algunos casos y opuestas en otros.

2.7. Caracterización del fenotipo asociado a la sobreexpresión de *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59*

Una de las herramientas clásicas más útiles para elucidar la función de un gen es el de análisis del fenotipo asociado a su expresión constitutiva. Es por ello que decidimos generar plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresaran *bZIP30*, *bZIP52.1*, *bZIP52.2* y *bZIP59*, respectivamente. Para ello, en primer lugar generamos construcciones en las que la expresión de la región codificante de cada uno de estos *bZIPs* se halla dirigida por dos copias del promotor constitutivo 35S, utilizando para ello el vector binario pMDC32. Estas construcciones se utilizaron para transformar plantas silvestre Col-0 de *Arabidopsis*. Para estudiar los fenotipos asociados a la sobreexpresión de cada uno de estos genes se realizó un análisis preliminar de una población de 90 plantas T1 independientes en busca de posibles alteraciones en la arquitectura de la parte aérea de la planta y/o en el tiempo de floración. Únicamente entre las transgénicas 35S:*bZIP30* se observó un fenotipo claro, consistente en plantas con un porte más pequeño y débil que Col-0, frutos cortos y un ligero adelanto en el tiempo de floración, aunque

este fenotipo sólo se observó en una pequeña proporción del total de plantas T1 analizadas (Fig. R2.29).

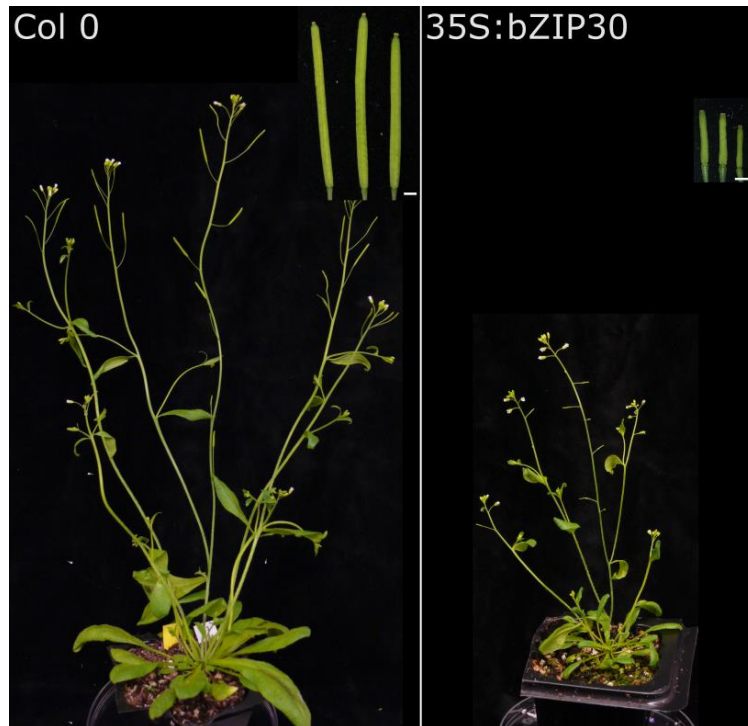


Figura R2.29 Fenotipo asociado a la expresión constitutiva de *bZIP30*. Plantas cultivadas 5 semanas en día largo, detalle de frutos maduros. Barra de escala 1mm. La sobreexpresión de *bZIP30* genera plantas pequeñas, con frutos cortos, y reducción en el tamaño de las hojas.

Se realizó un nuevo análisis en busca de posibles fenotipos en el tiempo de floración o la arquitectura en las líneas homocigotas para cada uno de los genes. Se seleccionaron para cada gen 2 líneas T4 independientes, en el caso de líneas 35S:*bZIP30* se eligieron las líneas que en la generación T1 mostraron un fenotipo claro, para el resto de construcciones, *35S:bZIP52.1*, *35S:bZIP52.2* y *35S:bZIP59*, dada la ausencia de fenotipos evidentes se eligieron las líneas que mostraron una mayor expresión del transgén (Fig. R2.30 C). De nuevo se sembraron un mínimo de 40 plantas de cada una de las líneas y se determinó el tiempo de floración medido como el número de hojas producidas hasta la aparición de la primera flor. No se observaron cambios en la arquitectura de las diferentes líneas sobreexpresoras *bZIP52.1*, *bZIP52.2* y *bZIP59* (Fig. R2.30 A). Por el contrario, las líneas 35S:*bZIP30* mantuvieron el fenotipo descrito en la T1, consistente en plantas más pequeñas y de tallos más finos que Col-0, con una ligera pérdida de la dominancia apical, frutos más pequeños, esterilidad parcial y reducción en el tamaño de las semillas y de las hojas de roseta (Fig. R2.30 A y B).

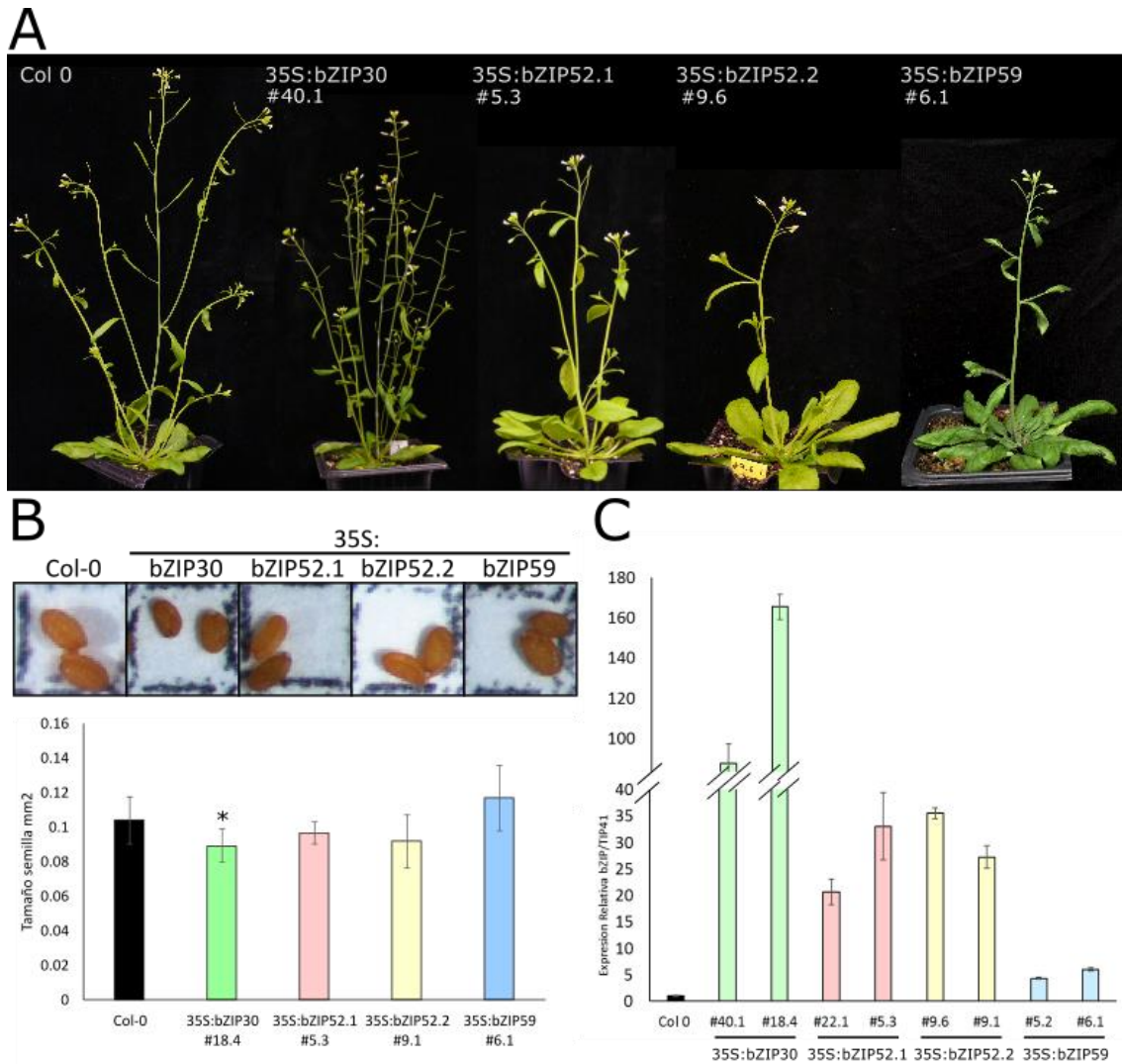


Figura R2.30 Fenotipo asociado a la sobreexpresión de *bZIP30*, *bZIP52.1*, *bZIP52.2* y *bZIP59*. A) Plantas cultivadas 5 semanas en día largo. B) Cuadro superior, fotos a la lupa de 2 semillas secas correspondientes a las diferentes líneas de sobreexpresión, se muestran sobre una superficie de 1mm². Área promedio de las semillas de las diferentes líneas de sobreexpresión (N ≥ 45) Nivel de significatividad establecido con Test Tukey p<0.05. C) Nivel de expresión 35S:bZIP30, 35S:bZIP52.1, 35S:bZIP52.2 y 35S:bZIP59.

Por lo que respecta al tiempo de floración, ambas líneas 35S:bZIP30, #40.1 y #18.4 florecieron más tempranamente que el parental Col-0, tanto en condiciones de día largo como en día corto (Fig. R2.31 A). Por el contrario, las dos líneas 35S:bZIP52.2 mostraron un ligero retraso en el tiempo de floración con respecto al parental silvestre, en condiciones de fotoperiodo de día largo (Fig. R2.31 C). En el caso de las líneas 35S:bZIP59 solamente la línea 35S:bZIP59 #6.3 mostró un ligero adelanto en el tiempo de floración en condiciones de día largo (Fig. R2.31 D). Finalmente, las líneas 35S:bZIP52.1 no mostraron ningún cambio en cuanto al tiempo de floración en día corto ni en día largo (Fig. R2.31 B).

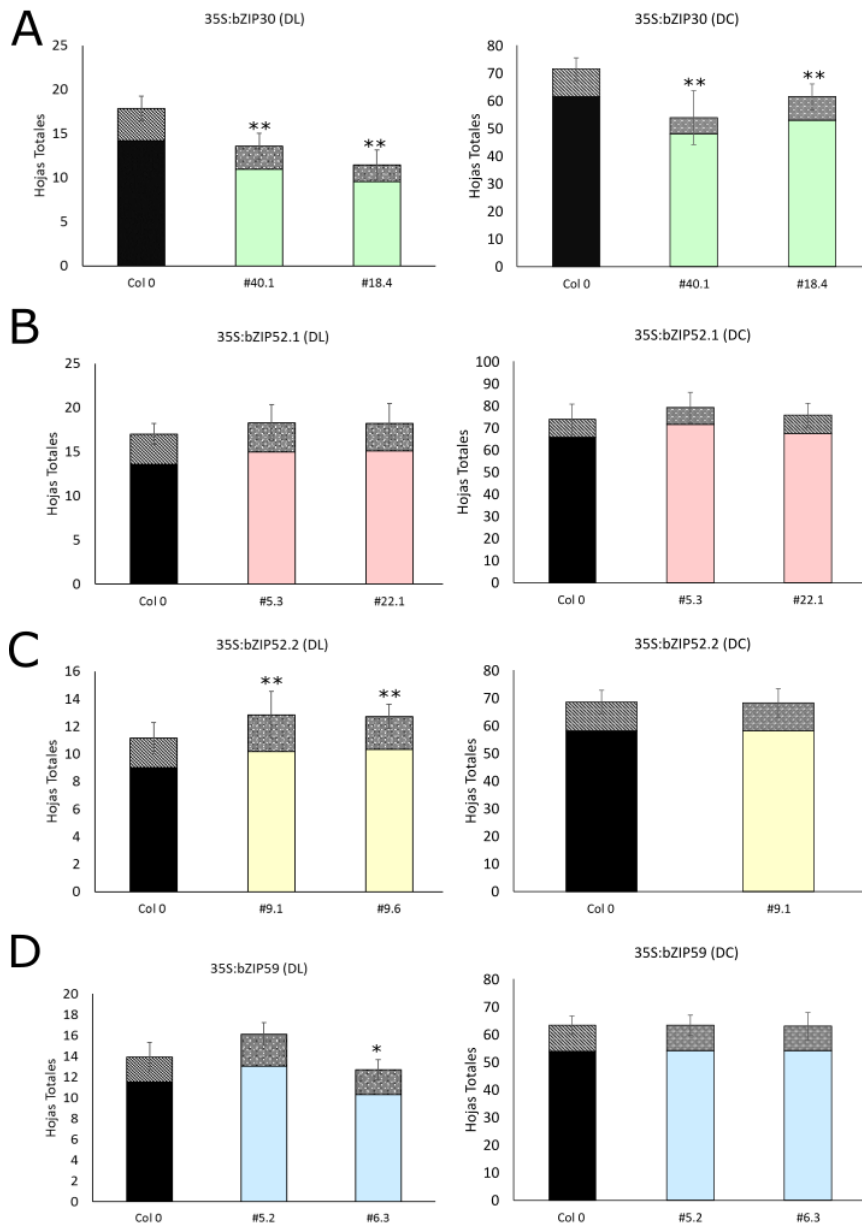


Figura R2.31. Fenotipo en el tiempo de floración de las líneas 35S:bZIP30, 35S:bZIP52.1, 35S:bZIP52.2 y 35S:bZIP59. Tiempo de floración medido como el número de hojas producidas por el tallo principal hasta la aparición de la primera flor. La porción de barra sólida muestra el número de hojas de roseta y la parte en trama el número de hojas caulinares ($n > 15$). Las barras de error representan la desviación estándar. Nivel de significatividad medido mediante Test Tukey * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

Con el fin de comprobar que los fenotipos observados en las diferentes líneas estaban relacionados con el aumento de expresión de *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59*, determinamos los niveles de expresión de cada gen en las distintas líneas de sobreexpresión y en el control Col-0 mediante RT-qPCR. En todos los casos, se observó un incremento significativo en el nivel del correspondiente mRNA producido en las diferentes líneas de sobreexpresión con respecto al nivel de mRNA endógeno detectado en el parental silvestre.

De modo similar a lo observado en los mutantes múltiples y en las líneas dominantes negativas los fenotipos observados en las líneas de sobreexpresión apuntan también a un posible papel de los bZIPs del grupo I en el control del tiempo de floración y la arquitectura. Sin embargo, los fenotipos opuestos en el tiempo de floración de las líneas 35S:bZIP30 y 35S:bZIP52.2 apoyan de nuevo la hipótesis de que *bZIP30* y *bZIP52* puedan participar en los mismos procesos, pero realizando funciones diferentes y/u opuestas.

CAPÍTULO 3: Identificación de nuevas proteínas que forman complejos con TFL1

Como se ha comentado anteriormente, TFL1, al igual que su homólogo FT, pertenece a la familia de las PEBP, por lo que, aunque ambas proteínas regulan la expresión de genes, no son factores de transcripción. Se ha descrito que tanto FT como TFL1 regulan la expresión de los genes de identidad responsables de la iniciación floral mediante su interacción con FD, un factor de transcripción de la familia de los bZIPs del grupo A, en una interacción mediada por proteínas 14-3-3 (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Hanano and Goto, 2011; Taoka et al., 2011; Wigge, 2011). No obstante, el análisis mediante ChIP-Seq de los genes a los que se unen TFL1 y FD -Seq (Resultados, Capítulo 1.3) ha mostrado que sólo un tercio de los motivos G-Box a los que se encuentra unido TFL1 son compartidos con FD, por lo que cabe esperar que TFL1 también sea capaz de actuar interaccionando con otros factores de transcripción de tipo bZIP o bHLH, que reconocen este motivo de unión. En este sentido, en el Capítulo 2 se ha estudiado la interacción de TFL1 con los bZIPs del grupo I: bZIP30, bZIP52 y bZIP59. Por otra parte, TFL1 y FT no son proteínas exclusivamente nucleares (Conti and Bradley, 2007; Sohn et al., 2007), por lo que es probable que, además de funcionar como cofactores transcripcionales, también actúen mediante otros mecanismos, y participen en otros procesos. Así se ha mostrado que TFL1 participa en el transporte de proteínas a vacuolas, y que FT interacciona con fosfolípidos que afectan al tiempo de floración (Sohn et al., 2007; Nakamura et al., 2014). Es por ello que conocer el mapa de las proteínas que interaccionan con TFL1 es esencial para descifrar su mecanismo de acción y conocer en profundidad su papel en el control de la floración, así como su posible participación en otros procesos.

3.1. Identificación de nuevos interactores de TFL1 mediante rastreos de doble y triple híbrido en levadura

Con el fin de conocer el mapa de los interactores de TFL1 se plantearon una serie de rastreos de doble y triple híbrido en levadura frente a diferentes genotecas de *Arabidopsis*, utilizando en todos los casos la proteína TFL1 como *cebo*. El ensayo de doble híbrido en levadura es una técnica destinada a analizar la interacción entre dos proteínas (Van Criekeing and Beyaert, 1999; Glass and Takenaka, 2018). Esta técnica se basa en la capacidad de un factor de transcripción, en nuestro caso la proteína GAL4, de activar la secuencia UAS (*Upstream Activation Sequence*) de un gen reportero, en nuestro caso un gen de biosíntesis de Histidina. En el ensayo de doble híbrido la proteína GAL4 se divide en dos fragmentos, el dominio de activación (AD) que conserva los elementos de activación de la secuencia UAS, y el dominio de unión (BD) que contiene los elementos de unión al DNA. Cada uno de estos fragmentos se fusiona a una de las

proteínas cuya interacción se quiere analizar, de modo que, si ambas proteínas interactúan, los dominios de unión y de activación de GAL4 quedan lo suficientemente cerca para que se active la transcripción del gen reportero (Fig. R3.1).

Se sabe que algunas interacciones entre proteínas se encuentran mediadas por otras proteínas que actúan como puente entre ambas, permitiendo o facilitando su interacción. Para estudiar este tipo de interacciones más complejas se desarrolló el rastreo de tríple híbrido en levadura. El rastreo de tríple híbrido en levadura se basa de nuevo en la capacidad de un factor de transcripción de activar a un gen reportero, pero en este tipo de rastreo se incluye además de las proteínas *cebo* y *presa* una tercera proteína de fusión o *puente* resultante de la fusión de una secuencia mediadora y la proteína que creemos actúa como mediadora de la interacción a analizar (Fig. R3.1).

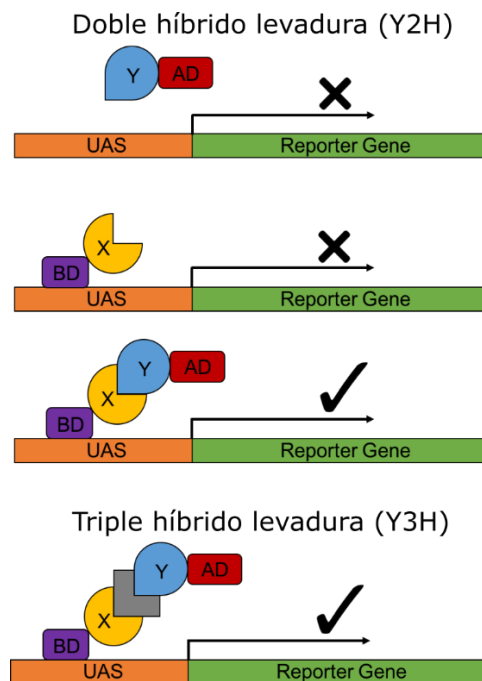


Figura R3.1. Esquema del funcionamiento de los ensayos de doble y triple híbrido en levadura. Adaptado de www.lifeasible.com

3.1.1 Rastreo de doble híbrido en levadura de TFL1 frente a una genoteca de cDNA de inflorescencia

Sabemos por los resultados obtenidos en el capítulo 1 que TFL1 es capaz de funcionar como cofactor transcripcional, asimismo, podría participar en otros procesos, como el tráfico de proteínas a la vacuola (Sohn et al., 2007). Es por ello que no podemos descartar que además de con factores de transcripción como FD (Hanano and Goto, 2011), TFL1 forme complejos con otro tipo de proteínas. Para identificar posibles interactores de TFL1, se planteó un primer rastreo de doble híbrido en levadura frente a una genoteca de cDNA de inflorescencia de *Arabidopsis*. Para llevar a cabo este rastreo, en primer lugar se generó la construcción que expresaría la proteína *cebo*, fusionando la secuencia codificante de TFL1 al dominio de unión (BD) de *GAL4*, utilizando para ello el plásmido pDEST32. El plásmido recombinante resultante se utilizó para transformar células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pJ69-4 α (MAT α).

Para evitar la aparición de falsos positivos en el rastreo, se determinó la capacidad de la proteína *cebo* BD-TFL1 de activar el gen reportero de biosíntesis de histidina, sin la presencia de una construcción con dominio de activación. Para ello se creció la levadura transgénica que contenía el plásmido *cebo* en medio selectivo esta construcción SD(-L) y en medio selectivo para la construcción y la interacción SD(-L-H), en el que no se espera crecimiento de la levadura puesto que no se ha incluido ninguna construcción con dominio de activación. Este medio se suplementó con concentraciones crecientes de un inhibidor del crecimiento: 3Amino-trizol (3AT). El 3AT es un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3, de modo que sólo las células con una mayor expresión del gen HIS3, en nuestro caso las parejas *cebo+presa* cuya interacción sea más fuerte, o las construcciones *cebo* solas que presenten mayor autoactivación del reportero, podrán crecer. Transcurridos 3 días desde la siembra se comprobó si existía crecimiento de la levadura. No se observó crecimiento en el medio selectivo sin histidina a ninguna de las concentraciones de 3AT testadas, mientras que las placas control SD(-L) mostraron un crecimiento claro de las colonias. Se concluyó por tanto que la proteína *cebo*, BD-TFL1, no es capaz de activar la expresión del gen reportero por sí sola (Fig. R3.2 A). A la vista de este resultado se prosiguió con el rastreo de doble híbrido para el que se utilizó la concentración más baja de 3Amino-Trizol (3AT), de entre las testadas en esta prueba, 1 μ M.

Seguidamente, se transformó la levadura transgénica que contenía el plásmido *cebo*, pDEST32:BD-TFL1, con una librería de cDNA de inflorescencia de *Arabidopsis*. Esta librería consistía en una colección de plásmidos *presa* que expresaban los cDNAs sintetizados a partir de los mRNAs presentes en la inflorescencia de *Arabidopsis* fusionados al dominio de activación

de *GAL4*, en el plásmido pDEST22. Las levaduras transformantes se crecieron durante 3-5 días a 21°C en medio selectivo para cada uno de los plásmidos, SD(-L-W) 1µM 3AT, o para ambos plásmidos y la interacción, SD(-L-W-H) 1µM 3AT. Las colonias capaces de crecer en el medio selectivo para la interacción SD(-L-W-H) se recogieron y se sembraron de nuevo medio selectivo SD(-L-W-H) con concentraciones crecientes de 3AT, para por un lado descartar que se tratara de falsos positivos, y por otro para tener una idea aproximada de la fuerza de la interacción. Finalmente, los cDNAs presentes en los plásmidos *presa* de las colonias positivas se analizaron mediante PCR de colonia y posterior secuenciación Sanger. Se obtuvieron 49 clones positivos, sin embargo, el análisis mediante secuenciación mostró que 45 de ellos correspondían a secuencias parciales, y solamente cinco contenían clones completos: 3 de ellos correspondieron a la misma proteína, la proteína de tipo 14-3-3, GRF14λ, otro correspondía a la proteína DIR1, y el cuarto a la proteína ribosomal L14 (Tabla R3.1, Fig. R3.2 B).

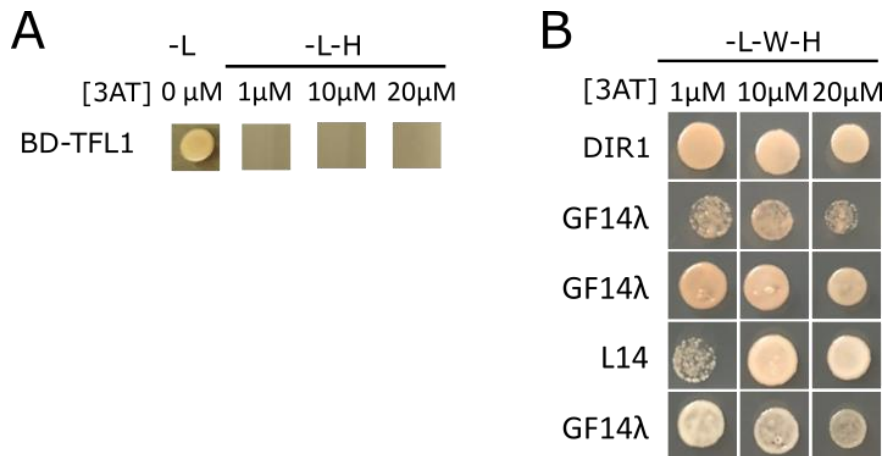


Figura R3.2 Rastros de doble híbrido en levadura para la identificación de interactores de TFL1. A) Prueba de la capacidad de autoactivación del plásmido *cebo* pDEST32::BD-TFL1. Se muestra el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos *cebo* en medio no selectivo SD(-L) y en medio selectivo SD (-L-H) con diferentes concentraciones de 3AT (1, 10 y 20 µM). B) Clones completos de entre los positivos del rastreo de doble híbrido con la combinación de plásmido *cebo* pDEST32::BD-TFL1 frente a la genoteca de cDNA de inflorescencia. Se muestra el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos *cebo* y *presa* a en medio selectivo -L-H suplementado con 3 concentraciones diferentes de 3AT (1, 10 Y 20 µM).

	ID	Nombre	nº clones	tamaño clon	Integridad	L-W-H +3AT[μ M]					Tipo proteína	
						1	5	10	15	20		
1	AT5G10450	GF14 λ	5	1200	parcial	+	+				Proteína tipo 14-3-3	
2				1200	completo	+	+					
3				500	completo	+	+	+	+	+		
4				1200	parcial	+	+					
5				1200	parcial	+		+				
6	AT3G55610	P5CS2	2	500	parcial	+	+	+	+	+	Delta- 1-5-pirrolina-5-carboxilasa sintasa 2	
7				500	parcial	+			-	-		
8	AT3G09390	MT2A		550	parcial	+	+	+	+	+	Metalotioneina 2A	
9				500	parcial	+	-	-	-	-		
10	AT1G52030	MBP2	2	940	parcial	+	+	+	+	+	Proteína de unión a miosinas 2	
11				950	parcial	+	+	+	+	+	Proteína de unión a miosinas 2	
12	AT2G10940		2	650	parcial	+	+	+	+	+	Inhibidor bifuncional de la transferencia de lípidos a las proteínas y del almacenamiento de albúmina 2S	
13				1000	parcial	+						
14	AT3G11170	FAD7	1	1300	parcial	+	+	+	+	+		
15	AT5G23120	HCF136	1	600	parcial	+	+	+	+	+	Factor de ensamblaje y estabilidad del fotosistema II	
16	AT5G48485	DIR1	1	650	completo	+	+	+	+	+	Inhibidor bifuncional de la transferencia de lípidos a las proteínas y del almacenamiento de albúmina 2S	
17	At3g60245		1	650	completo	+	+	+	+	+	Proteína ribosomal de unión a zinc	
18	AT4G10340.1	LHC5	1	900	parcial	+	+	+	+	+	Proteína del complejo de captación de la luz (LHC) del fotosistema II	
19	At1g55475		1	650	parcial	+	+	+	+	+		
20	AT1G13560	AAPT1	1	400	parcial	+	+	+	+	+	Aminoalcoholfosfotransferasa 1	
21	AT2G15440	DUF579	1	400	parcial	+	+	+	+	+	Proteína implicada en la biosíntesis de polisacáridos	
22	At1g70600	L18e/L15	1	600	parcial	+	+	+	+	+	Proteína ribosomal L18e/L15	
23	AT3G54970		1	1000	parcial	+		+	+		D-aminoácido aminotransferasa-like dependiente de PLP	
24	At2g19170		1	400	parcial	+	+	+	+	+	subtilisin-serin proteasa	
25	AT4G04210	PUX4	1	600	parcial	+	+	+	+	+	CDC48-interacting UBX-domain protein	
26	AT1G63990	SPO11	1	450	parcial	+	+	+	+	+	Subunidad de la DNA topoisomerasa VIA	
27	AT2G38400	AGT3	1	500	parcial	+	+	+	+	+	Alanina-glioxilato aminotransferasa 3	
28	At3g49540		1	1100	parcial	+	+					
29	AT3g61260		1	1200	completo	+	+				Proteína de unión a DNA	
30	AT5G17920	ATMS1	1	650	parcial	+	+	+	+	+	Sintasa independiente de cobalamina	
31	At3g03100		1	650	parcial	+	+		+	+		
32	AT2G18960	HA1	1	1500	parcial	+	+	+	+	+	ATPasa de protones de la membrana plasmática	
33	AT1G48300	DGAT3	1	1500	parcial	+	+	+	+	+	Diacilglicerol aciltransferasa 3	
34	AT3G54840	ARA6	1	550	parcial	+	+	+	+	+	Proteína de unión a GTP tipo Ras	
35	AT3G07300	NagB/RpiA/	1	500	parcial	+	+	+	+	+	CoA transferasa-like	
36	AT4G27090		1	1400	completo	+		+			Factor de regulación tipo G-Box	
37	AT4G10610	CID12	1	600	parcial	+	+	+	+	+		
38	AT5G54770	THI1	1	1000	parcial	+	+	+	+			
39	At1g30280		1	1000	parcial	+		-	-	-		
40	AT5g54770	MBG8_3	1	1500	parcial	+	-	-	-	-		

Tabla R3.1. Interactores de TFL1 identificados en el rastreo de doble híbrido de una genoteca de cDNA de inflorescencia con TFL1 como *cebo*. Los colores indican el crecimiento de la levadura a diferentes concentraciones de 3AT, verde con símbolo + para buen crecimiento, amarillo ligero crecimiento, rojo con símbolo – para ausencia de crecimiento.

La identificación de un gran número de clones incompletos podría ser debido a que la proteína utilizada como *cebo*, BD-TFL1, se une a menudo a proteínas ancladas a la membrana cuyos dominios expuestos *in vivo* son diferentes a los que se encuentran en la proteína libre, por lo que solamente los clones incompletos mantienen su capacidad para interactuar. Por otro lado, no podemos descartar que el método de síntesis de la librería, partiendo de cDNA, desembocara en la aparición de clones incompletos que generen falsos positivos. No obstante, se requerirían más análisis para poder comprobar o descartar estas interacciones.

3.1.2 Rastreo de doble híbrido frente a una genoteca de factores de transcripción

El segundo de los experimentos planteados tenía como objetivo profundizar en el estudio de TFL1 como cofactor transcripcional, estudiando con qué factores de transcripción es capaz de formar complejos.

Para el rastreo de doble híbrido se obtuvieron levaduras diploides que expresaban las construcciones *cebo* y *presa*. Para ello se llevó a cabo el *mating* entre la levadura haploide pJ69-4 α que contenía el plásmido *cebo* que expresaba la proteína recombinante BD-TFL1, y una colección de levaduras pJ69-4A que contenían los distintos plásmidos *presa*, en este caso los cDNA de más de 1700 factores de transcripción de Arabidopsis fusionados cada uno de ellos al dominio de activación de *GAL4* en el vector pDEST22. Las levaduras diploides resultantes que contenían los plásmidos *cebo* y *presa* se sembraron en medio selectivo SD(-L-W-H) 3AT 1 μ M y se crecieron a 21°C entre 5-7 días. Como resultado, se identificaron como posibles interactores de TFL1 a ABF1, ABF2, ABF3, DPBF2, DKM, AREB3, FBH1, TPC16 y AGL15 (Tabla R3.2).

ID	Nombre	Familia	Función
AT3G44460	DPBF2	bZIP	Dormición de la semilla. Promueve la tolerancia a estrés hídrico
AT1G45249	ABF2	bZIP	Respuesta a ABA. Promueve la tolerancia a estrés hídrico
AT1G49720	ABF1	bZIP	Mediador en la respuesta a ABA
AT2G21230	DKM	bZIP	Desarrollo del carpelo. Control del tamaño del meristemo
AT3G56850	AREB3	bZIP	Desarrollo del embrión y maduración de la semilla.
AT3G45150	TCP16	TCP	Mantenimiento del meristemo
AT4G34000	ABF3	bZIP	Señalización de ABA en la respuesta a estrés
AT5G13790	AGL15	MADS	Control del desarrollo post-germinativo. Control de la floración
AT1G35460	FBH1	bHLH	Elemento del reloj circadiano. Control de la floración vía ruta del fotoperiodo.

Tabla R3.2. Interactores de TFL1 identificados en el rastreo de doble híbrido de una genoteca de factores de transcripción con TFL1 como *cebo*.

3.1.3. Rastreo de tríple híbrido en levadura del complejo TFL1-FD frente a una genoteca de cDNA de Arabidopsis

Uno de los principales interactores de TFL1 cuando actúa como regulador transcripcional es el factor de transcripción de tipo bZIP, FD. Durante la transición floral FD forma junto con TFL1, y proteínas del tipo 14-3-3, un complejo de represión de la floración capaz de regular la transcripción de los genes implicados en la formación de las flores (Taoka et al., 2011; Ho and Weigel, 2014; Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018). Así el análisis de los datos de ChIP-Seq de TFL1 y FD mostró que TFL1 comparte gran parte de sus dianas con FD, por lo que es probable que ambos compartan interactores comunes y/o que FD medie en la interacción de TFL1 con otras proteínas.

Con el fin de analizar el posible papel mediador de FD en las interacciones de TFL1 con otras proteínas realizamos un nuevo rastreo de triple híbrido en el que utilizamos de nuevo la proteína de fusión BD-TFL1 como *cebo* e incorporamos FD a modo de *punte*, utilizando el complejo TFL1-FD para rastrear una genoteca de cDNA de inflorescencia de Arabidopsis. Para este rastreo co-transformamos células de levadura pJ69-4 α con los plásmidos *cebo* pDEST:BD-TFL1, y *punte* pTFT::FD. Previamente a la realización del ensayo, se analizó si estas construcciones eran capaces de activar la expresión del gen reportero de biosíntesis de Histidina sin que estuviese presente el dominio de activación. Para ello se creció durante 3 días a 28°C la levadura transgénica que contenía los plásmidos *cebo* y *punte* en medio selectivo SD(-L-A-H) suplementado con diferentes concentraciones de 3AT y se analizó el crecimiento de colonias. No se apreció crecimiento de la levadura en el medio selectivo, por lo que podemos concluir que ninguna de las dos proteínas es capaz de activar por sí sola la expresión del gen reportero de biosíntesis de Histidina (Fig. R3.3 A).

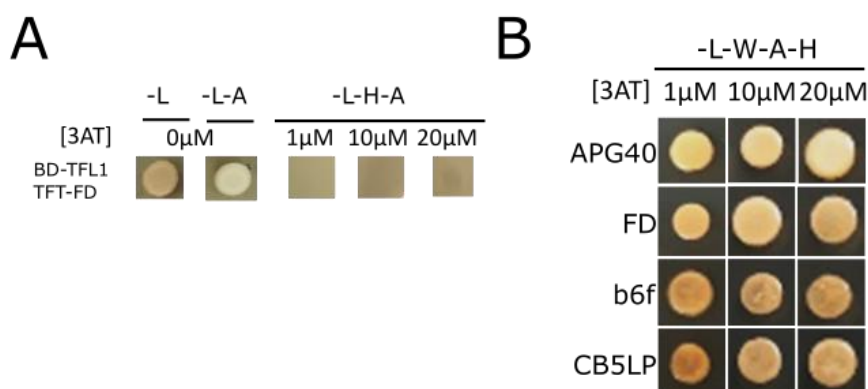


Figura R3.3 Rastros de triple híbrido en levadura para la identificación de interactores de TFL1. A) Prueba de la capacidad de autoactivación de los plásmidos *cebo* pDEST32:BD-TFL1 y *punte* pTFT-FD. Se muestra el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos *cebo* y *punte* en medio no selectivo SD(-L) y SD(-L-A) y en medio selectivo SD(-L-H) con diferentes concentraciones de 3AT (1, 10 y 20 μ M). B) Clones completos de entre los positivos del rastreo de triple híbrido con la combinación de plásmido *cebo* + *punte* pDEST32:BD-TFL1 pTFT-FD frente a la genoteca de cDNA de inflorescencia. Se muestra el crecimiento de las levaduras transformadas con los plásmidos *cebo* y *presa* a en medio selectivo SD(-L-W-A-H) suplementado con 3 concentraciones diferentes de 3AT (1, 10 Y 20 μ M).

Para la realización del rastreo de triple híbrido se transformaron células de la levadura transgénica pJ96-4 α que contenía los plásmidos *cebo* y *punte* con la misma librería de expresión de cDNA utilizada en el apartado 3.1.1. Las levaduras transformantes se crecieron durante 5 días a 21°C en cajas con medio selectivo SD(-L-A-W-H) 1 μ M 3AT. Transcurrido este tiempo se recogieron las colonias obtenidas y se crecieron de nuevo durante 3 días a 21°C en cajas con medio selectivo SD(-L-H-A-W) con concentraciones crecientes de 3AT. Finalmente, los plásmidos *presa* presentes en los clones positivos se analizaron mediante PCR de colonia y posterior secuenciación Sanger. En este rastreo se identificaron 22 interactores putativos entre los cuales

solamente cuatro correspondían a clones completos, las proteínas FD, APG40, b6f, CB5LP (Fig. R3.3 B). Por los que respecta a los 18 interactores incompletos no podemos descartar que se trate de interactores genuinos del complejo TFL1-FD, sin embargo, para confirmarlo se requieren estudios adicionales (Tabla R3.3).

	ID	Nombre	Nº Clones	Tamaño clon	Complete	L-W--A-H +3AT[μ M]					Tipo proteína
						1	5	10	15	20	
1	AT3G20865	APG40	1	450	Yes	+	+	+	+	+	ARABINO GALACTAN PROTEIN 40
2	AT4G35900	FD	1	670	Yes	+	+	+	+	+	Factor de transcripción tipo bZIP
3	AT5G02450	L36e	1	440	No	+	+	+	+	+	Proteína ribosomal L36e
4	AT3G27380	SDH2	1	780	no	+	+	+	+	+	Succinato deshidrogenasa
5	At3g04840;	S3Ae	1	780	Yes	+	+	+	+	+	Proteína ribosomal S3Ae
6	At2g10940		1	240	No	+	+	+	+	+	Inhibidor bifuncional de la transferencia lípido-proteína.
7	AT5g24780	VSP1	1	700	No	+	+	+			Acido fosfatasa de unión al ácido Jasmónico
8	At2g26500	b6f	1	580	Yes						Subunidad del citocromo b6f (petM)
9	AT2G38540	LP1	1	660	Yes	+	+	+	+	+	proteína de transferencia lípidos
10	At1g60660	CB5LP	1	630	Yes	+					Proteínas del citocromo b5-Like
11	AT4G33220	PME44	1	490	No	+		+			Pectin metilesterasa 44
12	At5g40942	RNR2B	1	400	No	+	+	+	+	+	Ribonucleótido reductasa 2B
13	AT5g07350	Tudor1	1	930	No	+	+	+	+	+	Proteína de unión al RNA. Respuesta a estrés
14	AT4g01050	TROL	1	650	No	+	+	+	+	+	Rodanasa del tilacoide-like
15	At1g09590		1	500	No	+	+	+	+	+	Proteína de traducción de la familia SH3
17	AT1G67090	RBCS1A	1	780	No	+	+	+	+	+	Ribulosa bisfosfato carboxilasa
18	AT4G29030		1	300	Yes	+	+	+	+	+	Lipoproteína de membrana
19	AT3G49010	BB1	1	300		+	+		+		Proteína ribosomal, del ribosoma 60S
21	At1g27090		1	850	No	+	+	+			
22	AT4G13940	HOG1	1	500	No	+	+	+			Adenosilhomocisteinasa
23	AT4G10850	SWEE7	1	200	No	+					

Tabla R3.1. Interactores de TFL1 identificados en el rastreo de triple híbrido de una genoteca de cDNA de inflorescencia con TFL1 como *cebo*. Los colores indican el crecimiento de la levadura a diferentes concentraciones de 3AT, verde con símbolo + para buen crecimiento y amarillo ligero crecimiento.

3.1.4. Rastreo de triple híbrido en levadura del complejo TFL1-FD frente a una genoteca de factores de transcripción de Arabidopsis

Finalmente se realizó un segundo rastreo de triple híbrido en el que se probó la capacidad del complejo FD-TFL1 de interactuar con otros factores de transcripción. Para ello se llevó a cabo el *mating* entre la levadura transgénica pJ96-4 α que contenía los plásmidos *cebo* (pDEST32::BD-TFL1), y *puente* (pTFT::FD), y una colección de levaduras pJ69-4A que contenían los diferentes plásmidos *presa*, en este caso los cDNAs de más de 1700 factores de transcripción de Arabidopsis fusionados al dominio de activación de GAL4 en el vector pDEST22. Las levaduras recombinantes resultantes se crecieron en medio selectivo SD(-L-W-A-H) 1 μ M 3AT, durante 5 días a 21°C. Como resultado de este ensayo se identificaron como interactores del complejo TFL1-FD las proteínas LEC2, LAF1 y los TCPs: TCP22, TCP15, TCP23, TCP19 y TCP7 (Tabla R3.4).

ID	Nombre	Familia	Función descrita
AT1G72010	TCP22	TCP	Desarrollo de la hoja
AT1G69690	TCP15	TCP	Control de la endoreduplicación. Control de la síntesis de antocianinas
AT1G35560	TCP23	TCP	Desarrollo de la hoja
AT1G28300	LEC2	B3	Desarrollo de la semilla y el embrión
AT5G51910	TCP19	TCP	
AT4G25560	LAF1	R2R3	Fotomorfogenesis
AT1G66370	MYB113	MYB	Regulación de antocianinas
AT5G66770		GRAS	Participa en el loop PAP1-TAS1 en respuesta a Azúcares
AT5G45300	BMY2	β -amilasa	Respuesta a estrés
AT5G23280	TCP7	TCP	Control of endoreduplication
AT3G12730		n.d.	n.d.
AT1G63840		RING/U-box	n.d.
AT4G31060		ERF/AP2	n.d.

Tabla R3.4. Interactores de TFL1 identificados en el rastreo de triple híbrido de una genoteca de factores de transcripción con el complejo TFL1-FD como *cebo*. “n.d.”: no disponible.

3.2. Abordaje para la identificación de complejos en los que participa TFL1 *in vivo* mediante coinmunoprecipitación

Los rastreos de doble y triple híbrido son herramientas muy útiles que han permitido identificar un gran número de posibles interactores de TFL1, como es el caso de los factores de transcripción bZIP30, bZIP52 y bZIP59, entre otros (Niwa et al., 2013; Pnueli et al., 2016, Mendez, 2013). No obstante, ambos son sistemas experimentales que emplean un organismo heterólogo, la levadura, en el que las proteínas pueden presentar modificaciones postraduccionales, y/o conformaciones distintas a las que tienen *in planta*, de modo que los dominios de interacción que queden expuestos en ambos organismos sean diferentes. Es posible, por tanto, que algunas de las interacciones identificadas en levadura no tengan lugar *in planta* y viceversa.

Para analizar si los interactores identificados en los rastreos en levadura forman complejos con TFL1 en la planta *in vivo*, e identificar nuevos interactores *in planta*, se realizó un experimento de Co-Inmunoprecipitación (Co-IP), y posterior identificación de los complejos aislados mediante espectrometría de masas (MS-MS). Este ensayo se basa en la precipitación de complejos proteicos mediante un anticuerpo específico, en nuestro caso un anticuerpo anti-GFP, y la posterior identificación y cuantificación de las proteínas presentes en los complejos aislados mediante espectrometría de masas (Free et al., 2009).

3.2.1. Obtención de una línea pTFL1:GFP-TFL1 35S:AP1-GR *ap1cal*

Para el experimento de Co-Inmunoprecipitación se generó una construcción que expresaba la proteína de fusión GFP-TFL1 bajo el control del promotor completo de *TFL1* (2,2Kb de la región 5' intergénica y 4,6Kb de la región 3' intergénica) (en adelante, pTFL1:GFP-TFL1), así como una construcción control que expresaba la proteína GFP bajo el control del promotor

completo de *TFL1*, (En adelante pTFL1:GFP). Dado que *TFL1* se expresa mayoritariamente en las células del meristemo inflorescente (Bradley et al., 2007; Serrano-Mislata et al., 2016), el material idóneo para realizar el experimento de CoIP son las células de ese meristemo. Puesto que el ensayo de CoIP necesita una gran cantidad de material vegetal, ambas construcciones se transformaron en un fondo mutante 35S:AP1-GR *ap1cal*, para aprovechar el hecho de que de que las plantas *ap1cal* presentan una gran proliferación de meristemos inflorescentes, que se acumulan formando pequeñas coliflores (Bowman et al., 1993). Para el ensayo de CoIP, basado en el nivel de expresión y en la localización de la GFP, según se observaba en el microscopio confocal, se seleccionaron 3 líneas transgénicas T3 independientes para la construcción pTFL1:GFP-TFL1, #4.5, #29.6, #32.1, y 2 líneas para la construcción control pTFL1:GFP, #5.1, #9.3 (Fig. R3.3).

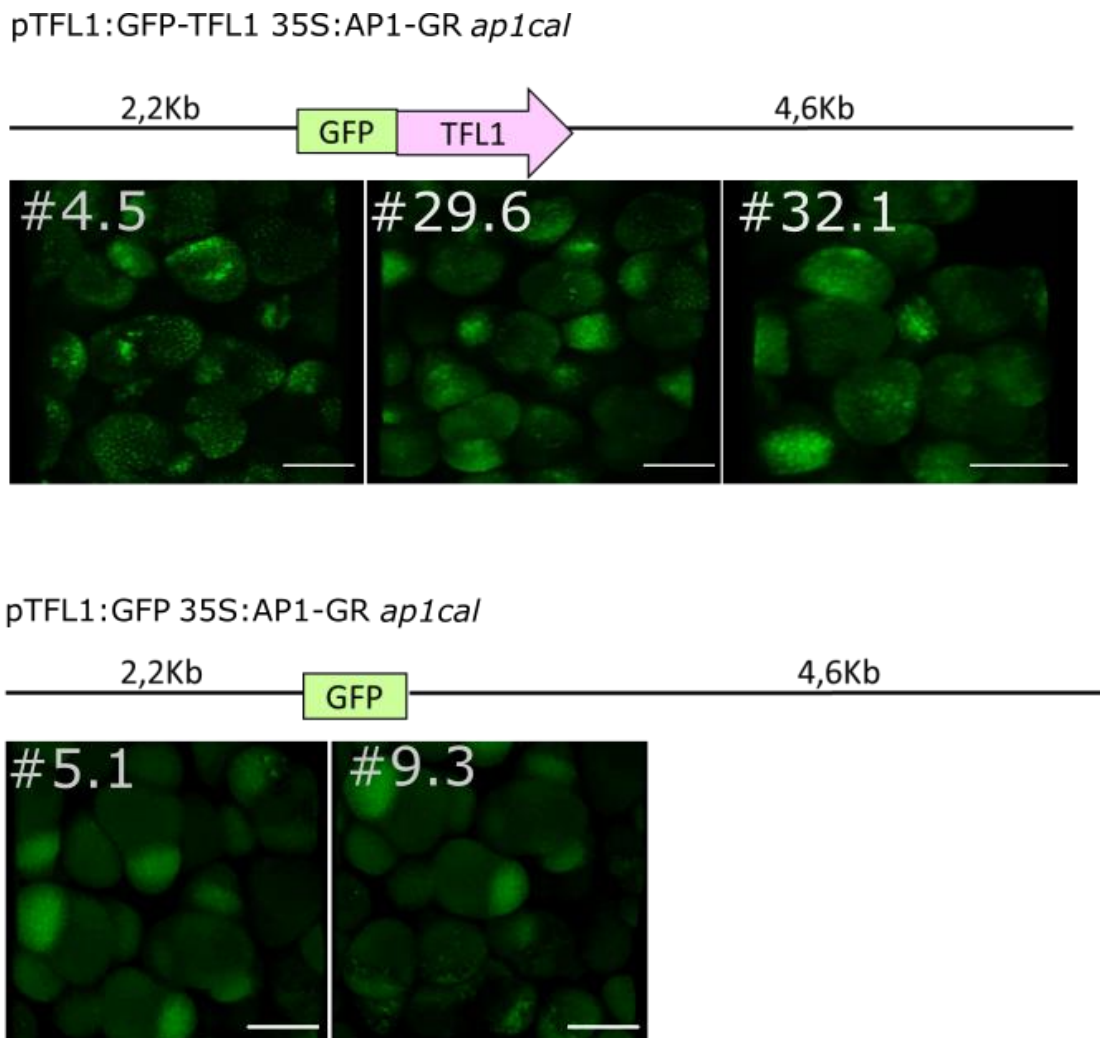


Figura R3.3 Distribución de las proteínas GFP-TFL1, y GFP en los meristemos de las líneas pTFL1:GFP-TFL1 35S:AP1-GR *ap1ca* y pTFL1:GFP 35S:AP1-GR *ap1cal*. Esquema de las construcciones utilizadas en cada caso e imágenes de fluorescencia al microscopio confocal. La proteína de fusión GFP-TFL1 se observa tanto en núcleo como en citoplasma de las células meristemáticas, mientras que la proteína GFP se observa preferencialmente en el citoplasma.

3.2.2. Análisis de la funcionalidad de la proteína de fusión GFP-TFL1

Para comprobar que la proteína de fusión GFP-TFL1 expresada por la construcción pTFL1:GFP-TFL1 era funcional se evaluó su capacidad para complementar el fenotipo mutante *tfl1-1*. Para ello transformamos plantas homocigotas mutantes *tfl1-1* con la construcción pTFL1:GFP-TFL1 y se analizó en la generación T1 la aparición de flor terminal característica del mutante *tfl1-1*. De las 45 plantas T1 pTFL1:GFP-TFL1 analizadas sólo 4 (8.9%) desarrollaron una flor terminal en el ápice principal, mientras que el resto mostraron crecimiento indeterminado. Por el contrario, todas las plantas control *tfl1-1* sin transformar, analizadas en paralelo, exhibían el ápice principal determinado, acabado en una flor terminal (Fig. R3.4).

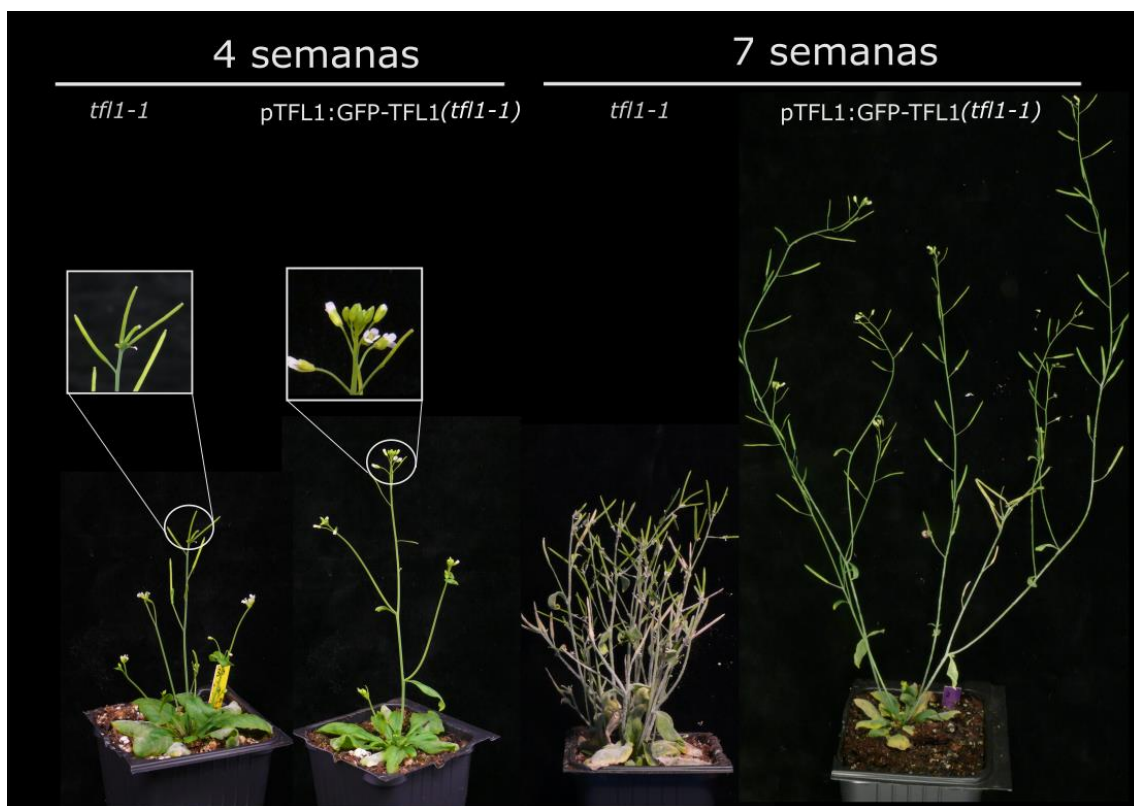


Figura R3.4. Fenotipo del mutante *tfl1-1* y de la línea de complementación pTFL1:GFP-TFL1 *tfl1-1*. Plantas cultivadas en día largo durante 4 y 7 semanas, correspondientes al mutante *tfl1-1* y a la línea de complementación pTFL1:GFP-TFL1 *tfl1-1*. Se aprecia que la construcción pTFL1:GFP-TFL1 35S:AP1-GR *ap1 cal* es capaz de complementar el fenotipo de inflorescencia determinada característico del mutante *tfl1-1*

3.2.3. CoIP-MS para la identificación de complejos formados por TFL1 *in vivo*

Para el experimento de Co-Inmunoprecipitación se cultivaron más de 80 plantas de la línea pTFL1:GFP-TFL1 35S:AP1-GR *ap1 cal* y de la línea control pTFL1:GFP 35S:AP1-GR *ap1 cal*, en condiciones de día largo, durante aproximadamente 8 semanas, hasta que se empezaron a formar las “coliflores” características del fondo mutante *ap1 cal*. A partir de este momento se realizaron 3 tandas de recogida de material espaciadas 5 días entre ellas, en las que se

recogieron únicamente las “coliflores”, hasta obtener un mínimo de 1g de tejido de cada una de las líneas. Seguidamente, se procedió al aislamiento de núcleos y la purificación de los complejos proteicos siguiendo el protocolo descrito por Jamge et al. (2017), utilizando anticuerpo anti-GFP. Finalmente se llevó a cabo el análisis para la identificación de las proteínas en los complejos aislados en el servicio de proteómica del Wageningen University & Research, utilizando un espectrómetro de masas con trampa de iones Orbitrap-LTQ XL.

El análisis de los datos obtenidos del espectrómetro de masas no mostró presencia de TFL1 ni tampoco de la proteína sujeto de la inmunoprecipitación, la GFP, en las muestras resultantes de ninguna de las dos inmunoprecipitaciones (Fig. R3.5). Esto puede deberse a que las condiciones utilizadas para el aislamiento de núcleos y/o para la inmunoprecipitación son demasiado astringentes, de modo que un gran número de las proteínas se perdieron. Es necesario, por tanto, optimizar dichas condiciones en un futuro previamente a la repetición de este experimento.

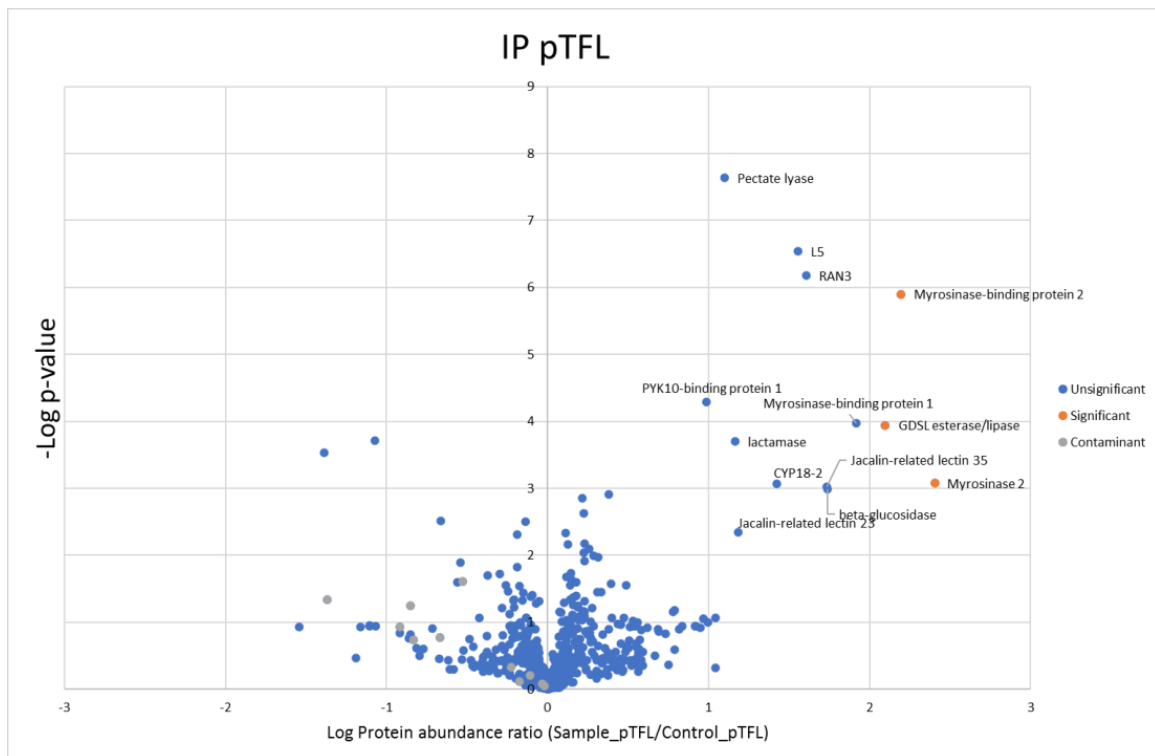


Figura R3.6. Espectro obtenido mediante análisis por espectrometría de masas de los complejos proteicos obtenidos tras la inmunoprecipitación.

DISCUSIÓN

1. TFL1 actúa como co-regulador transcripcional con el factor de transcripción de tipo bZIP FD

Se sabe que TFL1 es un regulador clave del tiempo de floración y la arquitectura de la inflorescencia de *Arabidopsis*. Se ha descrito que TFL1 actúa como regulador transcripcional, controlando la expresión, entre otros, de los genes de floración (Ratcliffe et al., 1999; Hanano and Goto, 2011). Sin embargo, al igual que su homólogo FT, TFL1 no es un factor de transcripción (Mimida et al., 2001; Karlgren et al., 2011) y se ha propuesto que para actuar como regulador transcripcional forma un complejo con el factor de transcripción de tipo bZIP, FD, de forma análoga al mecanismo propuesto para su homólogo FT (Hanano and Goto, 2011). Sin embargo, y pese a que este modelo se encuentra ampliamente aceptado, hasta el momento no existen evidencias experimentales que demuestren la unión del complejo TFL1-FD al DNA para regular la expresión génica.

La utilización de fusiones del dominio del receptor de glucocorticoides (GR) a factores de transcripción es una estrategia ampliamente utilizada en plantas para la identificación de las dianas directas de dichos factores de transcripción (Sablowski and Meyerowitz, 1998; Yamaguchi et al., 2015). Esta estrategia está basada en la producción de proteínas de fusión entre los factores de transcripción y el dominio GR, que se mantienen retenidas en el citoplasma hasta la aplicación de Dexametasona, que permite su entrada al núcleo donde se espera desarrollen su actividad activando o reprimiendo la expresión de sus genes dianas (Picard, 1993). La entrada uniforme y concentrada en un momento puntual del factor de transcripción al núcleo promueve una activación o represión puntual y controlada de sus genes dianas, lo que proporciona un escenario perfecto para la identificación de dichas dianas mediante análisis transcriptómico por RNA-Seq. Es incuestionable que este tipo de estudios se realizan en condiciones “artificiales”, que difícilmente se reproducirían en las plantas silvestres sin tratar, no obstante esta misma aproximación se ha utilizado con éxito en el estudio, entre otros, de los factores AP1 (Kaufmann et al., 2010) o LFY (Wagner et al., 1999). Además, en el caso particular de nuestras líneas 35S:TFL1-GR *tfl1-1* se ha observado que el tratamiento con Dexametasona es capaz de revertir el fenotipo característico del fondo mutante *tfl1-1*, retrasando significativamente el tiempo de floración y evitando la determinación de los meristemas apicales (Fig. R1.1). Esto demuestra que la construcción 35S:TFL1-GR es funcional y que la proteína de fusión TFL1-GR mantiene la misma funcionalidad que la proteína nativa TFL1. Por otro lado, este resultado sugiere que la proteína TFL1 actúa en el núcleo, observación que concuerda con los resultados obtenidos en los distintos experimentos de BiFC, que muestran que la mayor parte de complejos formados por TFL1 con otros factores de transcripción, como FD, se localizan en el núcleo (Hanano and Goto, 2011, y resultados de esta tesis).

Los resultados del análisis mediante RNA-Seq del transcriptoma de la línea activable 35:TFL1-GR *tfl1-1* #7.9 muestran que una gran cantidad de genes varían su expresión con la activación de TFL1 (con su entrada en el núcleo), proporcionando una primera evidencia de su papel como regulador transcripcional (Fig. R1.5 A). De acuerdo con el modelo propuesto, TFL1 actúa como represor transcripcional reprimiendo la expresión de los genes florales (Hanano and Goto, 2011). Según eso, sería esperable que una gran parte de los genes identificados como diferencialmente expresados en este RNA-Seq se encontraran regulados a la baja. No obstante, sólo 462 (33,5%) de los 1379 genes diferencialmente expresados se encuentran regulados a la baja (Fig. R1.5, A). El papel de TFL1 como represor transcripcional se ha propuesto en el contexto de la floración y la iniciación floral, de acuerdo con esto la expresión de muchos genes implicados en el control de la floración o la iniciación floral como *LFY*, *LHY*, *CAL*, o *FUL* se encuentra reprimida por la entrada de TFL1 en el núcleo. Sin embargo, no podemos descartar que TFL1 participe además en otros procesos diferentes del control de la floración, pudiendo actuar como activador en alguno de ellos. Un estudio reciente llevado a cabo por Zhu *et al.*, 2020, muestra que el complejo TFL1-FD puede actuar también como activador de la expresión de *LFY* en los primordios florales posiblemente vía FT. Por otro lado, el análisis transcriptómico de nuestras líneas 35S:TFL1-GR *tfl1-1* se llevó a cabo en un momento puntual del desarrollo, tomando muestras a un único tiempo, en concreto a los 7 días del paso de día corto a día largo, y 24h después del tratamiento con Dexametasona. En este punto la expresión de los genes *AP1* y *LFY*, que en este estudio se han utilizado como marcadores de la transición, ha empezado a subir por lo que nos encontramos en el principio de la transición floral. Sin embargo, la expresión de *TFL1* en plantas silvestres se incrementa de forma significativa con la transición floral en el centro del meristemo apical del tallo, y se mantiene a lo largo de la transición y el desarrollo reproductivo decreciendo y restringiéndose al centro del SAM de forma progresiva (Serrano-Mislata *et al.*, 2016). Podría ocurrir, por tanto, que parte de sus dianas no se encuentren activas en el momento elegido, por lo que no podemos ver un cambio a la baja en su expresión. Es por ello que no podemos descartar que, si se efectuara el muestreo en otro momento, la proporción de dianas activadas y reprimidas cambiase.

Hasta el momento no se han encontrado pruebas que muestren la capacidad de TFL1 para unirse al DNA de forma directa, por lo que podemos asumir que éste lleva a cabo su función como regulador transcripcional a través de su unión con factores de transcripción. Los resultados obtenidos del análisis mediante CHIP-Seq de la línea pTFL1:GFP-TFL1 *tfl1-1* muestran que TFL1 es capaz de unirse al promotor de numerosos genes, apuntando de nuevo a su papel como regulador transcripcional. Cabe destacar, además, que el análisis de los motivos a los que

se una preferencialmente TFL1 nos ha permitido identificar la caja G-box como el motivo más sobrerrepresentado (Fig. R1.9, B), sugiriendo que TFL1 pueda actuar mediante su unión con factores de transcripción de tipo bZIP o bHLH, cuyo motivo de unión descrito es el G-box (Sibérl et al., 2001; Jones, 2004). En consonancia con este resultado, se ha descrito que TFL1 interacciona físicamente con los factores de transcripción de tipo bZIP, FD y FDP (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Jaeger et al., 2013; Romera-Branchat et al., 2020). Dado que, tanto TFL1 como FD, participan en procesos comunes como el control genético de la floración en *Arabidopsis*, y que interaccionan físicamente, sería esperable que ambos compartieran gran parte de sus dianas. La comparación de los genes unidos por TFL1 en nuestro ChIP-Seq y los datos publicados para FD muestra que aproximadamente un tercio de los genes a los que se encuentra unido TFL1 se encuentran unidos también por FD. Concordantemente, un estudio reciente en el que se analizan mediante ChIP-Seq las dianas de TFL1 y FD con una aproximación similar a la realizada en este trabajo, muestra también como una importante proporción de los sitios unidos por TFL1 se encuentran unidos también por FD, si bien el porcentaje de genes comunes entre TFL1 y FD es ligeramente distinto debido posiblemente a las diferencias en el diseño experimental (Zhu et al., 2020). Nuestros resultados, junto con los obtenidos por Zhu et al., (2020) confirman a FD como un importante interactor de TFL1. Al mismo tiempo, el hecho de que FD no se encuentre unido a dos tercios de las dianas de TFL1, sugiere que TFL1 pueda actuar formando complejos con otros factores de transcripción. Cabe recordar también que si bien el gen TFL1 se expresa en el centro del SAM vegetativo, y a nivel más alto durante la transición floral, donde lleva a cabo su función como represor de los genes de floración y de iniciación floral, se ha descrito que TFL1 se expresa además en la raíz, y en la vasculatura del tallo (Serrano-Mislata et al., 2016, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Fig. D1). En consecuencia, esto sugiere que TFL1 pueda participar también en otros procesos diferentes del control de la floración, y para ello requiera de su unión a otros bZIPs o bHLH diferentes de FD y FDP.

2. Nuevos complejos proteicos en los que participa TFL1

Se sabe que tanto TFL1 como su homólogo FT participan, además de en la regulación de la floración, en otros procesos. Por ejemplo, en el caso de FT se ha visto que participa en procesos como el desarrollo de las inflorescencias laterales, o la apertura estomática, y en el de TFL1 se ha descrito que participa en el transporte de proteínas a la vacuola (Sohn et al., 2007; Kinoshita et al., 2011; Niwa et al., 2013). Para ello TFL1 y FT posiblemente interaccionan formando complejos con factores de transcripción diferentes de FD, por ejemplo, se ha visto que FT interacciona con el factor de transcripción tipo TCP, *BRANCHED1* (*BRC1*) para controlar el

desarrollo de las inflorescencias laterales (Niwa et al., 2013). En este sentido, ensayos de doble híbrido en levadura, y de complementación bimolecular de luciferasa han mostrado que tanto FT como TFL1 son capaces de interactuar con diferentes factores de transcripción de la familia de los TCP (Ho and Weigel, 2014). Se ha descrito además que tanto TFL1 como FT interactúan también con otros tipos de proteínas y moléculas, por ejemplo, se ha visto que FT se une a diferentes tipos de fosfatidilcolina (PC) en el ápice para promover la floración (Nakamura et al., 2014). Por otra parte, SELF-PRUNING (SP), el homólogo de TFL1 en tomate, es capaz de interactuar con la quinasa NIMA *Like kinase* (SPAK), así como con diferentes isoformas de las proteínas 14-3-3, con las que participa en el control de la arquitectura en tomate (Pnueli et al., 2001). Asimismo, se sabe que la interacción de FT con FD en *Arabidopsis* así como de sus respectivos homólogos en arroz, Hd3a y OsFD, se encuentra mediada por proteínas del tipo 14-3-3 (Niwa et al., 2013; Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018). Todos estos datos ponen de manifiesto la elevada importancia de la interacción de TFL1 y FT con otras proteínas y moléculas para ejercer su función. Aunque estos estudios han aportado información muy relevante acerca de las diferentes funciones en las que participa TFL1 y el papel que la interacción con diferentes proteínas tiene en ellas, el mapa de los interactores de TFL1 todavía no se conoce en detalle. En esta tesis hemos llevado a cabo una primera aproximación en el estudio de los interactores de TFL1 mediante la realización de diferentes rastreos de doble y triple híbrido en levadura, lo que nos ha permitido identificar, además de algunos interactores ya descritos, como FD, o los TCPs 7, 15, 19, 22 y 23, nuevos interactores como los factores de transcripción ABF1/2/3, el bHLH FBH1, o las proteínas DIR1, GF14 y P5CS2 (Tablas R3.1, R3.2, R3.3, R3.4).

En primer lugar, los rastreos con TFL1 de una genoteca de cDNA de inflorescencia nos han permitido identificar nuevos interactores fuera de la familia de los factores de transcripción, como la DELTA 1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 2 (P5CS2), o el G-Box REGULATING FACTOR6 (GF14 λ). El gen *P5CS2*, cuya expresión se activa en respuesta a ABA y que codifica una proteína implicada en la biosíntesis de prolina, un aminoácido que participa en importantes procesos como la respuesta al estrés, el control de la transición floral y el desarrollo del gametofito masculino (Strizhov et al., 1997; Abraham et al., 2003; Mattioli et al., 2008). El mutante homocigoto *p5cs2-1* muestra defectos graves en el desarrollo del embrión, y letalidad, y el doble mutante *p5cs2+/- p5sc1* presenta un importante retraso en el tiempo de floración en día largo (Székely et al., 2008; Ramon et al., 2009). Por otro lado, se ha visto que la expresión de *P5CS2* está directamente regulada por CO, factor central en la ruta inductora de la floración por fotoperiodo (Samach et al., 2000). Se sabe que el ABA actúa como señalizador promoviendo cambios en el desarrollo y el tiempo de floración vía importantes integradores de las rutas de floración como

SOC1 y *GI* en condiciones de estrés hídrico (Riboni et al., 2014; Riboni et al., 2016). Todo esto, unido al hecho de que una parte de los genes diana de TFL1 identificados en este estudio (Goretti et al., 2020), así como en el llevado a cabo por Zhu *et al.* 2020, tienen relación con la respuesta a ABA, sugiere un posible papel de TFL1 en el control de la floración en condiciones de estrés mediada por ABA. También hemos podido identificar como interactor de TFL1 a GF14λ, una proteína perteneciente a la familia de las 14-3-3. Se ha visto que el homólogo de TFL1 en tomate SP, también interacciona con proteínas del tipo 14-3-3 (Pnueli et al., 2001). Por otro lado, se ha visto que proteínas tipo 14-3-3 como GFD3, y GF14 interaccionan también con la proteína FT de Arabidopsis y arroz respectivamente (Taoka et al., 2011; Niwa et al., 2013). Del mismo modo se ha descrito que los homólogos de TFL1 y FT en arroz RCN y Hd3a forman complejos proteicos con FD y proteínas tipo 14-3-3 con capacidad represora (FRC) en el caso de RCN, y activadora con Hd3a (FAC). La formación de uno u otro complejo depende del balance entre TFL1 y FT, ya que ambas proteínas compiten por unirse a las proteínas 14-3-3 (Miho Kaneko-Suzuki et al., 2018). Resulta interesante que sólo una pequeña proporción de los interactores identificados en los rastreos de la genoteca de cDNA fuesen factores de transcripción, y que en este rastreo no se detectaran algunos de los interactores descritos de TFL1 como FD. Una explicación plausible es que para la obtención de la genoteca se empleó cDNA de inflorescencia sobre el que no se realizó ningún tipo de tratamiento de normalización de los cDNAs de cada gen presentes en dicha mezcla, para que todos se encontraran representados de forma equimolar. Es por tanto probable que proteínas más abundantes, de biosíntesis, o proteínas pequeñas multifuncionales como las 14-3-3, estuviesen sobrerrepresentadas en la genoteca, por lo que haya sido más fácil aislarlas como interactores.

La realización de rastreos frente a genotecas de factores de transcripción nos permite realizar un estudio más exhaustivo de la capacidad de TFL1 de interaccionar con proteínas de este tipo, incluyendo aquellas cuyo bajo nivel de expresión *in planta* las haría difíciles de encontrar en genotecas de cDNA. En estos rastreos, se identificaron un total de 9 factores, putativos interactores de TFL1, 6 de la familia de factores de transcripción de tipo bZIP, un bHLH, FBH1, un factor de transcripción de tipo MADS, AGL15, y TCP16 (Tabla R3.2). Este resultado concuerda con los datos obtenidos en el ChIP-Seq que mostraban como dominio de unión más sobrerrepresentado para el complejo TFL1-factor de transcripción, era el G-Box, CACGTG, al que se ha descrito que se unen los factores tipo bZIP y bHLH (Ezer et al., 2017; Dröge-Laser et al., 2018; Collani et al., 2019; Goretti et al., 2020).

Se ha visto que FBH1 participa en la regulación del reloj circadiano en Arabidopsis, regulando la transcripción de *CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)*, en respuesta a altas

temperaturas (Nagel et al., 2014), siendo *CCA1* uno de los genes a cuyo promotor se encuentra unido a TFL1 en nuestro CHIP-Seq, y cuya expresión se encuentra afectada por la activación de TFL1 en nuestro RNA-Seq. Por otro lado, se ha visto que *FBH1*, cuya sobreexpresión produce un adelanto en el tiempo de floración, es un regulador positivo de *CO* y *FT*, ambos genes clave en el control de la floración mediante la ruta del fotoperiodo, (Ito et al., 2012). El hecho de que FBH1 interactúe con TFL1 físicamente podría sugerir que TFL1 actúe secuestrando FBH1 previniendo así su unión al promotor de *CO* y reprimiendo por tanto la floración. Por otro lado, se ha visto que tanto TFL1 como FT se unen directamente al promotor de *CO* por lo que otra posibilidad es que la unión del complejo TFL1-FBH1 actúe reprimiendo *CO* mientras que la unión de FBH1 sólo o formando complejos con otras proteínas active *CO* (Zhu et al., 2020).

Los resultados del rastreo de TFL1 frente a la genoteca de factores llevado a cabo en este trabajo, así como del rastreo llevado a cabo por Méndez (2012) muestran una clara preferencia de TFL1 por unir factores de transcripción de tipo bZIP. Resulta interesante señalar que todos los bZIPs identificados hasta el momento como interactores de TFL1 pertenecen a los grupos A e I (Jakoby et al., 2002; Abe et al., 2005; Niwa et al., 2013; Méndez 2012). El grupo A de los bZIPs se encuentra compuesto por 13 proteínas, entre las cuales se encuentran importantes interactores de TFL1 y FT ya descritos, como FD y FDP, implicados en el control de la floración (Abe et al., 2005; Jaeger et al., 2013; Romera-Branchat et al., 2020). Sin embargo, en nuestro rastreo identificamos otros 5 nuevos bZIPs de clase A, ABF1,2,3, DPBF2 y AREB3 todos ellos implicados en la señalización por ABA (Yoshida et al., 2015; Banerjee and Roychoudhury, 2017). Se ha descrito que los genes *ABF3* y *ABF4* participan en el control genético de la floración en respuesta a estrés hídrico, regulando directamente la expresión de *SOC1* (Hwang et al., 2019). Por otra parte, el análisis de las dianas de TFL1 mediante CHIP-Seq mostró que TFL1 se une al promotor de un considerable número de genes implicados en la señalización por ABA, como ABA INSENSITIVE 2 (*ABI2*), ABA INSENSITIVE 5 (*ABI5*) y HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 1 (*HAI1*) (Rodríguez et al., 1998; Brocard et al., 2002; Nishimura et al., 2007; Bhaskara et al., 2012; Zhang et al., 2020). Además el análisis del RNA-Seq de la línea 35S:TFL1-GR mostró que algunos de estos genes a cuyo promotor se encuentra unido TFL1, se encuentran regulador a nivel transcripcional por TFL1, como ABI FIVE BINDING PROTEIN 2 (*AFP2*), ABI FIVE BINDING PROTEIN 3 (*AFP3*) y ABI FIVE BINDING PROTEIN 4 (*AFP4*) (García et al., 2008; Goretti et al., 2020). Un estudio reciente muestra que TFL1 regula el tamaño de semilla mediando el tráfico de GTPasas en el edospermo y estabilizando a *ABI5* (Zhang et al., 2020). Se ha visto además que el parólogo de *TFL1*, *MOTHER OF FT (MFT)* participa en la regulación de la germinación de semillas en *Arabidopsis* a través de un circuito de retroalimentación negativa que regula la señalización por

ABA (Xi et al., 2010). Esto resulta muy interesante, ya que aporta una primera pista hacia un posible papel de TFL1 en las rutas de señalización por ABA, sin embargo, son necesarios más estudios genéticos y moleculares para esclarecer este nuevo papel de TFL1.

En este contexto, nuestros rastreos y nuestros análisis de interacción proteína-proteína, también han mostrado interacción de TFL1 con 2 de bZIPs del grupo I, bZIP30 y bZIP52. El grupo I de los bZIPs se encuentra filogenéticamente bastante alejado del grupo A, y está compuesto por 12 genes cuya actividad se ha relacionado con diferentes aspectos del desarrollo de *Arabidopsis* (Tsugama et al., 2012; Gíbalová et al., 2016; Van Leene et al., 2016; Lozano-Sotomayor et al., 2016).

El análisis evolutivo de los bZIPs de *Arabidopsis* y arroz muestra que los bZIPs de plantas superiores derivan de 4 genes ancestrales, y que los diferentes grupos existentes se fueron generando y ampliando mediante procesos de duplicación génica. El estudio de los dominios funcionales presentes en los bZIPs ha permitido su clasificación en 13 grupos (A-S) (Jakoby et al., 2002; Guedes Corrêa et al., 2008). El análisis de los diferentes grupos ha mostrado que generalmente los miembros de un mismo grupo presentan dominios comunes conservados y tienden a participar de forma parcialmente redundante en los mismos procesos (Jakoby et al., 2002; Guedes Corrêa et al., 2008; Dröge-Laser et al., 2018). No podemos descartar por tanto que TFL1 forme complejos con proteínas del grupo A para participar en el control de la floración y la señalización de ABA, y con los bZIPs del grupo I para participar en diferentes procesos del desarrollo, por ejemplo, de la hoja y de las semillas.

El rastreo de tríple híbrido utilizando el complejo TFL1-FD muestra que la unión de TFL1 a FD genera un cambio en la preferencia de TFL1 desde los bZIPs y bHLH hacia otros tipos de factores de transcripción como los TCP, entre los que encontramos TCP7, TCP15, TCP19, TCP22 y TCP23 (Tabla R3.4). Estos mismos TCPs ya se habían descrito con anterioridad como interactores débiles de TFL1 (Ho and Weigel, 2014). No obstante, nuestro resultado sugiere una interacción más fuerte en presencia de FD, por lo que es posible que la presencia del complejo TFL1-FD facilite la interacción con los TCPs, para formar complejos de mayor orden. Este resultado apunta en primer lugar hacia la posibilidad de que todos los bZIPs se unan a un único dominio de TFL1, de modo que la unión de uno de ellos, como FD en el caso de nuestro triple híbrido, impida la unión de otro bZIP distinto. En segundo lugar, el cambio en la afinidad de los TCPs por TFL1 sugiere la posibilidad de que los bZIPs actúen modulando la afinidad de TFL1 por sus interactores para formar complejos de mayor orden.

Los rastreos de doble y triple híbrido, así como de los ensayos de BiFC, y otras técnicas similares para probar la interacción entre dos proteínas proporcionan una información muy valiosa en el estudio de diferentes proteínas y su capacidad para formar complejos. No obstante, el hecho de que dos proteínas sean capaces de interactuar físicamente en este tipo de ensayos no implica que dicha interacción tenga lugar en la planta. Los datos de expresión disponibles en la base de datos BAR (<http://bar.utoronto.ca/>), muestran que todos los bZIPs identificados nuestro screening se expresan en los mismos tejidos que TFL1, de modo que sí es posible que las proteínas coincidan físicamente *in planta*. No obstante, para asegurar que los complejos se forman, así como para entender su relevancia biológica, sería importante realizar ensayos que permitan la identificación de los complejos formados *in vivo*, como la CoIP, utilizando proteína TFL1 marcada con un epítipo, así como elucidar la función biológica de dichos complejos mediante análisis genético.

3. Los bZIPs del grupo I participan en el desarrollo en Arabidopsis de forma redundante entre ellos

En Arabidopsis, la familia de los factores de transcripción de tipo bZIPs está formada por 75 miembros que se clasifican según sus dominios funcionales en 13 grupos (A-I, S) (Jakoby et al., 2002). A nivel funcional se ha descrito que los bZIPs del grupo A participan en la señalización por ABA (Yoshida et al., 2015; Banerjee and Roychoudhury, 2017), los del grupo C en la respuesta a estrés biótico y abiótico (Yamashita et al., 2017), los del grupo G en la regulación de los genes de respuesta a la luz (Singh et al., 2012), y los del grupo I, en diferentes procesos del desarrollo de la vasculatura, las hojas, las semillas y el carpelo (Tsugama et al., 2012; Yoshida et al., 2015; Gibalová et al., 2016; Van Leene et al., 2016; Lozano-Sotomayor et al., 2016; Tsugama et al., 2016; Lapham et al., 2018).

Los ensayos de interacción proteína-proteína llevados a cabo en este trabajo, así como los datos publicados hasta el momento, indican que sólo los bZIPs de los grupos A e I son capaces de interactuar proteína-proteína con TFL1 (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Niwa et al., 2013). La interacción de TFL1 con algunos bZIPs del grupo A como FD, y FDP ya se había descrito con anterioridad y su relevancia a nivel funcional, sobre todo con FD, está bien estudiada en distintas especies (Pnueli et al., 2001; Abe et al., 2005; Taoka et al., 2011; Jaeger et al., 2013; Taoka et al., 2013; Ho and Weigel, 2014). Sin embargo, la interacción de TFL1 con los bZIPs del grupo I no se ha descrito y su relevancia en el control del desarrollo todavía no está clara (Niwa et al., 2013; Lozano-Sotomayor et al., 2016). No obstante, el hecho de que todos los bZIPs del grupo I encontrados en estos rastreos se expresen en los mismos dominios que *TFL1*, los hace

muy interesantes como posibles reguladores del desarrollo en *Arabidopsis* a través de un complejo con TFL1.

En este trabajo se presenta la caracterización funcional de los bZIPs del grupo I capaces de interactuar con TFL1: *bZIP30*, *bZIP52*, y de los bZIPs más próximos filogenéticamente a ellos *bZIP59*, *bZIP18*, *bZIP29* y *bZIP69*, siendo todos ellos, a excepción de *bZIP69*, capaces de interactuar con FT.

La caracterización de los mutantes simples, dobles, triples y cuádruple, así como el análisis de los fenotipos asociados a la sobreexpresión de estos genes no revelaron alteraciones drásticas en el fenotipo de estas líneas con respecto al parental silvestre. Esto unido al solapamiento en sus patrones de expresión y al hecho de que todos ellos compartan gran parte de sus dominios funcionales más relevantes hace pensar que existe redundancia funcional entre ellos. Se sabe que en ocasiones la generación de mutantes de pérdida de función puede promover la expresión de otros genes similares capaces suplir en mayor o menor grado la función de la proteína mutada evitando la aparición de alteraciones en el fenotipo mediante un fenómeno que se conoce como compensación génica (Rossi et al., 2015). Es por tanto posible que los efectos fenotípicos causados por la pérdida de función de algunos de los bZIPs estén siendo compensados por otros bZIPs con estructura y función similar.

La obtención y caracterización de formas dominantes negativas es una estrategia muy útil que permite abordar la caracterización funcional de factores de transcripción pertenecientes a familias multigénicas altamente redundantes sin la necesidad de generar mutantes múltiples muy costosos de obtener. Esta estrategia, si bien se basa en la caracterización de los efectos fenotípicos causados por la presencia de una proteína de fusión funcionalmente distinta de la proteína nativa, ya se ha utilizado con éxito para el estudio de otros factores de transcripción, como CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC), TCP14 y TCP15 (Hiratsu et al., 2003; Kieffer et al., 2011). En este trabajo generamos y caracterizamos las líneas dominantes negativas 35S:*bZIP30*-SRDX, 35S:*bZIP52.1*-SRDX, 35S:*bZIP52.2*-SRDX y 35S:*bZIP59*-SRDX con el fin de conocer los procesos en los que participan *bZIP30*, *bZIP52* y *bZIP59* en el control del desarrollo en *Arabidopsis*.

Todas las líneas dominantes negativas estudiadas mostraron defectos en el desarrollo de los órganos laterales, de las hojas y del meristemo, apoyando la hipótesis de que los tres bZIPs puedan participar en los mismos procesos de desarrollo. Sin embargo, mientras que en algunos aspectos, como la morfología de las flores, los efectos fueron muy similares en todas las líneas estudiadas, en otros aspectos, como el desarrollo de las hojas, los fenotipos observados fueron entre las líneas dominantes negativas de los diferentes bZIPs, observándose hojas serradas en

las líneas 35S:bZIP30-SRDX, curvadas en las líneas 35S:bZIP52.1-SRDX y 35S:bZIP52.2-SRDX, y lanceoladas en las líneas 35S:bZIP59-SRDX. Estos resultados sugieren que, aunque los tres bZIPs participen en los mismos procesos, desarrollo de las hojas y de las flores, en algunos lo hagan ejerciendo la misma función mientras que en otros ejerzan papeles distintos, quizás complementarios.

Las líneas dominantes negativas de los distintos bZIPs también mostraron defectos en la morfología y el desarrollo del meristemo, que provocaban la fasciación del tallo principal. Estos fenotipos sugieren un posible papel de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 en la regulación de genes implicados en el desarrollo del meristemo y/o en su mantenimiento y en el control del ciclo celular. En concordancia con este resultado, el análisis mediante RNA-Seq de la línea 35S:bZIP30-SRDX muestra como términos GO más sobrerrepresentados entre los genes cuya expresión se regula al alza los términos de regulación del tamaño celular, crecimiento y procesos celulares, y por otro lado entre los genes cuya expresión se regula a la baja en la línea 35S:bZIP30-SRDX, encontramos genes implicados en el mantenimiento del ciclo celular como la *CYCLIN B2 (CYCB2)*, o el gen *BARELY ANY MERISTEM2 (BAM2)* cuya mutación genera una reducción en el mantenimiento de las células del meristemo (DeYoung et al., 2006; Lu et al., 2017). Del mismo modo el análisis de las inflorescencias de una línea de sobreexpresión 35S:bZIP30 mostró una gran abundancia de genes relacionados con la regulación del ciclo celular como *CYCLIN A2 (CYCA2)* (Donner and Scarpella, 2013), o la formación de la pared celular como *UDP- GLUCOSE-DEHYDROGENASE (UGD2)* (Reboul et al., 2011; Reboul and Tenhaken, 2012; Lozano-Sotomayor et al., 2016). Por otra parte, se ha descrito además que la proteína bZIP30 es capaz de interactuar con las proteínas WUS y KNAT1, ambos importantes reguladores de la actividad y el mantenimiento del meristemo (Chuck et al., 1996; Lozano-Sotomayor et al., 2016; Ma et al., 2019).

Uno de los fenotipos más frecuente entre todas las líneas dominantes negativas analizadas fue la alteración en la morfología de las flores, que presentaban órganos curvados con fusión de los órganos de los verticilos externos, sépalos y pétalos. Nuevamente, estos fenotipos de fusión de órganos sugieren alteraciones en la regulación de genes implicados en el crecimiento y la división celular, aunque también se han asociado a alteraciones en la deposición de ceras en la epidermis (Krolikowski et al., 2003; Panikashvili et al., 2007; Ingram and Nawrath, 2017). Al igual que las líneas 35S:bZIP30, las plantas 35S:bZIP30-SRDX, mostraron una reducción en la longitud del carpelo y los frutos, así como deformaciones del carpelo. En este sentido se ha visto que bZIP30 es capaz de interactuar con factores de transcripción implicados en el desarrollo del

carpelo como NGATHA (NGA), y CRABS CLAW (CRC) (Alvarez and Smyth, 2002; Trigueros et al., 2009; Lee et al., 2015; Lozano-Sotomayor et al., 2016).

Los genes *KNOX*, *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, *KNAT1*, *KNAT2*, y *KNAT6* son factores clave en la formación y el mantenimiento del meristemo y, al mismo tiempo, su supresión es necesaria para la correcta iniciación de los primordios foliares (Tsukaya, 2013; Scofield et al., 2018). Muchos factores están encargados de la regulación de los genes *KNOX* en los primordios foliares, entre ellos los genes *JAGGED (JAG)*, *CUP SHAPED COTYLEDON (CUC)*, *BLADE ON PETIOLE (BOP1)*, o *LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB)*, cuya mutación genera fenotipos similares a los observados en nuestras líneas dominantes negativas. Por ejemplo, el fenotipo asociado a la línea de pérdida de función de *jag-1* se caracteriza por la presencia de defectos en la morfología de los pétalos ligeramente sepaloideos y que muestran márgenes apicales dentados, la aparición de hojas serradas así como flores más pequeñas e inflorescencias compactas, todos ellos fenotipos similares a los observados en las líneas 35S:bZIP30-SRDX (Dinneny et al., 2004; Sauret-Güeto et al., 2013). Asimismo, el triple mutante *cuc1cuc2cuc3* presenta hojas alargadas, fasciación del tallo y fusión de los órganos laterales, cotiledones y hojas, recuerdan a las líneas 35S:bZIP52.1-SRDX y 35S:bZIP52.2-SRDX (Hibara et al., 2006; Kwon et al., 2006). Por otro lado, la sobreexpresión de *LOB1* promueve la aparición de hojas pequeñas y redondeadas, así como deformaciones en los verticilos más externos de las flores y esterilidad (Shuai et al., 2002), similares a las encontradas en todas las líneas dominantes negativas analizadas. Finalmente, el doble mutante *bop1bop2* presenta importantes alteraciones en las hojas, que presentan un margen lobulado, curvaturas en el margen de la hoja, así como deformaciones en los órganos florales, especialmente en los verticilos más externos (Hepworth et al., 2005; Chan et al., 2007), que recuerdan nuevamente a los encontrados en las líneas 35S:bZIP52.1-SRDX y 35S:bZIP52.2-SRDX. El análisis transcriptómico de la línea 35S:bZIP30-SRDX muestra un gran número de genes diferencialmente expresados que están relacionados con el crecimiento y el desarrollo de la hoja, entre los que encontramos a *KNAT1*. Se ha visto, además, que bZIP30 es capaz de interaccionar proteína-proteína con algunos de estas proteínas como JAG, así como con *KNOX I*, *KNAT1* y *KNAT2*. (Lozano-Sotomayor et al., 2016). Todo esto sugiere un posible papel de bZIP30, bZIP52 y bZIP59 en el control de la iniciación de los primordios foliares, y el desarrollo de la hoja, posiblemente mediante la formación de complejos proteicos reguladores con factores importantes en estos procesos, como *KNAT1*.

4. Papel de los complejos proteicos TFL1-bZIP30, TFL1-bZIP52 y TFL1-bZIP59 en el desarrollo

El papel de TFL1 como regulador del tiempo de floración y la arquitectura en *Arabidopsis*, así como la función de sus homólogos en otras especies como tomate y arroz en estos procesos

se conoce con profundidad. Se sabe que para regular estos procesos, en *Arabidopsis*, TFL1 se expresa en el meristemo apical del tallo durante la fase vegetativa, a bajo nivel, y tras la transición floral, en el meristemo inflorescente a un nivel más alto, donde se une a sus dianas para reprimir los genes florales (Bradley et al., 1997). Sin embargo, el estudio del patrón de expresión de TFL1 muestra que, además de en el meristemo, TFL1 se expresa en otros tejidos como el tallo de la inflorescencia las hojas de roseta en la fase reproductiva, las semillas y la raíz, en la que se encuentra presente durante el desarrollo vegetativo (Fig. D.1). Es por tanto esperable que TFL1 participe en otros procesos para los que nec tejidos.

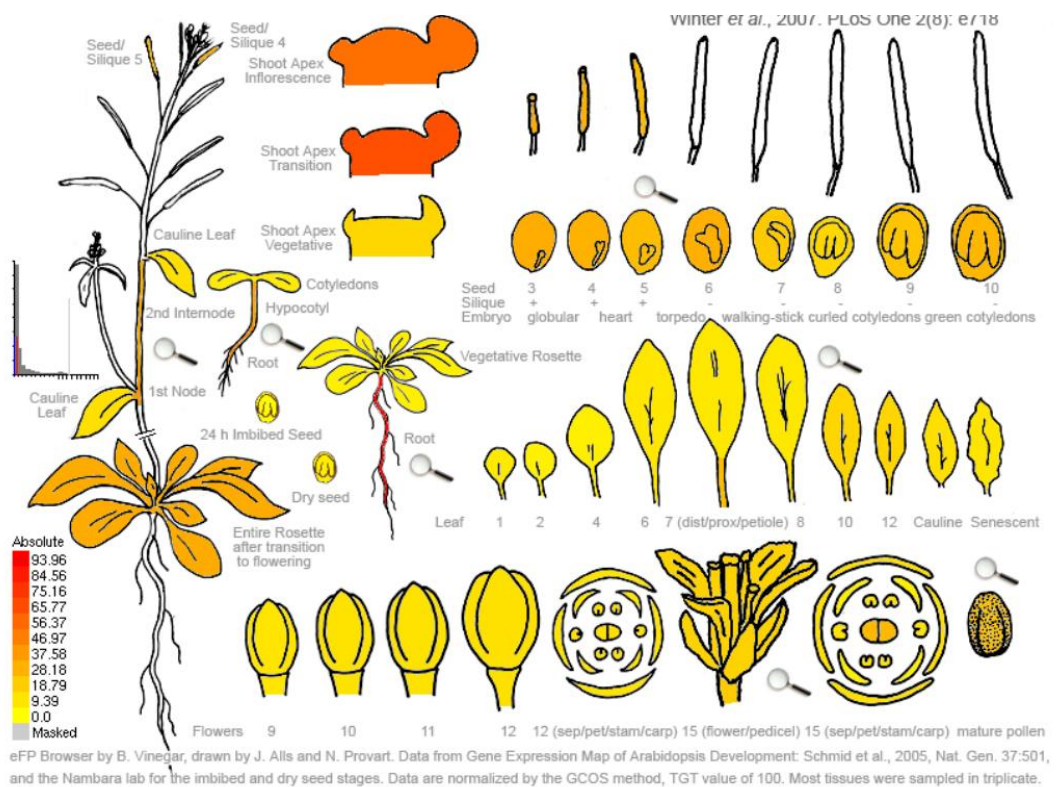


Figura D.1 Patrón de expresión de TFL1 en *Arabidopsis*. Resultado del análisis por *microarray* del patrón de expresión de TFL1 en diferentes órganos y estadios del desarrollo de *Arabidopsis*. Figura tomada del BAR <http://bar.utoronto.ca/efp/cqi-bin/efpWeb.cgi>.

El mutante *tfl1-1* se ha estudiado minuciosamente en lo que respecta a los defectos en el tiempo de floración y la arquitectura, sin embargo, hemos visto que este mutante presenta otras alteraciones como un incremento en el tamaño de las hojas, y las semillas, los cuales todavía no se han analizado con detalle, y que sugieren de nuevo un posible papel de TFL1 como regulador de otros aspectos del desarrollo. Estas mismas alteraciones en el tamaño de las semillas y las hojas se observan también en el quintuple mutante *bzip30bzip52bzip59bzip29bzip18*. Los ensayos de doble híbrido y BiFC llevados a cabo en este trabajo muestran además que bZIP30, bZIP52, bZIP59, bZIP18 y bZIP29 pueden interaccionar proteína-proteína con TFL1. Todos estos

datos sugieren que estos bZIPs podrían ser buenos candidatos para participar junto con TFL1 en el control del desarrollo de las hojas y las semillas, formado un complejo similar al formado por TFL1-FD para participar en la regulación de la floración. No obstante, se necesitan estudios más profundos para poder determinar de manera clara la función de estos bZIPs y de qué manera TFL1 contribuye a la misma.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

PRIMERA: TFL1 actúa como un co-regulador transcripcional, formando complejos con factores de transcripción que se unen a sus genes diana, preferencialmente a través de motivos G-box, y regulan su expresión.

SEGUNDA: TFL1 se une a gran parte de sus genes diana mediante su interacción con FD, factor de transcripción tipo bZIP del grupo A. El complejo TFL1-FD no sólo regula la expresión de genes florales sino también de genes de otros procesos implicados en el desarrollo, tales como la señalización por ABA o el reloj circadiano.

TERCERA: Entre las proteínas posibles interactoras de TFL1 identificadas, además de interactores ya conocidos, tales como FD o proteínas 14-3-3, destacan distintos factores de transcripción, como TCPs, un bHLH, un MADS-box, varios bZIPs del grupo A, relacionados con ABA, y el bZIP de grupo I, bZIP30.

CUARTA: Los factores de transcripción del grupo I bZIP30, bZIP52, forman complejos proteína-proteína con TFL1 y participan de forma redundante, entre ellos y con otros bZIPs en procesos del desarrollo de Arabidopsis tales como la formación de la hoja y de las semillas.

The results obtained in this doctoral thesis allows us to achieve the following conclusions:

FIRST: TFL1 acts as a transcriptional co-regulator, forming complexes together with transcription factors that bind their target genes, preferentially at G-box motifs, to regulate their expression.

SECOND: TFL1 binds most of its target genes through its interaction with FD, a group A bZIP transcription factor. The complex TFL1-FD regulates the expression of the flowering genes, as well as the expression of genes involved in other developmental processes, like ABA signaling or the circadian clock.

THIRD: Among the putative interactors of TFL1, we identified known interactors like FD or 14-3-3 proteins, but also other transcription factors like TCPs, a bHLH, a MADS box, several group A bZIPs related to ABA, and a group I bZIP, in particular bZIP30.

FOURTH: The group I bZIP transcription factors bZIP30 and bZIP52 form protein-protein complexes with TFL1 and participate, in a redundant manner among themselves and other bZIPs, in Arabidopsis developmental processes like the leaf and seed formation.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T** (2005) FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. *Science* (80-) **309**: 1052–1056
- Ábrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L** (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **51**: 363–372
- Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Jeong HL, So YY, Henz SR, Brady RL, Weigel D** (2006) A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J* **25**: 605–614
- Alvarez J, Smyth DR** (2002) CRABS CLAW and SPATULA genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci* **163**: 17–41
- Amasino R** (2004) Vernalization, Competence, and the Epigenetic Memory of Winter. *Plant Cell* **16**: 2553–2559
- Aoyama T, Dong Chun-Hai, Wu Yan, Carabelli M, Sessa G, Ruberti I, Morelli G, Chua NH** (1995) Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* **7**: 1773–1785
- Balanzà V, Martínez-Fernández I, Ferrándiz C** (2014) Sequential action of FRUITFULL as a modulator of the activity of the floral regulators SVP and SOC1. *J Exp Bot* **65**: 1193–1203
- Banerjee A, Roychoudhury A** (2017) Abscisic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress. *Protoplasma* **254**: 3–16
- Bao S, Hua C, Shen L, Yu H** (2020) New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* **62**: 118–131
- Bao S, Hua C, Shen L, Yu H** (2019) New insights into gibberellin signaling in regulating flowering in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*. doi: 10.1111/jipb.12892
- Baumann K, Venail J, Berbel A, Domenech MJ, Money T, Conti L, Hanzawa Y, Madueno F, Bradley D** (2015) Changing the spatial pattern of TFL1 expression reveals its key role in the shoot meristem in controlling *Arabidopsis* flowering architecture. *J Exp Bot* **66**: 4769–4780
- Bäurle I, Dean C** (2006) The Timing of Developmental Transitions in Plants. *Cell* **125**: 655–664

- Belda-Palazón B, Ruiz L, Martí E, Tárraga S, Tiburcio AF, Culiáñez F, Farràs R, Carrasco P, Ferrando A** (2012) Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS One* **7**: e46907
- Bhaskara GB, Nguyen TT, Verslues PE** (2012) Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade a protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* **160**: 379–395
- Blázquez MA, Ferrándiz C, Madueño F, Parcy F** (2006) How Floral Meristems are Built. *Plant Mol Biol* **60**: 855–870
- Blázquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D** (1998) Gibberellins Promote Flowering of Arabidopsis by Activating the LEAFY Promoter. *Plant Cell* **10**: 791–800
- Blázquez MA, Soowal LN, Lee I, Weigel D** (1997) LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development* **124**: 3835–3844
- Boss PK, Bastow RM, Mylne JS, Dean C** (2004) Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting. *Plant Cell* **16**: S18–S31
- Bouché F, Lobet G, Tocquin P, Périlleux C** (2016) FLOR-ID: an interactive database of flowering-time gene networks in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **44**: D1167–D1171
- Bowman JL, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz EM, Smyth DR** (1993) Control of flower development in Arabidopsis thaliana by APETALA 1 and interacting genes. *Development* **119**: 721–743
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E** (1997a) Inflorescence Commitment and Architecture in Arabidopsis Enrico Coen
Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL :
<http://www.jstor.org/stable/2892121> Inflorescence Commitment and Architecture in Arabidopsis. *Science* (80-) **275**: 80–83
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E** (1997b) Inflorescence Commitment and Architecture in Arabidopsis. *Science* (80-) **275**: 3–6
- Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR** (2002) Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5 gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiol* **129**: 1533–1543
- Castillejo C, Pelaz S** (2008) The Balance between CONSTANS and TEMPRANILLO Activities

- Determines FT Expression to Trigger Flowering. *Curr Biol* **18**: 1338–1343
- Chan MH, Ji HJ, Hong GN, Fletcher JC** (2007) BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 control Arabidopsis lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes. *Plant Cell* **19**: 1809–1825
- Chen M, Penfield S** (2018) Feedback regulation of COOLAIR expression controls seed dormancy and flowering time. *Science* (80-) **360**: 1014–1017
- Cheng JZ, Zhou YP, Lv TX, Xie CP, Tian CE** (2017) Research progress on the autonomous flowering time pathway in Arabidopsis. *Physiol Mol Biol Plants* **23**: 477–485
- Choi K, Kim J, Hwang HJ, Kim S, Park C, Kim SY, Lee I** (2011) The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors. *Plant Cell* **23**: 289–303
- Chuck G, Lincoln C, Hake S** (1996) KNAT1 induces lobed leaves with ectopic meristems when overexpressed in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**: 1277–1289
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**: 735–743
- Collani S, Neumann M, Yant L, Schmid M** (2019) FT modulates genome-wide DNA-binding of the bZIP transcription factor FD. *Plant Physiol* **180**: 367–380
- Conti L** (2017) Hormonal control of the floral transition: Can one catch them all? *Dev Biol* **430**: 288–301
- Conti L, Bradley D** (2007) TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling Arabidopsis architecture. *Plant Cell* **19**: 767–778
- Corbesier L, Prinsen E, Jacquemard A, Lejeune P, Van Onckelen H, Périlleux C, Bernier G** (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana during floral transition. *J Exp Bot* **54**: 2511–2517
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, et al** (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* (80-) **316**: 1030–1033
- Crane O, Halaly T, Pang X, Lavee S, Perl A, Vankova R, Or E** (2012) Cytokinin-induced VvTFL1A expression may be involved in the control of grapevine fruitfulness. *Planta* **235**: 181–192

Van Criekinge W, Beyaert R (1999) Yeast two-hybrid: State of the art. *Biol Proced Online* **2**: 1–38

Danilevskaya ON, Meng X, Ananiev E V. (2010) Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of TFL1-like genes in maize. *Plant Physiol* **153**: 238–251

DeYoung BJ, Bickle KL, Schrage KJ, Muskett P, Patel K, Clark SE (2006) The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis. *Plant J* **45**: 1–16

Dinneny JR, Yadegari R, Fischer RL, Yanofsky MF, Weigel D (2004) The role of JAGGED in shaping lateral organs. *Development* **131**: 1101–1110

Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007) Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: Abusing MAPK defense signaling. *Science* (80-) **318**: 453–456

Donner TJ, Scarpella E (2013) Transcriptional control of early vein expression of CYCA2; 1 and CYCA2;4 in Arabidopsis leaves. *Mech Dev* **130**: 14–24

Dröge-Laser W, Snoek BL, Snel B, Weiste C (2018) The Arabidopsis bZIP transcription factor family — an update. *Curr Opin Plant Biol* **45**: 36–49

Duncan S, Holm S, Questa J, Irwin J, Grant A, Dean C (2015) Seasonal shift in timing of vernalization as an adaptation to extreme winter. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.06620.001

Engler C, Marillonnet S (2014) Golden Gate cloning. *Methods Mol Biol* **1116**: 119–131

Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, Nilsson O (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell* **18**: 2172–2181

Ezer D, Shepherd SJK, Brestovitsky A, Dickinson P, Cortijo S, Charoensawan V, Box MS, Biswas S, Jaeger KE, Wigge PA (2017) The G-box transcriptional regulatory code in arabidopsis. *Plant Physiol* **175**: 628–640

Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. *Development* **127**: 725–734

De Folter S, Immink RGH, Kieffer M, Pařenicová L, Henz SR, Weigel D, Busscher M, Kooiker

- M, Colombo L, Kater MM, et al** (2005) Comprehensive interaction map of the Arabidopsis MADS box transcription factors. *Plant Cell* **17**: 1424–1433
- Foucher F, Morin J, Courtiade J, Cadioux S, Ellis N, Banfield MJ, Rameau C** (2003) Determinate and Late Flowering Are Two Terminal Flower1/Centroradialis Homologs That Control Two Distinct Phases of Flowering Initiation and Development in Pea. *Plant Cell* **15**: 2742–2754
- Fouracre JP, Scott Poethig R** (2019) Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **116**: 10168–10177
- Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR** (2009) Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci* **05**:Supp.46
- Galvão VC, Horrer D, Küttner F, Schmid M** (2012) Spatial control of flowering by DELLA proteins in Arabidopsis thaliana. *Dev* **139**: 4072–4082
- Garcia ME, Lynch T, Peeters J, Snowden C, Finkelstein R** (2008) A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFBs) regulates stress response in germinating Arabidopsis seeds and seedlings. *Plant Mol Biol* **67**: 643–658
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, Dean C** (2001) The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis. *Cell* **107**: 525–535
- Gibalová A, Steinbachová L, Hafidh S, Bláhová V, Gadiou Z, Michailidis C, Müller K, Pleskot R, Duplíáková N, Honys D** (2016) Characterization of pollen-expressed bZIP protein interactions and the role of ATbZIP18 in the male gametophyte. *Plant Reprod.* doi: 10.1007/s00497-016-0295-5
- Glass F, Takenaka M** (2018) The yeast three-hybrid system for protein interactions. *Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., pp 195–205
- Gocal GFW, King RW, Blundell CA, Schwartz OM, Andersen CH, Weigel D** (2001) Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to APETALA1 and LEAFY of arabidopsis. *Plant Physiol* **125**: 1788–1801
- Goretti D, Silvestre M, Collani S, Langenecker T, Méndez C, Madueno F, Schmid M** (2020) TERMINAL FLOWER 1 functions as a mobile transcriptional cofactor in the shoot apical meristem. *Plant Physiol* **182**: pp.00867.2019
- Goslin K, Zheng B, Serrano-Mislata A, Rae L, Ryan PT, Kwaśniewska K, Thomson B, Ó'Maoiléidigh DS, Madueño F, Wellmer F, et al** (2017) Transcription factor interplay

between LEAFY and APETALA1/CAULIFLOWER during floral initiation. *Plant Physiol* **174**: 1097–1109

Guedes Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Guerra Schrago C, Vicentini dos Santos R, Mueller-Roeber B, Vincentz M (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: Adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* **3**: e2944

Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF (1994) Regulation of the arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Cell* **76**: 131–143

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580

Hanano S, Goto K (2011) Arabidopsis TERMINAL FLOWER1 is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. *Plant Cell* **23**: 3172–84

Hanzawa Y, Money T, Bradley D (2005) A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 7748–7753

Hartmann U, Höhmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P (2000) Molecular cloning of SVP: A negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **21**: 351–360

Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**: 76–79

Hepworth SR, Zhang Y, McKim S, Li X, Haughn GW (2005) Blade-on-Petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 1434–1448

Hibara KI, Karim MR, Takada S, Taoka KI, Furutani M, Aida M, Tasaka M (2006) Arabidopsis CUP-SHAPED COTYLEDON3 regulates postembryonic shoot meristem and organ boundary formation. *Plant Cell* **18**: 2946–2957

Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M (2003) Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. *Plant J* **34**: 733–739

Hisamatsu T, King RW (2008) The nature of floral signals in Arabidopsis. II. Roles for FLOWERING LOCUS T (FT) and gibberellin. *J Exp Bot* **59**: 3821–3829

Ho WWH, Weigel D (2014) Structural features determining flower-promoting activity of

- Arabidopsis FLOWERING LOCUS T. *Plant Cell* **26**: 552–564
- Hoffman CS, Winston F** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–272
- Hou X, Zhou J, Liu C, Liu L, Shen L, Yu H** (2014) Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of *Arabidopsis*. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms5601
- Huala E, Sussex IM** (1992) LEAFY Interacts with Floral Homeotic Genes to Regulate *Arabidopsis* Floral Development. *Plant Cell* **4**: 901–913
- Huijser P, Schmid M** (2011) The control of developmental phase transitions in plants. *Development* **138**: 4117–4129
- Hwang K, Susila H, Nasim Z, Jung JY, Ahn JH** (2019) *Arabidopsis* ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Mol Plant* **12**: 489–505
- Imaizumi T** (2010) *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr Opin Plant Biol.* doi: 10.1016/j.pbi.2009.09.007
- Immink RGH, Gadella TWJ, Ferrario S, Busscher M, Angenent GC** (2002) Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2416–2421
- Ingram G, Nawrath C** (2017) The roles of the cuticle in plant development: organ adhesions and beyond. *J Exp Bot* **68**: 5307–5321
- Irish VF, Sussex LM** (1990) Function of the *apetala-1* Gene during *Arabidopsis* Floral Development. *Plant Cell* **2**: 741–753
- Ito S, Song YH, Josephson-Day AR, Miller RJ, Breton G, Olmstead RG, Imaizumi T** (2012) FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3582–3587
- Jaeger KE, Pullen N, Lamzin S, Morris RJ, Wigge PA** (2013) Interlocking feedback loops govern the dynamic behavior of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 820–833
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F** (2002) bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **7**: 106–111
- James P, Halladay J, Craig EA** (1996) Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly

Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics* **144**: 1425–1436

Jang S, Li HY, Kuo ML (2017) Ectopic expression of Arabidopsis FD and FD PARALOGUE in rice results in dwarfism with size reduction of spikelets. *Sci Rep* **7**: 1–15

Johnson CM, Stout PR, Broyer TC, Carlton AB (1957) Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant Soil* **8**: 337–353

Jones S (2004) An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* **5**: 226

Kafri R, Springer M, Pilpel Y (2009) Genetic Redundancy: New Tricks for Old Genes. *Cell* **136**: 389–392

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999) Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**: 1962–1965

Karlgrén A, Gyllenstrand N, Källman T, Sundström JF, Moore D, Lascoux M, Lagercrantz U (2011) Evolution of the PEBP gene family in plants: Functional diversification in seed plant evolution. *Plant Physiol* **156**: 1967–1977

Kaufmann K, Wellmer F, Muiño JM, Ferrier T, Wuest SE, Kumar V, Serrano-Mislata A, Madueño F, Krajewski P, Meyerowitz EM, et al (2010) Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science* **328**: 85–89

Kieffer M, Master V, Waites R, Davies B (2011) TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in Arabidopsis. *Plant J* **68**: 147–158

Kim D-H, Xi Y, Sung S (2017) Modular function of long noncoding RNA, COLDAIR, in the vernalization response. *PLOS Genet* **13**: e1006939

Kinoshita T, Ono N, Hayashi Y, Morimoto S, Nakamura S, Soda M, Kato Y, Ohnishi M, Nakano T, Inoue SI, et al (2011) FLOWERING LOCUS T regulates stomatal opening. *Curr Biol* **21**: 1232–1238

Kobayashi Y, Weigel D (2007) Move on up, it's time for change - Mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev* **21**: 2371–2384

Koncz C, 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. *MGG Mol Gen Genet* **204**: 383–396

Koorneef M, Elgersma A, Hanhart CJ, van Loenen-Martinet EP, van Rijn L, Zeevaart JAD

- (1985) A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **65**: 33–39
- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Blankestijn-De Vries H, Hanhart CJ, Peeters AJM** (1998) Genetic interactions among late-flowering mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **148**: 885–892
- Koornneef M, Hanhart CJ, van der Veen JH** (1991) A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *MGG Mol Gen Genet* **229**: 57–66
- Krolkowski KA, Victor JL, Wagler TN, Lolle SJ, Pruitt RE** (2003) Isolation and characterization of the *Arabidopsis* organ fusion gene HOTHEAD. *Plant J* **35**: 501–511
- Kwon CS, Hibara KI, Pfluger J, Bezhani S, Metha H, Aida M, Tasaka M, Wagner D** (2006) A role for chromatin remodeling in regulation of CUC gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development* **133**: 3223–3230
- Lapham R, Lee L-Y, Tsugama D, Lee S, Mengiste T, Gelvin SB** (2018) VIP1 and Its Homologs Are Not Required for *Agrobacterium*-Mediated Transformation, but Play a Role in Botrytis and Salt Stress Responses. *Front Plant Sci* **9**: 1–15
- Lee BH, Kwon SH, Lee SJ, Park SK, Song JT, Lee S, Lee MM, Hwang Y sic, Kim JH** (2015) The *Arabidopsis thaliana* NGATHA transcription factors negatively regulate cell proliferation of lateral organs. *Plant Mol Biol* **89**: 529–538
- Lee H, Suh SS, Park E, Cho E, Ahn JH, Kim SG, Lee JS, Kwon YM, Lee I** (2000) The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **14**: 2366–2376
- Lee J, Oh M, Park H, Lee I** (2008) SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *Plant J* **55**: 832–843
- Van Leene J, Blomme J, Kulkarni SR, Cannoot B, De Winne N, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Vercruyse L, Vanden Bossche R, et al** (2016) Functional characterization of the *Arabidopsis* transcription factor bZIP29 reveals its role in leaf and root development. *J Exp Bot* **67**: 5825–5840
- Lei M, Li ZY, Wang J Bin, Fu YL, Ao MF, Xu L** (2018) Constitutive expression of *Aechmea fasciata* SPL14 (AfSPL14) accelerates flowering and changes the plant architecture in *Arabidopsis*. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms19072085
- Leijten W, Koes R, Roobeek I, Frugis G** (2018) Translating flowering time from *arabidopsis*

thaliana to brassicaceae and asteraceae crop species. *Plants*. doi: 10.3390/plants7040111

Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR, Dean C (2002) Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* (80-) **297**: 243–246

Liljegren SJ, Gustafson-Brown C, Pinyopich A, Ditta GS, Yanofsky MF (1999) Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell* **11**: 1007–1018

Lloyd AM, Schena M, Walbot V, Davis RW (1994) Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: Patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**: 436–439

Lozano-Sotomayor P, Chávez Montes RA, Silvestre-Vañó M, Herrera-Ubaldo H, Greco R, Pablo-Villa J, Galliani BM, Diaz-Ramirez D, Weemen M, Boutilier K, et al (2016) Altered expression of the bZIP transcription factor DRINK ME affects growth and reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **88**: 437–451

Lu C, Tian Y, Wang S, Su Y, Mao T, Huang T, Chen Q, Xu Z, Ding Y (2017) Phosphorylation of SPT5 by CDKD;2 is required for VIP5 recruitment and normal flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **29**: 277–291

Ma Y, Miotk A, Šutiković Z, Ermakova O, Wenzl C, Medzihradsky A, Gaillochet C, Forner J, Utan G, Brackmann K, et al (2019) WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis*. *Nat Commun* **10**: 1–11

Machanick P, Bailey TL (2011) MEME-ChIP: Motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* **27**: 1696–1697

Mandel T, Candela H, Landau U, Asis L, Zelinger E, Carles CC, Williams LE (2016) Differential regulation of meristem size, morphology and organization by the ERECTA, CLAVATA and class III HD-ZIP pathways. *Dev* **143**: 1612–1622

Mattioli R, Marchese D, D'Angeli S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M (2008) Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **66**: 277–288

McGarry RC, Ayre BG (2012) Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Sci* **188–189**: 71–81

Méndez-Losi, C. (2012) Identificación de nuevos interactores de TFL1 y VOZ1. **Tesis de máster**. Universitat Politècnica de València.

- Michaels SD, Amasino RM** (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* **13**: 935–941
- Michaels SD, Amasino RM** (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* **11**: 949–956
- Miho Kaneko-Suzuki RK-I, Okushita-Terakawa C, Kojima C, Nagano-Fujiwara M, Ohki I, Tsuji H, Taoka KS and K-I** (2018) TFL1-Like Proteins in Rice Antagonize Rice FT-Like Protein in Inflorescence Development by Competition for Complex Formation with 14-3-3 and FD. *Laryngoscope* **59**: 458–468
- Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, Araki T, Ahn JH, Weigel D, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W** (2001) Functional divergence of the TFL1-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes to Cells* **6**: 327–336
- Moon J, Suh S-S, Lee H, Choi K-R, Hong CB, Paek N-C, Kim S-G, Lee I** (2003) The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J* **35**: 613–623
- Moyroud E, Minguet EG, Ott F, Yant L, Posé D, Monniaux M, Blanchet S, Bastien O, Thévenon E, Weigel D, et al** (2012) Prediction of regulatory interactions from genome sequences using a biophysical model for the *Arabidopsis* LEAFY transcription factor. *Plant Cell* **23**: 1293–1306
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459–463
- Mutasa-Göttgens E, Hedden P** (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot* **60**: 1979–1989
- Nagel DH, Pruneda-Paz JL, Kay SA** (2014) FBH1 affects warm temperature responses in the *Arabidopsis* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 14595–14600
- Nakamura Y, Andrés F, Kanehara K, Liu YC, Dörmann P, Coupland G** (2014) *Arabidopsis* florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nat Commun* **5**: 4–8
- Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T** (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. *Plant J* **50**: 935–949

- Niwa M, Daimon Y, Kurotani K -i., Higo A, Pruneda-Paz JL, Breton G, Mitsuda N, Kay SA, Ohme-Takagi M, Endo M, et al** (2013) BRANCHED1 Interacts with FLOWERING LOCUS T to Repress the Floral Transition of the Axillary Meristems in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1228–1242
- Onouchi H, Igeño MI, Périlleux C, Graves K, Coupland G** (2000) Mutagenesis of plants overexpressing CONSTANS demonstrates novel interactions among Arabidopsis flowering-time genes. *Plant Cell* **12**: 885–900
- Osnato M, Castillejo C, Matías-Hernández L, Pelaz S** (2012) TEMPRANILLO genes link photoperiod and gibberellin pathways to control flowering in Arabidopsis. *Nat Commun* **3**: 1–8
- Panikashvili D, Savaldi-Goldstein S, Mandel T, Yifhar T, Franke RB, Höfer R, Schreiber L, Chory J, Aharoni A** (2007) The arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol* **145**: 1345–1360
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D** (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**: 561–566
- Pawar V, Poulet A, Détourné G, Tatout C, Vanrobays E, Evans DE, Graumann K** (2016) A novel family of plant nuclear envelope-associated proteins. *J Exp Bot* **67**: 5699–5710
- Pérez-Ruiz R V., García-Ponce B, Marsch-Martínez N, Ugartechea-Chirino Y, Villajuana-Bonequi M, De Folter S, Azpeitia E, Dávila-Velderrain J, Cruz-Sánchez D, Garay-Arroyo A, et al** (2015) XAANTAL2 (AGL14) is an important component of the complex gene regulatory network that underlies arabidopsis shoot apical meristem transitions. *Mol Plant* **8**: 796–813
- Périlleux C, Bouché F, Randoux M, Orman-Ligeza B** (2019) Turning Meristems into Fortresses. *Trends Plant Sci* **24**: 431–442
- Perilleux C, Lobet G, Tocquin P** (2014) Inflorescence development in tomato: gene functions within a zigzag model. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00121
- Picard D** (1993) Steroid-binding domains for regulating the functions of heterologous proteins in cis. *Trends Cell Biol* **3**: 278–280
- Pin PA, Nilsson O** (2012) The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant, Cell Environ* **35**: 1742–1755

- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E** (2001) Tomato SP-Interacting Proteins Define a Conserved Signaling System That Regulates Shoot Architecture and Flowering. *Plant Cell* **13**: 2687–2702
- Prusinkiewicz P, Erasmus Y, Lane B, Harder LD, Coen E** (2007) Evolution and development of inflorescence architectures. *Science* (80-) **316**: 1452–1456
- Pullen N, Jaeger KE, Wigge PA, Morris RJ** (2013) Simple network motifs can capture key characteristics of the floral transition in Arabidopsis. *Plant Signal Behav* **8**: e26149
- Pyo H, Demura T, Fukuda H** (2006) Vascular cell expression patterns of Arabidopsis bZIP group I genes. *Plant Biotechnol* **23**: 497–501
- Quesada V, Dean C, Simpson GG** (2005) Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering. *Int J Dev Biol* **49**: 773–780
- Ramon M, De Smet I, Vandesteene L, Naudts M, Leyman B, Van Dijck P, Rolland F, Beeckman T, Thevelein JM** (2009) Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell Environ* **32**: 1015–1032
- Ratcliffe O, Amaya I, Vincent C, Rothstein S, Carpenter R, Coen E, Bradley D** (1998) A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development* **125**: 1609–1615
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES** (1999a) Separation of shoot and floral identity.
- Ratcliffe OJ, Bradley DJ, Coen ES** (1999b) Separation of shoot and floral identity in Arabidopsis. *Development* **126**: 1109–1120
- Reboul R, Geserick C, Pabst M, Frey B, Wittmann D, Lütz-Meindl U, Léonard R, Tenhaken R** (2011) Down-regulation of UDP-glucuronic acid biosynthesis leads to swollen plant cell walls and severe developmental defects associated with changes in pectic polysaccharides. *J Biol Chem* **286**: 39982–39992
- Reboul R, Tenhaken R** (2012) An emerging role of pectic rhamnogalacturonanII for cell wall integrity. *Plant Signal Behav* **7**: 298–299
- Rédei GP** (1962) Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics* **47**: 443–60
- Reinhardt D, Kuhlemeier C** (2002) Plant architecture. *EMBO Rep* **3**: 846–851

- Riboni M, Test AR, Galbiati M, Tonelli C, Conti L** (2014) Environmental stress and flowering time the photoperiodic connection. *Plant Signal Behav* **9**: 1–5
- Riboni M, Test AR, Galbiati M, Tonelli C, Conti L** (2016) ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **67**: 6309–6322
- Rodríguez-Martínez JA, Reinke AW, Bhimsaria D, Keating AE, Ansari AZ** (2017) Combinatorial bZIP dimers display complex DNA-binding specificity landscapes. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.19272
- Rodríguez PL, Benning G, Grill E** (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* **421**: 185–190
- Romera-Branchat M, Severing E, Pocard C, André F, Madrigal P, Ohr H, Vincent C, Né G, Martinez-Gallegos R, Jang S, et al** (2020) Functional Divergence of the *Arabidopsis* Florigen-Interacting bZIP Transcription Factors FD and FDP. *CellReports* **31**: 107717
- Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Stainier Dyr** (2015) Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* **524**: 230–233
- Rüdiger S, Igeño MI, Coupland G** (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* **384**: 59–62
- Sablowski RWM, Meyerowitz EM** (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* **92**: 93–103
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G** (2000) Distinct roles of constant target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* (80-) **288**: 1613–1616
- Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palací J, Castelijns B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D** (2013) GoldenBraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiol* **162**: 1618–1631
- Sauret-Güeto S, Schiessl K, Bangham A, Sablowski R, Coen E** (2013) JAGGED Controls *Arabidopsis* Petal Growth and Shape by Interacting with a Divergent Polarity Field. *PLoS Biol*. doi: 10.1371/journal.pbio.1001550
- Schiessl K, Kausika S, Southam P, Bush M, Sablowski R** (2012) JAGGED controls growth

anisotropy and coordination between cell size and cell cycle during plant organogenesis. *Curr Biol* **22**: 1739–1746

Scofield S, Murison A, Jones A, Fozard J, Aida M, Band LR, Bennett M, Murray JAH (2018)

Coordination of meristem and boundary functions by transcription factors in the SHOOT MERISTEMLESS regulatory network. *Dev*. doi: 10.1242/dev.157081

Serrano-Mislata A, Fernández-Nohales P, Doménech MJ, Hanzawa Y, Bradley D, Madueño F

(2016) Separate elements of the *TERMINAL FLOWER 1 cis*-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development* **143**: 3315–3327

Serrano-Mislata A, Goslin K, Zheng B, Rae L, Wellmer F, Graciet E, Madueño F (2017)

Regulatory interplay between LEAFY, APETALA1/CAULIFLOWER and TERMINAL FLOWER1: New insights into an old relationship. *Plant Signal Behav*. doi: 10.1080/15592324.2017.1370164

Sessions A, Yanofsky MF, Weigel D (2000) Cell-cell signaling and movement by the floral

transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* **289**: 779–781

Shannon S, Meeks-Wagner DR (1991) A Mutation in the Arabidopsis TFL1 Gene Affects

Inflorescence Meristem Development. *Plant Cell* **3**: 877–892

Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H,

Matsuoka M (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520–523

Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang S, Tang S, Yang W, Xie Q (2016) ABSCISIC ACID-

INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting Arabidopsis FLOWERING LOCUS C transcription. *J Exp Bot* **67**: 195–205

Shu K, Luo X, Meng Y, Yang W (2018) Toward a Molecular Understanding of Abscisic Acid

Actions in Floral Transition. *Plant Cell Physiol* **59**: 215–221

Shuai B, Reynaga-Peña CG, Springer PS (2002) The Lateral Organ Boundaries gene defines a

novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol* **129**: 747–761

Sibénil Y, Doireau P, Gantet P (2001) Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and

activation mechanisms. *Eur J Biochem* **268**: 5655–5666

Simpson GG (2004) The autonomous pathway: Epigenetic and post-transcriptional gene

regulation in the control of Arabidopsis flowering time. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 570–574

Simpson GG, Dean C (2002) Arabidopsis, the Rosetta Stone of Flowering Time?

Singh A, Ram H, Abbas N, Chattopadhyay S (2012) Molecular interactions of GBF1 with HY5 and HYH proteins during light-mediated seedling development in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **287**: 25995–26009

Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990) Early flower development in Arabidopsis. *Plant Cell* **2**: 755–767

Sohn EJ, Rojas-Pierce M, Pan S, Carter C, Serrano-Mislata A, Madueno F, Rojo E, Surpin M, Raikhel N V. (2007) The shoot meristem identity gene TFL1 is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 18801–18806

Song YH, Estrada DA, Johnson RS, Kim SK, Lee SY, MacCoss MJ, Imaizumi T (2014) Distinct roles of FKF1, GIGANTEA, and ZEITLUPE proteins in the regulation of CONSTANS stability in Arabidopsis photoperiodic flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 17672–17677

Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T (2012) FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science* **336**: 1045–1049

Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18842–18847

Srikanth A, Schmid M (2011) Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2013–2037

Strizhov N, Abraham E, Ökrész L, Blicking S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1, and AXR2 in Arabidopsis. *Plant J* **12**: 557–569

Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**: 1116–1120

Sung S, Amasino RM (2004) Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**: 159–164

Székely G, Abraham E, Cséplő Á, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J,

- Schmelzer E, et al** (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* **53**: 11–28
- Taoka KI, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, Yamaguchi M, Nakashima C, Purwestri YA, Tamaki S, et al** (2011) 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**: 332–335
- Taoka KI, Ohki I, Tsuji H, Kojima C, Shimamoto K** (2013) Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci* **18**: 287–294
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK** (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends Plant Sci* **17**: 260–270
- Thouet J, Quinet M, Ormenese S, Kinet JM, Périlleux C** (2008) Revisiting the involvement of Self-pruning in the sympodial growth of tomato. *Plant Physiol* **148**: 61–64
- Tornero P, Dangl JL** (2001) A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **28**: 475–481
- Trigueros M, Navarrete-Gómez M, Sato S, Christensen SK, Pelaz S, Weigel D, Yanofsky MF, Ferrándiza C** (2009) The NGATHA genes direct style development in the arabidopsis gynoeceum. *Plant Cell* **21**: 1394–1409
- Tsugama D, Liu S, Takano T** (2012) A bZIP Protein, VIP1, Is a Regulator of Osmosensory Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* **159**: 144–155
- Tsugama D, Liu S, Takano T** (2016) The bZIP protein VIP1 is involved in touch responses in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **171**: 1355–1365
- Tsugama D, Liu S, Takano T** (2014) Analysis of functions of VIP1 and its close homologs in osmosensory responses of Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **9**: 1–11
- Tsukaya H** (2013) Leaf Development. *Arab B*. doi: 10.1199/tab.0163
- Wagner D, Sablowski RWM, Meyerowitz EM** (1999) Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* **285**: 582–584
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M** (2013) Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in Arabidopsis thaliana. *Science* **339**: 704–708
- Wang JW** (2014) Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *J Exp Bot*

65: 4723–4730

Wang JW, Czech B, Weigel D (2009) miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **138**: 738–749

Wang ZP, Xing HL, Dong L, Zhang HY, Han CY, Wang XC, Chen QJ (2015) Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol.* doi: 10.1186/s13059-015-0715-0

Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**: 843–859

Weigel D, Nilsson O (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* **377**: 495–500

Wickland DP, Hanzawa Y (2015) The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. *Mol Plant* **8**: 983–997

Wigge P a (2011) FT, A mobile developmental signal in plants. *Curr Biol* **21**: R374-378

Wigge P a, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, Weigel D (2005) Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* **309**: 1056–1059

Winter CM, Yamaguchi N, Wu MF, Wagner D (2015) Transcriptional programs regulated by both LEAFY and APETALA1 at the time of flower formation. *Physiol Plant* **155**: 55–73

Xi W, Liu C, Hou X, Yu H (2010) MOTHER OF FT and TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 1733–1748

Yamaguchi N, Winter CM, Wellmer F, Wagner D (2015) Identification of Direct Targets of Plant Transcription Factors Using the GR Fusion Technique. *Methods Mol Biol.* 2015 ; 1284: 123–138

Yamaguchi S (2008) Gibberellin Metabolism and its Regulation. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 225–251

Yamashita Y, Takamatsu S, Glasbrenner M, Becker T, Naito S, Beckmann R (2017) Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of *Arabidopsis* bZIP11 uORF2. *FEBS Lett* **591**: 1266–1277

- Yasushi Kobayashi, Kaya H, Goto K, Lwabuchi M, Araki T** (1999) A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* (80-) **286**: 1960–1963
- Yoshida N, Yanai Y, Chen L, Kato Y, Hiratsuka J, Miwa T, Sung ZR, Takahashi S** (2001) EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2471–2481
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2015) Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell Environ* **38**: 35–49
- Zhang B, Li C, Li Y, Yu H** (2020) Mobile TERMINAL FLOWER1 determines seed size in Arabidopsis. *Nat Plants*. doi: 10.1038/s41477-020-0749-5
- Zhao Y, Zhang T, Broholm SK, Tähtiharju S, Mouhu K, Albert VA, Teeri TH, Elomaa P** (2016) Evolutionary co-option of floral meristem identity genes for patterning of the flower-like asteraceae inflorescence. *Plant Physiol* **172**: 284–296
- Zhu Y, Klasfeld S, Jeong CW, Jin R, Goto K, Yamaguchi N, Wagner D** (2020) Florigen family chromatin recruitment, competition and target genes. *bioRxiv* 2020.02.04.934026

