



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Interacción genética entre el activador de la floración *FLK* y el regulador de la actividad RNA Polimerasa II *CPL1*, durante la transición reproductiva en **Arabidopsis**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Diciembre 2018

Autora: Paula Infantes Llorca

Modalidad: Experimental

Tutor/es: Antonio Vera Tornel

Encarnación Rodríguez Cazorla

Departamento de Biología Aplicada (Área de Genética)

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

RESUMEN

El control de la floración es crítico para el éxito reproductivo de las plantas, el ecosistema y la producción de alimentos. FLK es una proteína KH de unión a RNA que favorece la transición floral reprimiendo al inhibidor de la floración *FLC*, pero se ignora cómo realiza esta función. Estudiaré la interacción de *FLK* con *CPL1*, un gen cuyo producto defosforila el dominio CTD de la RNA polimerasa II, favoreciendo la transcripción y el control cotranscripcional del procesamiento del RNA.

Palabras clave: Arabidopsis, FLK, CPL1, Desarrollo reproductivo, Tiempo de floración

SUMMARY

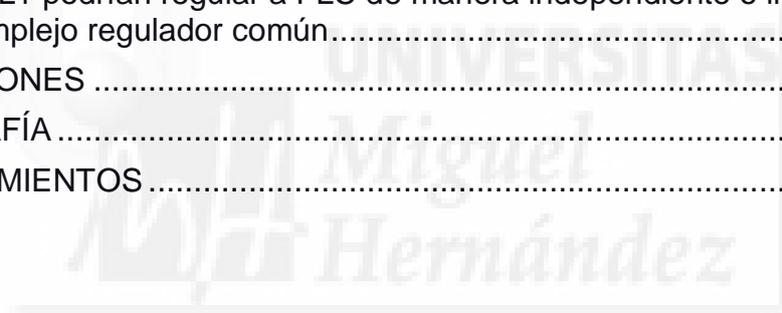
Flowering time control is critical for plant reproductive success, ecosystems and food production. FLK is a KH-type RNA binding protein that favors the floral transition by repressing the *FLC* blooming inhibitor, but the mechanism remains unknown. I will study the *FLK* interaction with *CPL1*, a gene whose product dephosphorylates the CTD domain of RNA polymerase II, facilitating transcription and cotranscriptional control of RNA processing.

Keywords: Arabidopsis, FLK, CPL1, Reproductive development, Flowering time

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Arabidopsis thaliana</i> como organismo modelo.....	1
Regulación de la floración	2
Vía autónoma de la floración.....	4
Integración de las señales inductoras de la floración	4
Regulación cotranscripcional de la expresión génica.....	4
Papel de <i>CPL1</i> en la floración	5
ANTECEDENTES.....	5
La actividad <i>HUA-PEP</i>	5
OBJETIVOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Abreviaturas	7
Organismos utilizados	7
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7
Esterilización de las semillas.....	8
Cultivos en placas Petri.....	8
Cultivos en maceta.....	9
Medida del tiempo de floración	9
Medios de cultivo, disoluciones y tampones	10
Medios de cultivo	10
Medio GM (medio de germinación de <i>Arabidopsis</i>)	10
Medio mínimo ATM (<i>Arabidopsis thaliana</i> Medium).....	10
Sustrato para el cultivo de <i>Arabidopsis</i> en maceta	10
Disoluciones y tampones	10
Tampón de extracción de DNA.....	10
Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa	11
Obtención y manipulación de ácidos nucleicos.....	11
Aislamiento de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	11
Aislamiento de RNA total de <i>Arabidopsis</i>	11
Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado	12
Tratamiento de DNA con enzimas de restricción.....	12
Electroforesis en gel de agarosa	13
Síntesis de ácidos nucleicos.....	13
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13

Retrotranscripción (obtención de cDNA a partir de mRNA)	14
PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	14
Genotipados de las estirpes mutantes	14
Genotipados moleculares.....	14
Análisis estadístico	15
Análisis estadístico de datos de floración	15
Análisis estadístico de los experimentos de qPCR.....	15
Oligonucleótidos utilizados	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
La mutación <i>cpl1-6</i> aumenta el retraso de la floración de <i>flk-2</i> de forma sinérgica	17
La sinergia entre <i>flk-2</i> y <i>cpl1-6</i> se refleja en los niveles de expresión de <i>FLC</i>	18
La eliminación genética de <i>FLC</i> suprime los fenotipos de floración lenta de <i>flk-2</i> y <i>flk-2 cpl1-6</i>	20
FLK y CPL1 podrían regular a FLC de manera independiente o interactuando en un complejo regulador común.....	24
CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA	28
AGRADECIMIENTOS	33



INTRODUCCIÓN

***Arabidopsis thaliana* como organismo modelo**

Un organismo modelo es una especie estudiada de forma intensiva por una amplia comunidad de investigadores con objeto de comprender fenómenos biológicos concretos, con la expectativa de que los avances realizados en dicho sistema modelo sean extrapolables o, al menos, proporcionen nuevas perspectivas en el estudio de otros organismos de mayor complejidad o interés económico, sanitario, etc. Esto es posible por el origen común de todos los organismos vivos y la conservación de su material genético, así como de rutas metabólicas y de desarrollo, a través del curso de la evolución.

Los organismos modelo presentan rasgos que los hacen ideales para su uso en el laboratorio, como son su pequeño tamaño y simplicidad de manejo, fácil propagación y una progenie numerosa que facilite el análisis genético, así como numerosos recursos moleculares^{1,2}. En el laboratorio del área de Genética del Campus de Sant Joan se utiliza *Arabidopsis thaliana*, el modelo vegetal por excelencia, como sistema de experimentación³.

Arabidopsis thaliana (a partir de ahora, *Arabidopsis*) es una pequeña planta de la familia de las Brassicáceas o Crucíferas. Posee un pequeño genoma (aproximadamente 130 Mb) que ya fue secuenciado en el año 2000⁴. Las características más relevantes que favorecen su empleo son: su pequeño tamaño, tiempos de generación cortos (lo cual permite obtener resultados rápidamente), la relativa simplicidad de su genoma, y su prolífica producción de semillas mediante autopolinización (Figura 1)^{5,6}. Además, *Arabidopsis* es transformable de manera sencilla con ayuda de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*⁷.

Figura 1. Estructura y algunas de las características de *Arabidopsis thaliana*.
Modificada a partir de la referencia 43.



Regulación de la floración

Arabidopsis es el caballo de batalla en la investigación de numerosos procesos de desarrollo. Uno de tales procesos es la regulación de la floración o transición reproductiva. Cuándo florecer es una decisión trascendental para la adaptación y el éxito reproductivo de las plantas y que, además, es fundamental para la conservación de los ecosistemas y la agricultura. Por tanto, el avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan la floración es de capital importancia⁸.

La transición floral es una sucesión gradual desde una fase vegetativa a otra reproductiva. Este proceso está controlado por distintas vías reguladoras interconectadas entre sí, que responden a múltiples estímulos ambientales y endógenos, con el fin de que esta transición tenga lugar bajo las condiciones más favorables⁹.

Una estructura clave en este proceso es el meristemo apical del tallo. Este meristemo posee células madre pluripotentes que generarán todos los órganos, vegetativos y reproductivos, determinando la morfología final de éstos y la arquitectura general del individuo^{10,11}.

En la fase vegetativa, el meristemo solo produce hojas en la roseta, hasta que alcanza la fase reproductiva, en la que el meristemo vegetativo cambia su identidad y se transforma en un meristemo de inflorescencia, a partir del cual se formarán los meristemos florales^{10,11}.

Las plantas han desarrollado un complejo sistema de rutas promotoras de la floración^{9,12}. La ruta de las giberelinas (GA) transduce información hormonal, la ruta del fotoperiodo percibe información sobre la longitud del día y la calidad de la luz^{9,13}. La ruta de vernalización permite a las plantas adaptar su ciclo reproductivo a las variaciones estacionales (exposición prolongada al frío invernal)¹⁴, y la ruta termosensible posibilita que las plantas respondan a los cambios de temperatura ambiente, acelerando o retrasando el momento de la floración en ambientes más cálidos o más fríos, respectivamente¹⁵ (Figura 2). Finalmente, la ruta autónoma integra claves endógenas como la edad de la planta⁹ (Figura 2).

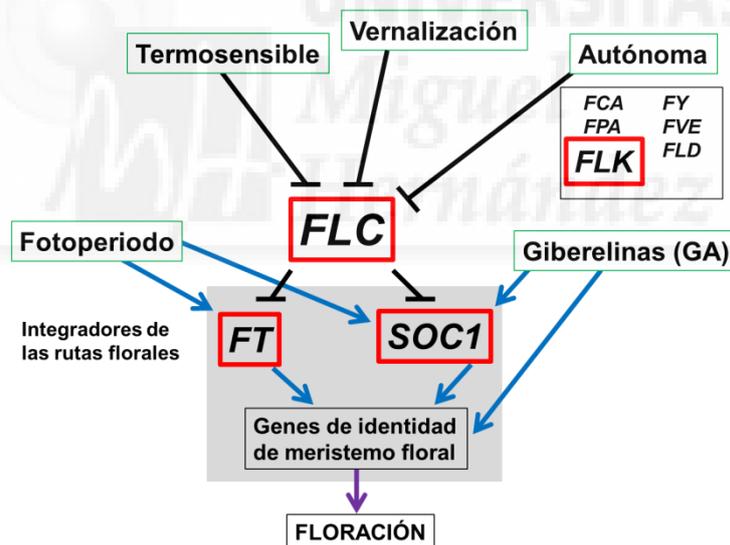


Figura 2. Esquema simplificado del control del tiempo de floración en Arabidopsis. Las distintas vías promotoras de la floración (recuadros verdes) activan a los genes integradores (*FT* y *SOC1*) o bien reprimen a los inhibidores de la floración, entre los que *FLC* desempeña un papel destacado. La represión de *FLC* alivia el control negativo sobre *FT* y *SOC1*, lo que les permite inducir la transición floral. Se señalan los genes de la ruta autónoma, entre los que se destaca *FLK*, así como *FLC*, *FT* y *SOC1*, de especial relevancia en este estudio (recuadros rojos). Las flechas azules indican efectos positivos y las líneas negras efectos negativos.

Vía autónoma de la floración

La vía autónoma integra factores endógenos del grado de desarrollo de la planta y funciona independientemente de los factores ambientales. En ella, están implicados varios genes de diferente naturaleza que promueven la floración regulando negativamente la expresión del represor floral *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Éste codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box que actúa como regulador negativo de la floración en respuesta a señales endógenas y ambientales^{14,16} (Figura 2). La ruta autónoma no es propiamente una vía lineal sino que se compone de distintas actividades que actúan en gran medida de forma aditiva e independiente¹⁷.

Uno de los genes de la ruta autónoma es *FLOWERING LOCUS K (FLK)*, el cual codifica una proteína que contiene 3 dominios de unión a RNA de tipo KH (*K-homology*) y presenta localización nuclear. Las mutaciones de pérdida de función de *FLK (flk)* generan un fenotipo de floración tardío y elevados niveles de expresión de *FLC*^{18,19}. A pesar de conocer la causa, se desconoce el mecanismo de acción molecular de *FLK* sobre *FLC*.

Integración de las señales inductoras de la floración

Todas las vías de floración convergen finalmente en una serie de genes llamados integradores florales tales como *FLOWERING LOCUS T (FT)* y *SUPRESOR OF OVEREXPRESION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, los cuales activan a los genes de identidad de meristemo floral^{9,12,20}. Los integradores florales son reprimidos por actividades que retrasan la floración bajo condiciones adversas no inductivas. Entre ellas, naturalmente, *FLC* es fundamental^{9,16} (Figura 2).

Regulación cotranscripcional de la expresión génica

En eucariotas, la RNA polimerasa II (RNA pol II) transcribe los genes de DNA a pre-mRNA inmaduros. Éstos sufren modificaciones cotranscripcionales, tales como la adición de la caperuza 5', splicing (o escisión de los intrones), y corte y poliadenilación del extremo 3', obteniéndose los mRNA maduros efectivos, y garantizando una expresión génica adecuada²¹. La coordinación entre la transcripción y las modificaciones cotranscripcionales está mediada por el

extremo carboxilo terminal (CTD) de la subunidad grande de la RNA pol II. El CTD se ve afectado por diversas modificaciones posttraduccionales, entre las que los ciclos de fosforilación-defosforilación son de especial relevancia²².

Papel de *CPL1* en la floración

Como se ha comentado, el estado de fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la RNA pol II desempeña papeles cruciales en la transcripción y el procesamiento del mRNA. Estudios previos mostraron que el producto del gen *CTD PHOSPHATASE-LIKE 1 (CPL1)* de *Arabidopsis* desfosforila residuos específicos del CTD (Ser-5) y regula las respuestas a distintos tipos de estrés abiótico^{23,24}. Además, también se había observado que las plantas mutantes *cpl1* exhibían un cierto retraso de la floración en relación con la estirpe silvestre²⁵.

ANTECEDENTES

La actividad *HUA-PEP*

El laboratorio del Área de Genética, en el Campus de Sant Joan d'Alacant de nuestra Universidad, ha contribuido a demostrar que la regulación postranscripcional del gen *AGAMOUS (AG)* es esencial para asegurar su correcta función durante la morfogénesis floral²⁶⁻²⁸. El gen *AG* codifica un factor de transcripción de tipo MADS-box indispensable para la morfogénesis de los órganos reproductivos de la flor y la fertilidad^{29,30}. Varias proteínas facilitan el procesamiento del intrón 2 de *AG*, entre ellas diversas proteínas con dominios KH como *HUA ENHANCER 4 (HEN4)*, *FLK* y *PEPPER (PEP)*^{18,26,31}. Las combinaciones mutantes de sus genes producen defectos de desarrollo floral como resultado del descenso de los niveles del mRNA de *AG*^{26,27}. Además, se comprobó la interacción física de los productos de estos genes, lo que sugiere que, junto a otros genes como *HUA1* y *HUA2* que carecen de motivos KH, forman parte de una misma actividad reguladora que se denominó genéricamente como la actividad *HUA-PEP*²⁷.

Algunos elementos de la función génica *HUA-PEP*, como *FLK*, *PEP* y *HUA2*, regulan el control del tiempo de floración. Ejercen esta labor, al menos en

parte, a través del control de la expresión del represor floral de tipo MADS-box *FLC*, que presenta muchas semejanzas estructurales con *AG*^{19,32,33}.

EL presunto papel de los miembros de la actividad *HUA-PEP* en la regulación cotranscripcional del procesamiento del pre-mRNA de *AG* y de otros genes florales relacionados, se vio reforzado por la interacción física entre miembros de la actividad HUA-PEP, como son HUA1 y PEP, y la proteína CPL1^{27,28}.

Como se indicó, las plantas *cp1* exhiben una floración tardía en relación con la estirpe silvestre²⁵. Por todo ello, se planteó la realización de un análisis genético y molecular de la posible interacción de los genes *CPL1* y *FLK* en el contexto del control del tiempo de floración, que permitiera avanzar en la comprensión del mecanismo de acción de *FLK*.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados son los siguientes:

- Obtención de la combinación doble mutante *flk cp1*
- Análisis del tiempo de floración del doble mutante *flk cp1* y estudio de la relación genética entre ambas mutaciones
- Análisis de la influencia de *CPL1* en la expresión de *FLC*
- Obtención y análisis genético de la combinación triple mutante *flc flk cp1*
- Planteamiento de un modelo de acción

MATERIALES Y MÉTODOS

Abreviaturas

La mayoría de abreviaturas empleadas en este trabajo corresponden a unidades de medidas empleadas en el Sistema Internacional:

%: por ciento	mg: miligramo
°C: grados Celsius	mg/mL: miligramo por mililitro
µg: microgramo	mL: mililitro
µg/mL: microgramo por mililitro	mm: milímetro
µL: microlitro	mM: milimolar
µm: micrómetro	m/v: masa por volumen
µM: micromolar	nm: nanómetro
µmol/m ² sec: micromol por metro cuadrado por segundo	nmol: nanomol
g: gramo	pb: pares de bases
g/L: gramo por litro	rpm: revoluciones por minuto
M: molar	U: unidad enzimática
Mb: megabases	v/v: volumen por volumen

Organismos utilizados

Arabidopsis thaliana

En este trabajo se ha empleado como estirpe silvestre de referencia el ecotipo Columbia-0 (Col-0)⁶. Todas las líneas empleadas en este trabajo pertenecen a este fondo genético.

Dichas líneas se han obtenido del distribuidor de semillas europeo NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*, Norwich, Reino Unido), excepto *flc-3* que fue enviado por Scott Michaels (Indiana University Bloomington).

Tabla 1. Líneas mutantes utilizadas

Línea	Fondo genético	Código NASC	Mutágeno	Referencia
<i>flc-3</i>	Col-0	-	Neutrones rápidos	16
<i>flk-2</i>	Col-0	N501523	T-DNA	18
<i>cpl1-6</i>	Col-0	N370937	T-DNA	25

Esterilización de las semillas

Se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar. Las semillas se esterilizaron con una solución de lejía convencional al 40% y tritón X-100 al 0,1%, durante 8 minutos. A continuación, se realizaron 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno.

Cultivos en placas Petri

Las semillas, previamente esterilizadas, se depositaron mediante una pipeta Pasteur en placas de Petri con medio GM. Las placas se depositaron 2 días a 4°C para la estratificación de las semillas. A continuación, se trasladaron a incubadores Sanyo MLR-351 al 60-70% de humedad, iluminación continua (130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{sec}$) y 21°C durante 14 días (Figura 3).

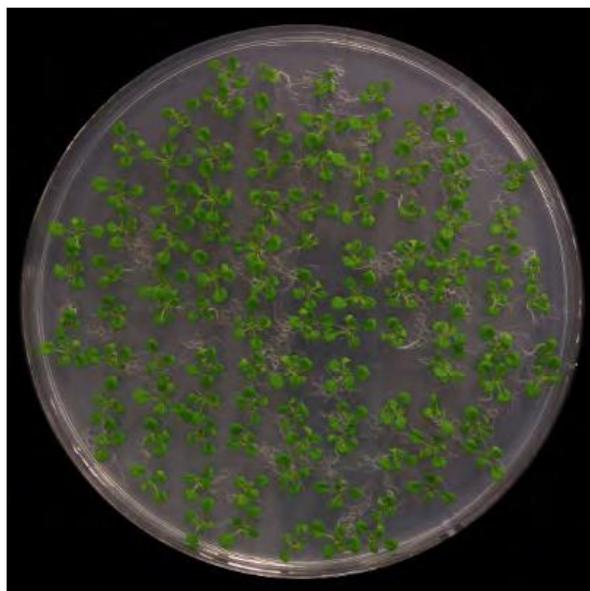


Figura 3. Cultivo en placa de Arabidopsis

Cultivos en maceta

Tras los 14 días de crecimiento en placa, las rosetas se trasladaron a macetas con sustrato inerte, contenido en alveolos de plástico (Pöppelmann) y dentro de una bandeja con medio nutritivo ATM. Se cubrieron, durante unos días, con film transparente agujereado para evitar el exceso de humedad. El cultivo se realizó en el mismo incubador donde tuvo lugar el cultivo en placa (Figura 4).

Tras retirar el film transparente, se efectuaron riegos con agua de la red pública una o dos veces por semana.



Figura 4. Cultivo en bandeja con macetas individuales de Arabidopsis

Medida del tiempo de floración

Las medidas del tiempo de floración se realizaron bajo luz continua a 21°C, ya que Arabidopsis florece rápidamente cuando se cultiva bajo estas condiciones³⁴.

Se utilizaron dos criterios para establecer el tiempo de floración: el número de días transcurridos desde el final de la estratificación de la semillas hasta que se observó el alzado del tallo de inflorescencia; y el número de hojas de la roseta producidas en el mismo periodo. El recuento se realizó con ayuda de una lupa binocular (Leica Zoom 2000). Se realizaron tres réplicas independientes de cada experimento, con 21 individuos de cada genotipo.

De los datos obtenidos se obtuvo la media aritmética y la desviación estándar (DE) mediante el programa Microsoft Excel 2013.

Medios de cultivo, disoluciones y tampones

Medios de cultivo

Medio GM (medio de germinación de Arabidopsis)

Se añadió medio Murashige y Skoog 2,15 g/L; sacarosa 1%; MES ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico) 0,5 g/L. Después de ajustar el pH a 5,7 con KOH 5 M, se incorporó agar para plantas a una concentración de 0,8% (m/v) y se autoclavó.

El medio se vertió en placas de Petri de 140 mm de diámetro en la cabina de flujo laminar, las cuales se guardaron a 4°C en bolsas precintadas.

Medio mínimo ATM (Arabidopsis thaliana Medium)

Se utilizó para regar las plantas en el momento que fueron trasplantadas. Composición: Ca(NO₃)₂ 2 mM; Fe-Na(EDTA) 51 mM; KH₂PO₄ 2,5 mM; KNO₃ 5 mM; MgSO₄ 2 mM; CoCl₂ 0,01 μM; CuSO₄ 0,5 μM; H₃BO₃ 10 μM; MnCl₂ 14 μM; NaCl 10 μM; NaMoO₄ 0,2 μM; ZnSO₄ 1 μM³⁵.

Las soluciones madre se prepararon diluyendo cada componente en agua destilada y se conservaron a 4°C.

Sustrato para el cultivo de Arabidopsis en maceta

Se realizó una mezcla de perlita, vermiculita y turba (2:2:1) en bolsas de plástico y se esterilizó en el autoclave.

Disoluciones y tampones

Tampón de extracción de DNA

Tris-HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM pH 8 y SDS 0,5% (m/v) diluidos en agua destilada estéril. Se conserva a temperatura ambiente (basado en el protocolo *Quick DNA Prep for PCR*³⁶).

Disoluciones utilizadas en electroforesis en geles de agarosa

Tampón TAE 50X: Tris-base [Tris (hidroximetil) aminometano] 2 M; ácido acético glacial 5,71% (v/v); Na₂EDTA 50 mM pH 8. pH final: 7,6.

Tampón de carga 6X: glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 25% (m/v); xilenecianol 0,25% (m/v).

Bromuro de etidio (10 mg/mL): diluido en agua, y conservado en un recipiente protegido de la luz.

Obtención y manipulación de ácidos nucleicos

Aislamiento de DNA genómico de Arabidopsis

Las muestras vegetales (recolectadas con anterioridad y preservadas a -20°C o recién obtenidas) se trituraron dentro de un tubo *ependorf* con una varilla de plástico. Posteriormente se añadió tampón de extracción durante 15 minutos a 37°C. Tras centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos, se tomó parte del sobrenadante y se añadió isopropanol (1:1, v/v). Se incubó 15 minutos a -20°C para permitir la precipitación del DNA. A continuación, se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos. Se sustituyó el isopropanol por etanol 70% para lavar el DNA.

Por último, después de otra centrifugación a la misma velocidad y tiempo, se eliminó el etanol y se resuspendió en agua destilada estéril.

Aislamiento de RNA total de Arabidopsis

Se tomaron rosetas con 12 días y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido tras su recolección. Este material se pulverizó mediante el uso de un mortero, tomándose 100 mg de cada muestra. Posteriormente se procedió a la extracción del RNA usando el kit *GeneJET Plant RNA Purification* (Thermo Fisher), siguiendo el protocolo del fabricante.

A continuación se realizó una digestión con DNAsa I (Thermo Fisher) durante 1 hora a 37°C para la eliminación del DNA genómico. Para concentrar el RNA se añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 de volumen de LiCl 4 M y se

incubó a -80°C durante varias horas. Después se centrifugó a 14000 rpm y a 4°C durante 10 minutos. Tras un lavado con etanol al 70%, se dejó secar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar trazas de etanol. Para terminar, se resuspendió en 25 μL de agua libre de RNAsas, almacenándolo a -80°C hasta su uso.

Para evitar la degradación del RNA se utilizó siempre nitrógeno líquido para congelar tanto el material vegetal como el instrumental usado en su manipulación. Además, se trató la superficie de trabajo con etanol para limitar la acción de las RNAsas.

Análisis cuantitativo y cualitativo del RNA total aislado

Se determinó el RNA obtenido con el espectrofotómetro Eppendorf BioPhotometer, que permite medir la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, así como la obtención del cociente, en una dilución de 1/50 de la muestra.

Se realizó una PCR con cebadores de DNA genómico para asegurar la ausencia del mismo. Se visualizaron 0,5 μg de cada muestra en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio, para comprobar su integridad (Figura 5). Para evitar la presencia de RNAsas, se trató todo el material de electroforesis con NaOH 0,4 M.

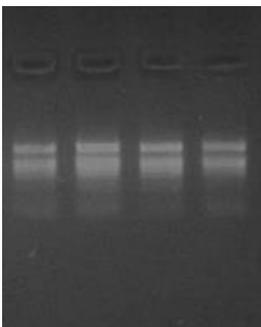


Figura 5. Integridad del RNA obtenido. Gel de agarosa al 2% donde se observan 4 muestras de RNA total. Las bandas más aparentes corresponden al RNA ribosómico.

Tratamiento de DNA con enzimas de restricción

Se procuró utilizar una relación de 1 U de enzima por cada μg de DNA que se pretendía digerir. Posteriormente, se verificó el resultado de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6).

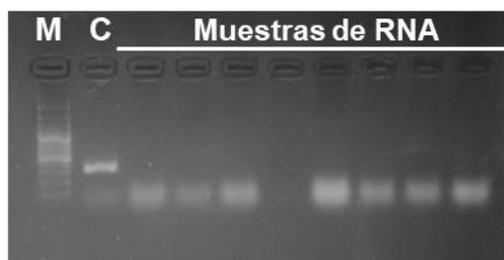


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras de RNA, donde se aprecia la ausencia de DNA genómico salvo en la muestra control (C) donde se omitió el tratamiento con DNAsa. M) Marcadores de peso molecular.

Electroforesis en gel de agarosa

La preparación del gel de agarosa (Ecogen) se realizó añadiendo agarosa (1%-2%) a una disolución TAE 1X, junto con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/mL. Se añadió a las muestras tampón de carga 6X antes de cargarlas en el gel.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 voltios. Para visualizar el resultado, se utilizó un transiluminador (GeneDoc) acoplado a una cámara Canon 1000D que permite la captura de imágenes de los geles con el programa Eos Utility.

Síntesis de ácidos nucleicos

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se añadió 0,2 µM de cada cebador; 0,2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxirribonucleótido; MgCl₂ 1,5 mM; 1 U de Taq DNA polimerasa (EURx); tampón de PCR 10X (EURx) y DNA con concentración variable.

La PCR se realizó en un termociclador Bio-Rad T100 Thermal Cycler. La reacción se inició con 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C para la desnaturalización del DNA, un paso de 30 segundos a 50-60°C (temperatura óptima de hibridación de los cebadores), y 25-30 segundos a 72°C. Por último, se programó una elongación de 7 minutos a 72°C.

Retrotranscripción (obtención de cDNA a partir de mRNA)

Primero, se realizó una incubación de 5 µg de RNA total y una concentración de 0,4 mM del cebador oligo (dT)₁₈ (Thermo Fisher), a 65°C durante 5 minutos para evitar la presencia de estructuras secundarias. Posteriormente, se incorporó la enzima Revert Aid Transcriptase (200 U, Thermo Fisher) junto a su tampón 5X, dNTP (25 mM) y Ribolock (20 U, Thermo Fisher) y se incubó a 42°C durante 60 minutos. Al finalizar, las reacciones se conservaron a -20°C hasta su uso como molde para reacciones de qPCR (ver a continuación).

PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Después de la retrotranscripción, se midió la expresión a través del sistema LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizando el kit de amplificación *Maxima SYBER Green qPCR Master Mix 2X*, siguiendo las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher).

Los niveles de expresión se normalizaron con el gen de referencia OTC (ORNITINE TRANSCARBAMILASE)³⁷, así como con los niveles silvestres correspondientes. Se realizaron 2 réplicas intraensayo. Los resultados de expresión se corrigieron con una curva de calibrado de los cebadores (también llamada curva de eficiencia)³⁸. Los valores se expresaron en promedios ± desviación estándar (DE).

Genotipados de las estirpes mutantes

Genotipados moleculares

En la Tabla 2 se exponen los genotipados moleculares llevados a cabo para identificar los diferentes alelos utilizados en este trabajo. A modo de ejemplo, en la Figura 7 se muestra el análisis de diversas muestras en relación a la mutación *flc-3*.

Tabla 2. Genotipados moleculares

Alelo	Cebadores	Tamaño del producto de PCR en pb (silvestre/mutante)
<i>flc-3</i>	FLC-FF ; FLC-R	448/344
<i>flk-2</i>	KH3-2 ; KH3-7 ; LBb1	340/450
<i>cpl1-6</i>	cpl1-6F B1 ; cpl1-6R B1; o8474	676/300

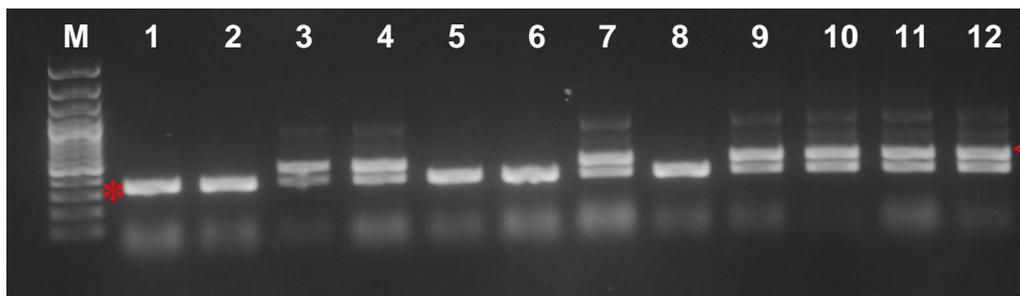


Figura 7. Genotipado molecular de *flc-3*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. La banda correspondiente al alelo silvestre (triángulo rojo) tiene un tamaño de 448 pb y la banda del alelo mutante (asterisco rojo) es de 344 pb. En las calles 1, 2, 5, 6 y 8 se observa el perfil de bandas de un homocigoto mutante *flc-3*, y en las calles 3, 4, 7, 9-12 el de un heterocigoto *flc-3/+*. M) Marcadores de peso molecular.

Análisis estadístico

Análisis estadístico de datos de floración

En primer lugar, los datos recogidos en Microsoft Excel 2013 se guardaron como archivo de texto delimitado por tabuladores. Dicho archivo, se abrió en el programa *R commander* versión 2.3-0, donde se realizó el test ANOVA (Análisis de la varianza).

Análisis estadístico de los experimentos de qPCR

Se realizaron análisis para verificar si los niveles de mRNA de un gen en los distintos fondos mutantes presentan diferencias significativas respecto a los niveles silvestres. Se utilizó la función Prueba t Student del programa Excel como análisis preliminar.

En ambos casos (floración y qPCR) se establecieron como diferencias estadísticamente significativas valores de probabilidad menores a 0,05 ($p < 0,05$), 0,01 ($p < 0,01$) y 0,001 ($p < 0,001$).

Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados (Tabla 3) fueron sintetizados por Invitrogen (Life Technologies) y Sigma Aldrich, en una escala 25 nmol.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5'-3'	Objetivo	Referencia
FLC3-FF	GCTCGTCATGCGGTACACGT	<i>flc-3</i>	33
FLC3-R	CGGAGGAGAAGCTGTAGAGCTTGC	<i>flc-3</i>	33
KH3-2	TGGTTCAAGAGTCGGATCTG	<i>flk-2</i>	33
KH3-7	GCGTTATATTTCTTTCTAACACATGC	<i>flk-2</i>	33
LBb1	AACCAGCGTGGACCGCTTGCTG	<i>flk-2</i>	SALK
cpl1-6F B1	CTCAATCTGGCGAGAGGTGT	<i>cpl1-6</i>	Este trabajo
cpl1-6R B1	AACGCTTCATCTCAGCCAC	<i>cpl1-6</i>	Este trabajo
o8474	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT	<i>cpl1-6</i>	Gabi Kat
OTC F	TGAAGGGACAAAGGTTGTGTATGTT	qPCR <i>OTC</i>	39
OTC R	CGCAGACAAAGTGGAAATGGA	qPCR <i>OTC</i>	39
FLC E2-R	CATGCTGTTTCCCATATCGATCAAG	qPCR <i>FLC</i>	33
FLC RT-F	TTCTCCAAACGTCGCAACGGTCTC	qPCR <i>FLC</i>	33
FT 1F	AGAGAGGTGACTAATGGCTTGG	qPCR <i>FT</i>	33
FT 1R	CAGTGGGACTTGGATTTTCGTA	qPCR <i>FT</i>	33
SOC1-1F	TATGGTGAGGGGCAAACTC	qPCR <i>SOC1</i>	40
SOC1-1R	TCCTATGCCTTCTCCAAGA	qPCR <i>SOC1</i>	40

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mutación *cpl1-6* aumenta el retraso de la floración de *flk-2* de forma sinérgica

Como se ha comentado anteriormente, los mutantes *flk* presentan floración tardía, así como las plantas *cpl1*²⁵. Se decidió analizar el comportamiento del doble mutante *cpl1 flk*. Para ello se usaron los alelos de pérdida completa de función (alelos nulos) *flk-2*¹⁹ y *cpl1-6*⁴¹. Tras el análisis de una familia F₂ procedente del cruce *flk-2* x *cpl1-6* se identificaron plantas *flk-2 cpl1-6* mediante genotipado molecular (ver materiales y métodos). Tras completar su ciclo, se recolectaron sus semillas para el análisis del tiempo de floración.

Como se observa en la Figura 8, los mutantes simples *flk-2* florecieron mucho más tarde que las plantas Col-0, tal como se esperaba. Estos resultados confirman resultados previos de otros autores y del laboratorio^{18,19,33}. Así mismo, el mutante simple *cpl1-6* es ligeramente más lento floreciendo que la estirpe parental silvestre Col-0. Estas diferencias, aunque modestas, son estadísticamente significativas en términos de días aunque no en número de hojas.

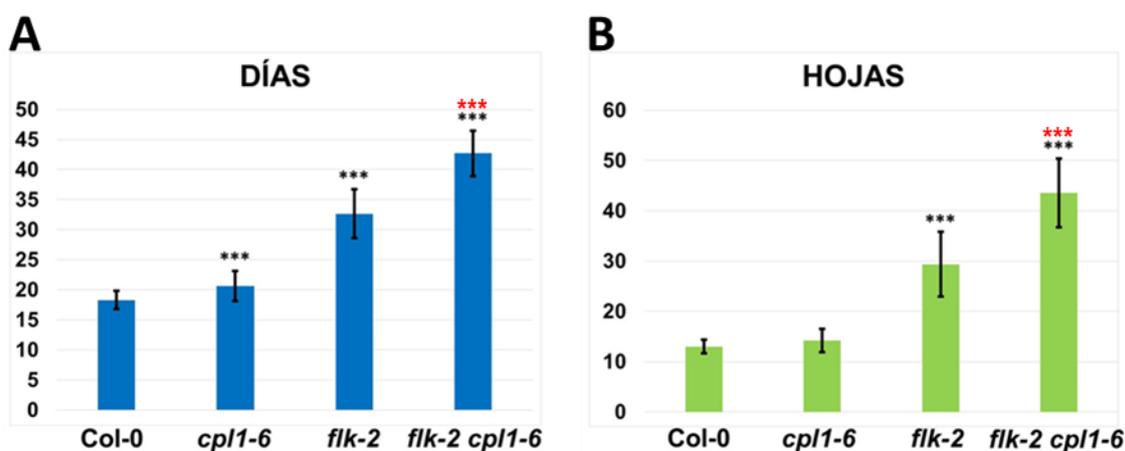


Figura 8. Tiempo de floración en los genotipos mutantes *flk-2*, *cpl1-6* y *flk-2 cpl1-6*. Las barras son el promedio de los datos \pm Desviación Estándar (DE). Los asteriscos negros indican diferencias significativas respecto al silvestre Col-0. Los asteriscos rojos indican diferencias significativas entre *flk-2* y *flk-2 cpl1-6*. ***, $p < 0,001$.

No obstante, el efecto de *cpl1-6* sobre el tiempo de floración se manifestó de manera conspicua en el doble mutante *flk-2 cpl1-6*, el cual muestra un fenotipo de floración lenta muy acusado (Figura 8). Como se aprecia en la Figura 8, el incremento en el retraso de la floración es claramente sinérgico. Así, incrementos de dos días, o apenas una hoja, en el mutante simple *cpl1-6* con respecto al silvestre, se convierten en diferencias de 10 días y 14 hojas, respectivamente, entre el mutante simple *flk-2* y el doble mutante *flk-2 cpl1-6*.

La sinergia entre *flk-2* y *cpl1-6* se refleja en los niveles de expresión de *FLC*

FLK es un regulador negativo de *FLC*, por lo que los mutantes *flk* de pérdida de función presentan altos niveles de *FLC*, principal causa de su retraso en la floración¹⁸. Por otra parte, se desconoce el impacto de la mutación *cpl1* sobre la expresión de *FLC*. Por consiguiente, se decidió examinar, mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR), la expresión de *FLC* en los genotipos examinados en la sección anterior. En consonancia con su fenotipo de floración lenta, el mutante *flk-2* mostró abundantes niveles de expresión de *FLC* en relación al silvestre (Figura 9A), tal como se esperaba^{19,33}. Además, pudimos comprobar que en el mutante *cpl1-6* también se produce un incremento de la expresión de *FLC* con respecto al silvestre, aunque de mucha menor consideración (Figura 9A), reflejando el modesto incremento del tiempo de floración de este mutante (Figura 8). Lo más notorio, no obstante, fue el espectacular incremento de expresión de *FLC* en el fondo genético *flk-2 cpl1-6* (Figura 9A). Como se observa, la producción de transcrito de *FLC* es mucho más que la mera suma de los incrementos producidos en ambos mutantes simples. Este resultado confirma nuestra observación anterior y refuerza la idea de una interacción genética y molecular entre *FLK* y *CPL1*. De hecho, los resultados de expresión de *FLC* van en paralelo con las medidas de tiempo de floración (Figuras 8 y 9A).

FT y *SOC1*, genes integradores e inductores de la floración, son dianas directas de *FLC*²⁰, por lo que a mayor actividad *FLC* cabría esperar descensos

en los niveles de *FT* y *SOC1*. Por tanto, para reforzar los resultados anteriores también examinamos la expresión de estos genes mediante qPCR.

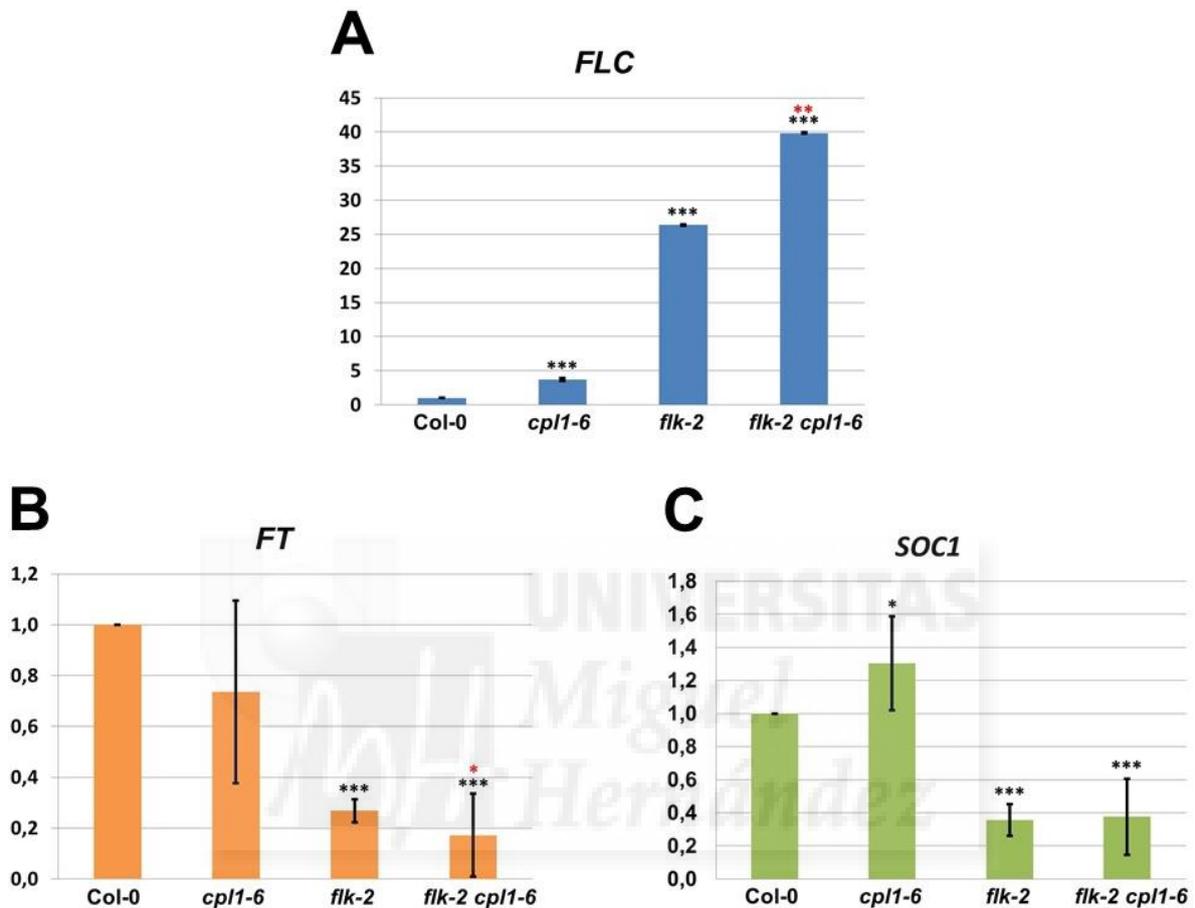


Figura 9. Expresión relativa de *FLC*, *FT* y *SOC1*, en los genotipos *flk-2*, *cpl1-6* y *flk-2 cpl1-6*. Las barras son el promedio de los datos \pm Desviación Estándar (DE). Los asteriscos negros indican diferencias significativas respecto al silvestre. Los asteriscos rojos indican diferencias significativas entre *flk-2* y *flk-2 cpl1-6*. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

En clara sintonía con esta premisa, se observó un descenso de los niveles de *FT* progresivamente más acusado en cada uno de los mutantes examinados (Figura 9B). Un examen equivalente de la expresión de *SOC1* rindió resultados no tan claros, aunque apuntando en la misma dirección, siendo los mutantes de floración muy lenta (*flk-2* y *flk-2 cpl1-6*) los que presentaron niveles de expresión muy inferiores a la estirpe silvestre (Figura 9C). En su conjunto, estos datos son coherentes con los altos niveles de *FLC* y los retrasos en la floración observados.

Los resultados de qPCR mostrados en este trabajo se refieren a experimentos con una única muestra biológica y dos réplicas intraensayo, claramente insuficientes para un trabajo de más envergadura que el presente TFG, dada su brevedad de ejecución. Estos resultados se reforzarán con nuevas réplicas biológicas en un futuro inmediato. No obstante, los datos obtenidos merecen mucha confianza porque son coincidentes con otros datos anteriores del laboratorio y de otros autores, como es el caso del mutante *flk-2* en relación al silvestre Col-0^{19,33} y, además, guardan una gran coherencia con el resto de observaciones.

La eliminación genética de *FLC* suprime los fenotipos de floración lenta de *flk-2* y *flk-2 cpl1-6*

Con objeto de confirmar aún más las conclusiones obtenidas en las secciones anteriores, decidimos eliminar la función *FLC* en los fondos *flk-2* y *flk-2 cpl1-6* por medios genéticos. Para ello se introdujo la mutación nula *flc-3*¹⁶ en dichos fondos mutantes. Tras obtener la generación F₂ de un cruce *flk-2 cpl1-6* x *flc-3*, se procedió a la identificación, mediante genotipado molecular (ver materiales y métodos), de los dobles mutantes *flc-3 flk-2*, y los triples mutantes *flc-3 flk-2 cpl1-6*. Tras su obtención se analizó su comportamiento respecto al tiempo de floración.

En la Figura 10 se muestran los datos de floración en el fondo *flc-3* (columnas rojas), comparándose con los mismos valores mostrados en la Figura 8 (columnas azules o verdes), que se corresponden a genotipos con una función *FLC* intacta.

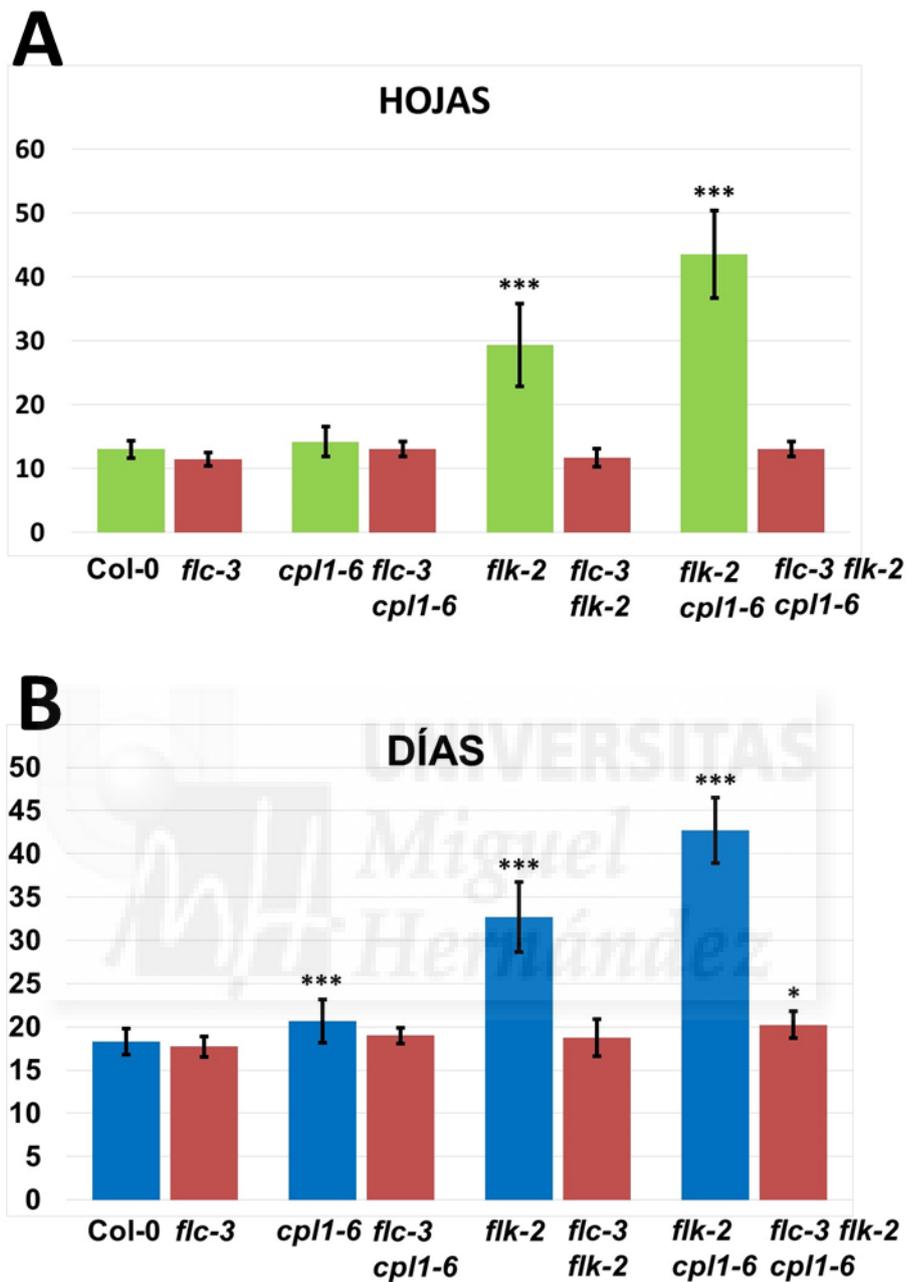


Figura 10. Tiempo de floración en los genotipos *flc-3*, *flc-3 cpl1*, *flc-3 flk-2*, y *flc-3 flk-2 cpl1-6* y su comparación en los mismos fondos sin la mutación *flc-3*. Las barras son el promedio de los datos \pm Desviación Estándar (DE). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al silvestre. ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$.

Los resultados son contundentes. El mutante *flc-3* se mostró sutilmente más rápido floreciendo que el silvestre (Figura 10), como cabría esperar de la eliminación de un represor de la floración. Estos datos confirman observaciones

previas¹⁶. Pero, además, en la Figura 10 se observa cómo la ausencia de *FLC* elimina el retraso de la floración en los otros tres genotipos (*flc-3 cpl1-6*, *flc-3 flk-2*, *flc-3 flk-2 cpl1-6*), reduciéndolo a niveles silvestres o incluso menores. No hay diferencias significativas tanto en hojas como en días, excepto una pequeña diferencia en días en el triple mutante *flc-3 flk-2 cpl1-6* con respecto a Col-0. Obsérvese también la comparación de individuos representativos en la Figura 11.

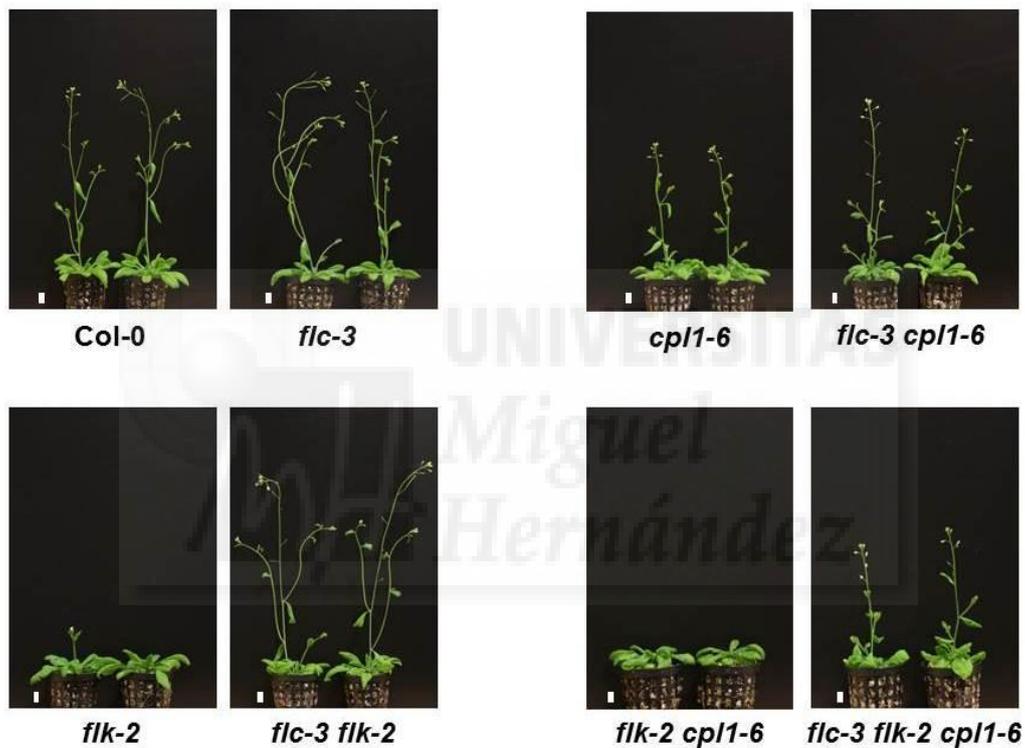


Figura 11. Imágenes de individuos representativos de los distintos genotipos a los 32 días de cultivo. Barras de escala: 1 cm.

Para corroborar aún más estos resultados, realizamos medidas de expresión de *FT* y *SOC1* mediante qPCR en los fondos mutantes incluyendo el alelo *flc-3* (columnas rojas en la Figura 12) y los comparamos con los valores mostrados en la Figura 9 (columnas azules en la Figura 12).

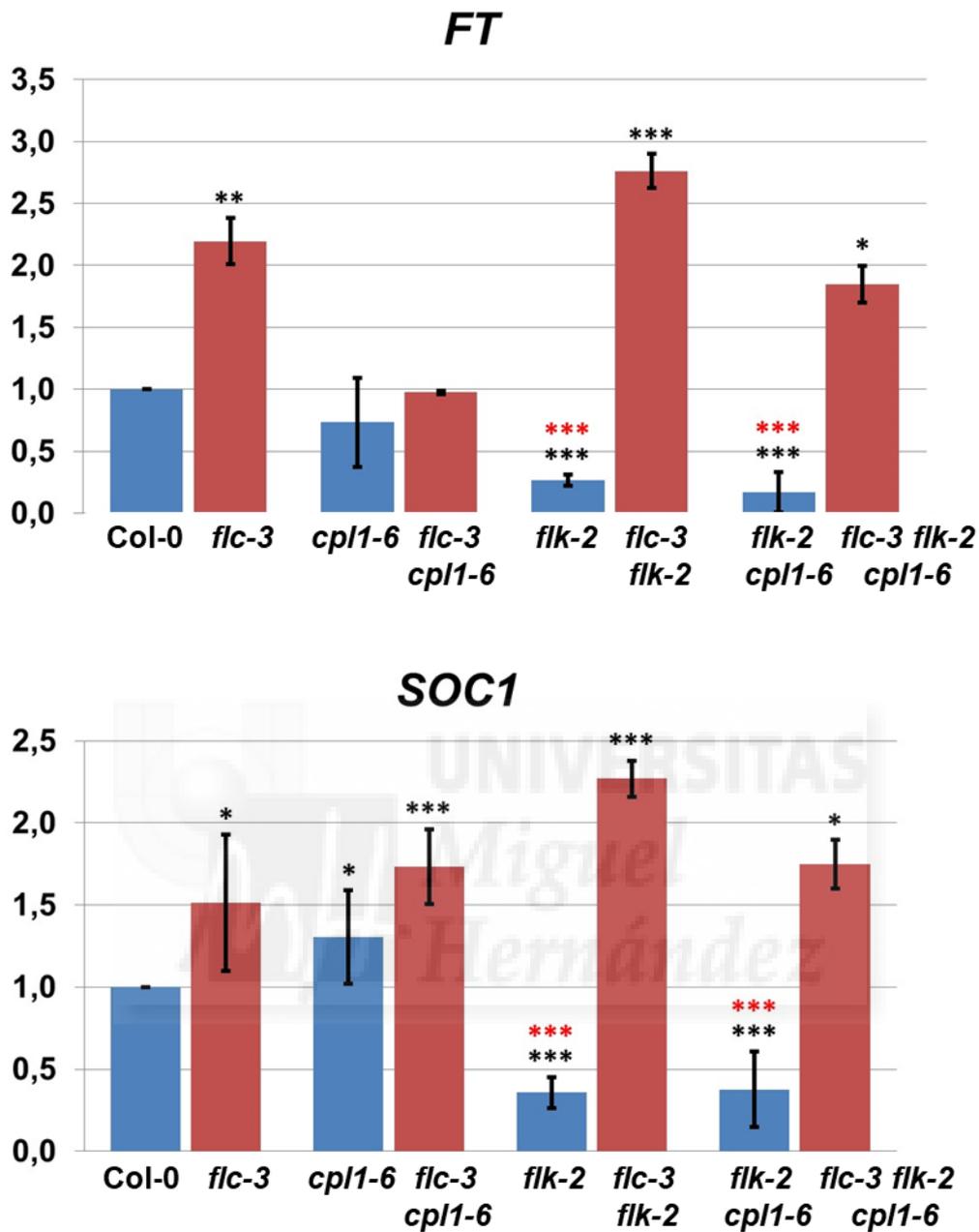


Figura 12. Expresión relativa *FT* y *SOC1* en todos los genotipos con fondo *flc-3*. Las barras son el promedio de los datos \pm Desviación Estándar (DE). Los asteriscos negros indican diferencias significativas con respecto a Col-0. Los asteriscos rojos indican diferencias significativas entre los distintos fondos genéticos con y sin la mutación *flc-3*. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

La eliminación de *FLC* provocó aumentos de *FT* y *SOC1* en todos los genotipos, llamando la atención especialmente los altos niveles que mostraron las plantas de genotipo *flc-3 flk-2* y *flc-3 flk-2 cpl1-6* (Figura 12). La ausencia

del represor *FLC* alivia la represión de los inductores florales *FT* y *SOC1* y rescata el tiempo de floración, eliminando el retardo producido por las mutaciones *flk-2* o *cpl1-6*, o ambas simultáneamente.

FLK y CPL1 podrían regular a FLC de manera independiente o interactuando en un complejo regulador común

Nuestros resultados genéticos y de expresión molecular, particularmente los de *FLC*, no encajan con una actuación lineal de *FLK* y *CPL1*. De ser así, habría sido de esperar que ambas mutaciones simples, *cpl1-6* y *flk-2*, tuvieran efectos cuantitativamente similares que, a su vez, tampoco deberían diferir en exceso con los del doble mutante *cpl1-6* y *flk-2*. Sin embargo, no es así. El efecto de *flk-2* sobre el retardo de la floración y la desregulación de *FLC* es considerablemente mayor que el de *cpl1-6* (Figuras 8 y 9A). Pero tampoco es aditivo. El efecto simultáneo de ambas mutaciones es superior a la suma de sus efectos por separado. Tanto la aditividad como la sinergia de sus efectos podrían encajar con un modelo como el mostrado en la Figura 13, en el cual, ambos genes actúan reprimiendo a *FLC* mediante dos mecanismos independientes.

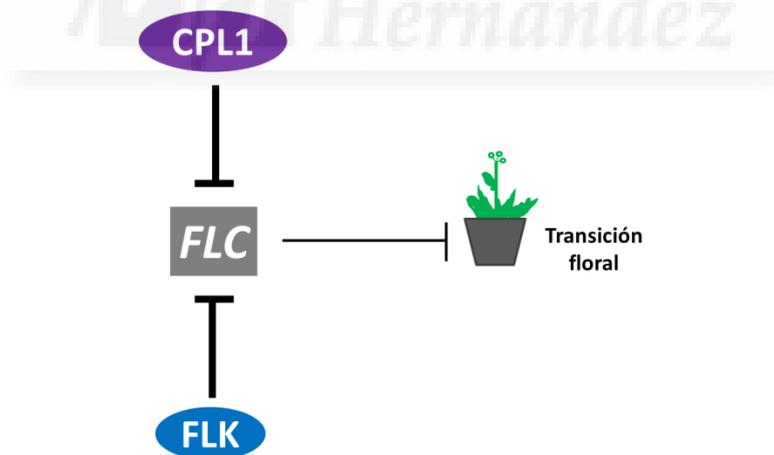


Figura 13. Modelo de actuación independiente de *FLK* y *CPL1* sobre *FLC*. Las proteínas *FLK* y *CPL1* reprimen a *FLC* afectando a diferentes procesos, sumando sus efectos o ejerciendo un efecto superior a la mera suma de ambos.

Alternativamente, las proteínas CPL1 y FLK podrían formar parte del mismo complejo multimérico regulador, implicado en la expresión del pre-mRNA de *FLC*, su transcripción y su procesamiento cotranscripcional. Los fenotipos sinérgicos de mutantes dobles suelen deberse a que los productos afectados están funcionalmente relacionados⁴². Así, como se muestra en la Figura 14A, CPL1 y FLK interactuarían en un complejo proteico en compañía de factores adicionales (representados por el símbolo ?).

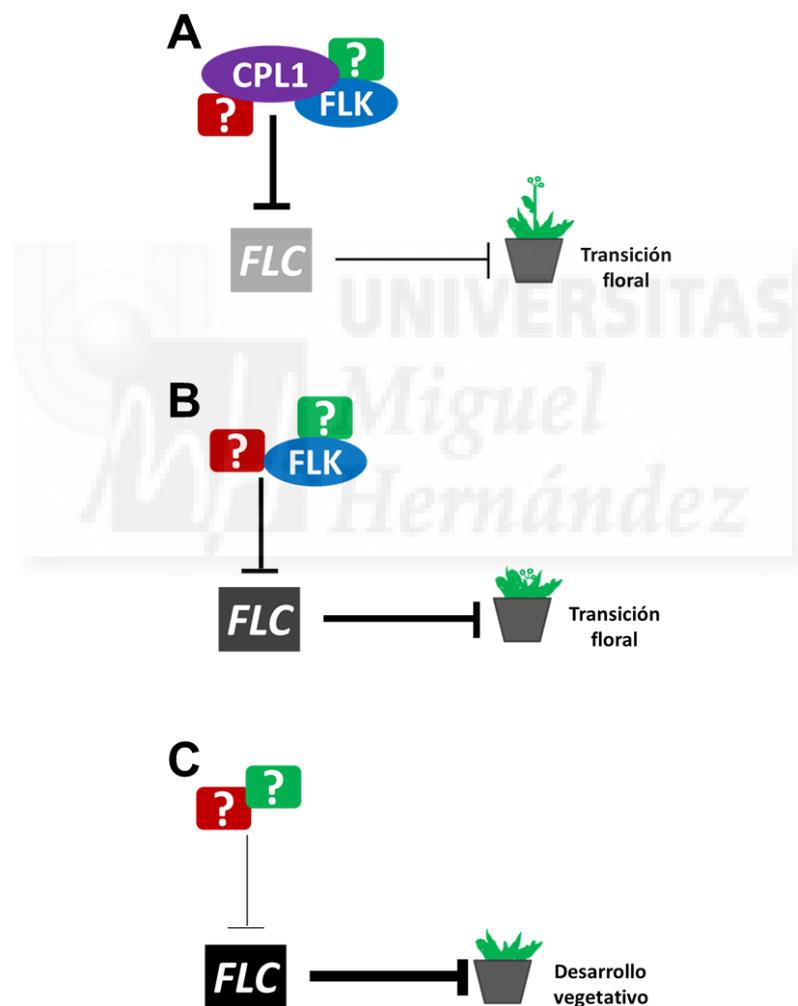


Figura 14. Modelo según el FLK y CPL1 actúan sobre FLC formando parte de un complejo regulador común (A) que se vería afectado de forma muy severa por la pérdida sucesiva de las actividades de CPL1 (B) y FLK (C). Los símbolos de interrogación (?) representan otras proteínas integrantes del mismo complejo que FLK y CPL1.

Este complejo, probablemente actuando sobre el CTD de la RNA pol II, reprimiría la expresión de *FLC*, manteniendo unos niveles bajos de expresión que permitirían la transición floral tras un periodo de desarrollo vegetativo normal. La eliminación de CPL1 (Figura 14B) y de CPL1 más FLK (Figura 14C) debilitaría la acción del complejo, relajando la represión de *FLC*, retrasando así la floración y prolongando la fase vegetativa. Esta hipótesis se presenta como la más verosímil puesto que CPL1 interactúa físicamente con PEP y HUA1 que, como FLK, también son miembros de la actividad HUA-PEP^{27,28}. FLK, a su vez, forma complejos tanto con HUA1 como con PEP²⁷. Además, resultados preliminares del laboratorio sugieren que las proteínas FLK y CPL1 también se asocian físicamente (resultados sin publicar) lo que supone un fuerte apoyo a esta idea.



CONCLUSIONES

En relación con la hipótesis de partida y el trabajo realizado en el presente TFG hemos alcanzado las siguientes conclusiones:

- 1) Hemos corroborado que la actividad de *CPL1* promueve la floración.
- 2) *CPL1* interactúa sinérgicamente con *FLK*, un gen de la ruta autónoma y de la actividad *HUA-PEP*, que también promueve la transición floral mediante la represión de *FLC*.
- 3) La sinergia fisiológica de retraso de la floración entre las mutaciones de pérdida de función de *CPL1* y *FLK* se deben a un aumento, igualmente sinérgico, de la expresión del represor central *FLC* en los dobles mutantes *flk cpl1*.
- 4) Nuestros resultados se ajustan a un mecanismo de actuación independiente de *FLK* y *CPL1* sobre *FLC*, o bien de la participación de ambas proteínas en complejos reguladores comunes, cuya ausencia simultánea sería responsable de la sinergia observada.
- 5) La interacción de *FLK* con *CPL1*, un regulador posttraduccional del dominio CTD de la RNA pol II, refuerza la visión de que las proteínas de la actividad *HUA-PEP* actúan cotranscripcionalmente sobre sus genes diana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson K V, Ingham PW. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl(march):285–93.
2. Koornneef M, Meinke D. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 2010 Mar;61(6):909–21.
3. Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, et al. 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytol.* Wiley/Blackwell (10.1111); 2016 Feb;209(3):921–44.
4. Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature.* 2000 Dec 14;408(6814):796–815.
5. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* (80-). 1998;282(5389):662–82.
6. Rédei GP. Supervital Mutants of Arabidopsis. *Genetics.* 1962 Apr;47(4):443–60.
7. Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P. The transfer of DNA from agrobacterium tumefaciens into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J.* 2000 Jul;23(1):11–28.
8. Blümel M, Dally N, Jung C. Flowering time regulation in crops — what did we learn from Arabidopsis? *Curr Opin Biotechnol.* 2015 Apr;32:121–9.
9. Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(12):2013–37.
10. Clark SE. Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Apr 1;2(4):276–84.
11. Carles CC, Fletcher JC. Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *Trends Plant Sci.* 2003 Aug;8(8):394–401.
12. Fornara F, de Montaigu A, Coupland G. SnapShot: Control of Flowering

- in *Arabidopsis*. *Cell*. 2010 Apr 30;141(3):550–550.e2.
13. Conti L. Hormonal control of the floral transition: Can one catch them all? *Dev Biol*. 2017 Oct;430(2):288–301.
 14. Bouché F, Woods DP, Amasino RM. Winter Memory throughout the Plant Kingdom: Different Paths to Flowering. *Plant Physiol*. American Society of Plant Biologists; 2017 Jan 1;173(1):27–35.
 15. Capovilla G, Schmid M, Pose D. Control of flowering by ambient temperature. *J Exp Bot*. 2015 Jan 1;66(1):59–69.
 16. Michaels SD, Amasino RM. FLOWERING LOCUS C Encodes a Novel MADS Domain Protein That Acts as a Repressor of Flowering. *Plant Cell*. 1999;11:949–56.
 17. Quesada V, Dean C, Simpson GG. Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. *Int J Dev Biol*. 2005;49(5–6):773–80.
 18. Lim M-H, Kim J, Kim Y-S, Chung K-S, Seo Y-H, Lee I, et al. A new *Arabidopsis* gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell*. American Society of Plant Biologists; 2004 Mar;16(3):731–40.
 19. Mockler TC, Yu X, Shalitin D, Parikh D, Michael TP, Liou J, et al. Regulation of flowering time in *Arabidopsis* by K homology domain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 2004 Aug 24;101(34):12759–64.
 20. Lee JH, Hong SM, Yoo SJ, Park OK, Lee JS, Ahn JH. Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of *Constans 1*. *Physiol Plant*. Wiley/Blackwell (10.1111); 2006 Jan;126:475–83.
 21. Bentley DL. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet*. 2014 Mar 11;15(3):163–75.
 22. Hsin J-P, Manley JL. The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor

- Laboratory Press; 2012 Oct;26(19):2119–37.
23. Jiang J, Wang B, Shen Y, Wang H, Feng Q, Shi H. The arabidopsis RNA binding protein with K homology motifs, SHINY1, interacts with the C-terminal domain phosphatase-like 1 (CPL1) to repress stress-inducible gene expression. *PLoS Genet.* Public Library of Science; 2013;9(7):e1003625.
 24. Jeong IS, Aksoy E, Fukudome A, Akhter S, Hiraguri A, Fukuhara T, et al. Arabidopsis C-Terminal Domain Phosphatase-Like 1 Functions in miRNA Accumulation and DNA Methylation. Park S, editor. *PLoS One.* 2013 Sep 18;8(9):e74739.
 25. Koiwa H, Barb AW, Xiong L, Li F, McCully MG, Lee B -h., et al. C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate Arabidopsis thaliana abiotic stress signaling, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci.* 2002 Aug 6;99(16):10893–8.
 26. Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X. Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in Arabidopsis thaliana. *Dev Cell.* 2003 Jan;4(1):53–66.
 27. Rodríguez-Cazorla E, Ripoll JJ, Andújar A, Bailey LJ, Martínez-Laborda A, Yanofsky MF, et al. K-homology Nuclear Ribonucleoproteins Regulate Floral Organ Identity and Determinacy in Arabidopsis. Qu L-J, editor. *PLOS Genet.* 2015 Feb 6;11(2):e1004983.
 28. Rodríguez-Cazorla E, Ortuño-Miquel S, Candela H, Bailey-Steinitz LJ, Yanofsky MF, Martínez-Laborda A, et al. Ovule identity mediated by pre-mRNA processing in Arabidopsis. Hake S, editor. *PLOS Genet.* 2018 Jan 12;14(1):e1007182.
 29. Drews GN, Bowman JL, Meyerowitz EM. Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell.* 1991 Jun 14;65(6):991–1002.
 30. Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldmann KA, Meyerowitz EM. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous*

- resembles transcription factors. *Nature*. 1990 Jul 5;346(6279):35–9.
31. Ripoll JJ, Ferrándiz C, Martínez-Laborda A, Vera A. PEPPER, a novel K-homology domain gene, regulates vegetative and gynoecium development in *Arabidopsis*. *Dev Biol*. 2006 Jan 15;289(2):346–59.
 32. Doyle MR, Bizzell CM, Keller MR, Michaels SD, Song J, Noh Y-S, et al. HUA2 is required for the expression of floral repressors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2004 Dec 14;41(3):376–85.
 33. Ripoll JJ, Rodríguez-Cazorla E, González-Reig S, Andújar A, Alonso-Cantabrana H, Perez-Amador MA, et al. Antagonistic interactions between *Arabidopsis* K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C. *Dev Biol*. Academic Press; 2009 Sep 15;333(2):251–62.
 34. Ratcliffe OJ, Nadzan GC, Reuber TL, Riechmann JL. Regulation of flowering in *Arabidopsis* by an FLC homologue. *Plant Physiol*. 2001 May;126(1):122–32.
 35. Kranz AR, Kirchheim B. Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arab Inf Serv*. 1987;24.
 36. Weigel D, Glazebrook J. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. 354 p.
 37. Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL. The ULTRACURVATA2 gene of *Arabidopsis* encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*. American Society of Plant Biologists; 2004 Jan;134(1):101–17.
 38. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
 39. González-Reig S, Ripoll JJ, Vera A, Yanofsky MF, Martínez-Laborda A. Antagonistic Gene Activities Determine the Formation of Pattern Elements along the Mediolateral Axis of the *Arabidopsis* Fruit. Qu L-J, editor. *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2012 Nov 1;8(11):e1003020.

40. Zavala-Gonzalez EA, Rodríguez-Cazorla E, Escudero N, Aranda-Martinez A, Martínez-Laborda A, Ramírez-Lepe M, et al. *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytol.* 2017 Jul;213(1):351–364.
41. Aksoy E, Jeong IS, Koiwa H. Loss of Function of *Arabidopsis* C-Terminal Domain Phosphatase-Like1 Activates Iron Deficiency Responses at the Transcriptional Level. *Plant Physiol.* 2013 Jan;161(1):330–45.
42. Pérez-Pérez JM, Candela H, Micol JL. Understanding synergy in genetic interactions. *Trends Genet. Elsevier*; 2009 Aug 1;25(8):368–76.
43. Conduct of plants in the lack of light - SeedsCactus.com (<http://seedscactus.com/en/content/68-conduct-of-plants-in-the-lack-of-light>).



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a Antonio y Encarni la maravillosa oportunidad que me han brindado al permitirme hacer mi TFG bajo su supervisión y por hacerme sentir una más en “nuestro” laboratorio.

A Encarni, por la grandísima ayuda que me ha dado en la realización de este proyecto y por esos momentos que hacía de mami cuando lo necesitaba (en lo bueno y en lo malo).

A mi amiga Belén, por todos estos años de amistad inseparable, en los que te has convertido en una hermana para mí. Gracias por haber compartido este largo camino conmigo, gracias por ese gran apoyo día tras día.

A mis padres y hermanos, por darme esa confianza y apoyo incondicional durante toda la vida, pero sobretodo en las épocas de exámenes que con un abrazo sentía toda la energía que me dabais y me hacía sentir que podía con todo.

Por último, me gustaría agradecer a una persona que ya no está con nosotros, a mi tío Rai. Como me gustaría que te escaparas un segundo del cielo para que me des ese abrazo que nunca pudiste darme cuando te marchaste. Pero sé, que no te has ido del todo, siempre estarás ahí para lo que necesitemos. Sólo espero que estés muy orgulloso de tu somera. Te echo de menos tío.